UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas

**Efeitos do ácido clorogênico sobre fenômenos celulares da resolução da
inflamação**

Tathiana da Cunha Castro Moreira

Tese para obtenção do grau de MESTRE

Orientadora:

Dr^a Sandra Helena Poliselli Farsky

São Paulo

2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas

**Efeitos do ácido clorogênico sobre fenômenos celulares da resolução da
inflamação**

Tathiana da Cunha Castro Moreira

Tese para obtenção do grau de MESTRE

Orientadora:

Dr^a Sandra Helena Poliselli Farsky

São Paulo

2014

Ficha Catalográfica

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

Moreira, Tathiana da Cunha Castro
M838e Efeitos do ácido clorogênico sobre fenômenos celulares da
resolução da inflamação / Tathiana da Cunha Castro Moreira. --
São Paulo, 2014.
51p.

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

Orientador: Farsky, Sandra Helena Poliselli

1. Inflamação 2. Macrófagos 3. Neutrófilos 4. Apoptose
I. T. II. Farsky, Sandra Helena, Poliselli, orientador.

616.0473 CDD

Tathiana da Cunha Castro Moreira

Efeitos do ácido clorogênico sobre fenômenos celulares da resolução da
inflamação

Comissão Julgadora da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Sandra Helena Poliselli Farsky
orientadora/presidente

1o. examinador

2o. examinador

3o. examinador

São Paulo, ____ de _____ de 2014.

Á Lúcia Helena...

Mãe, todo melhor de mim é seu!

À Anália Maria e Dario Pieroni...

Gratidão e carinho para todo o sempre!

Aos meus irmãos e cúmplices, Gil Filho e Brunna.

À Bibby Moreira Christensen...

Amada! Obrigada por toda a nossa história feliz!

Ao Dr. Bruno Christensen...

*Pessoas como você nos fazem acreditar em um mundo melhor,
você é pura luz... Obrigada por ser meu melhor amigo e meu melhor*

tudo!

Amo vocês...

AGRADECIMENTOS

Agradeço em especial à minha mãe, que sempre esteve e está ao meu lado torcendo e acreditando mim mais do que eu mesma. A melhor invenção de Deus foram as mães, por isso vejo como sou especial, pois tenho a melhor mãe do mundo, não foi por acaso que te escolhi Luhê Cunha Castro! Tudo posso Naquele que me fortalece no céu e tudo posso Naquela que me fortalece na terra. Obrigada por querer ser minha mãe. Quando a senhora fala que sou forte e determinada é porque sou um pedaço seu. A senhora não poderia ser melhor. Te amo! Aos meus irmãos por todo carinho e por encherem a minha vida de amor. Vocês todos são a melhor parte de mim! Obrigada ao meu pai por toda a nossa história. Obrigada ao Dr. Ruy Moraes por estar ao meu lado e cuidar de quem eu amo. Aos meus avós Ione e Dr. Belo por terem me ajudado a iniciar essa empreitada. Ao meu avô Quinzinho, que me remete saudade. Ao Dario Pieroni Neto e Anália Maria Melaré Pieroni, vocês são parte de toda a vitória que eu conquistei e vou conquistar.

Aos meus amigos Dra. Pamela Díaz, Dr. Christian Díaz e Leonardo Menezes, obrigada por todo carinho, incentivo e oração.

Ao Dr. Bruno Christensen, amado, por trazer sempre alegria e sossego em todas as lutas diárias. Sou feliz por ter alguém que eu admiro sempre ao meu lado.

À Professora Sandra Farsky pela oportunidade, a todo Departamento de Toxicologia e Análises Toxicológicas, à Samantha e Nancy, à Msc. Carine Drewes por toda ajuda experimental e apoio, aos meus colegas de laboratório, em especial aos amigos Paula Gabriela, Msc. Ana Shimada e Dr. Stephen Rodrigues.

Obrigada ao Coordenador Prof. Dr. Ernani Pinto e à Prof. Dra. Elvira Shinohara.

Obrigada a todos que mesmo não listados estiveram ao meu lado.

E o mais importante, obrigada a Deus por ter me guiado sempre e me dado tantas oportunidades de coleccionar mais do que conhecimento, mas também tantas pessoas importantes para compor a minha história.

*“Aprendi com as primaveras a me deixar
cortar para voltar sempre inteira”.*

Cecília Meireles

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	Ácido Araquidônico
ACG	Ácido Clorogênico
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AST	Aspartato transaminase
C5a	Fração 5 do sistema complemento
C3a	Fração 3 do sistema complemento
C5b67	Fração 5 do sistema complemento
CD18	β2-Integrina
COX	Ciclooxigenase
eNOS	Óxido Nítrico sintase endotelial
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GLP-1	Peptídeo do tipo glucagon-1
ICAM-1	Molécula de Adesão Intercelular
IFN-γ	Interferon-gama
IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
LOX	Lipoxigenase
LPS	Lipopolissacarídeo de parede bacteriana
MAPKs	Proteínas Quinases Ativadas por Mitógenos
NO	Óxido Nítrico
PAF	Fator de Ativação Plaquetária
PBS	Solução tamponada de fosfato
PECAM-1	Molécula de adesão plaqueta-endotelial
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral
VCAM-1	Molécula de Adesão Vascular

RESUMO

MOREIRA, T. C. C. **Efeitos do ácido clorogênico sobre fenômenos celulares da resolução da inflamação** 2014. 51 f. Tese (Dissertação de Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

A imunidade inata é um mecanismo ativado rapidamente para permitir a defesa do organismo contra injúrias de diferentes origens. No entanto, a exacerbação do processo inato é prejudicial ao hospedeiro e pode levar a cronicidade do processo. Os neutrófilos são as células importantes na resposta inata, que após exercerem suas ações no processo, devem ser eliminadas para o retorno da homeostasia. Nesta fase, os neutrófilos entram em apoptose e são fagocitados por macrófagos residentes. O ácido clorogênico (ACG) é componente frequente de alimentos, em especial em grãos, e apresentam propriedades anticancerígenas, antimutagênicas, antipiréticas, antifúngicas, antioxidantes, analgésicas e anti-inflamatórias. Neste último contexto, as ações do ACG na instalação do processo têm sido bem demonstradas, mas seu potencial de interferir com a resolução da inflamação ainda é fragmentária. Desta forma, o presente trabalho visou avaliar os mecanismos de ação do ACG na resolução da inflamação, focando nos mecanismos de morte dos neutrófilos, de fagocitose e “killing” de macrófagos. Para tanto, foram empregados camundongos, adultos, machos da linhagem Swiss. Neutrófilos peritoneais foram recrutados 4 horas após injeção local de glicogênio de ostra 1% e macrófagos peritoneais foram obtidos 96 horas após a injeção local de tioglicolato de sódio a 3%. Os resultados obtidos mostraram que o tratamento com ACG por 24 horas, na concentração 1, 10, 50 e 100 mM, aumentou a porcentagem de número de neutrófilos apoptóticos e não alterou a porcentagem de neutrófilos em necrose; a

incubação de ACG por 1 hora, na concentração 1, 10, 50 e 100 mM, com macrófagos peritoneais aumentou a capacidade destas células fagocitarem neutrófilos apoptóticos; reduziu a secreção do tumor de necrose tumoral (TNF-alfa), não alterou a secreção de interleucina-10 e não interferiu com as expressões de MHC-II e de CD36. Em conjunto, os dados obtidos sugerem que o ACG pode controlar a resolução da inflamação por induzir a apoptose de neutrófilos e a fagocitose destes por macrófagos.

Palavras-chave: apoptose, fagocitose, resolução da inflamação, ácido clorogênico

ABSTRACT

MOREIRA, T.C.C. **Effects of chlorogenic acid on cellular phenomena of resolution of inflammation** 2014. 51 f. Thesis (Master thesis). Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Sao Paulo, Sao Paulo, 2014.

Innate immunity is a rapidly activated mechanism to allow the body's defense against injuries from different origins. However, exacerbation of innate process is detrimental to the host and can lead to chronic process. Neutrophils are important cells in innate response, which after performing their actions in the process, should be eliminated for the return of homeostasis. At this stage, the neutrophils undergo to apoptosis and are phagocytosed by resident macrophages. The chlorogenic acid (CGA) is a frequent component of foods, in particular grain, and it has anticancer, antimutagenic, antipyretic, antifungal, antioxidant, anti-inflammatory and analgesic properties. In this latter context, the actions of the ACG in the initial phases of the inflammatory process have been well documented, but its potential to interfere with the resolution of inflammation is still fragmented. Thus, the present study aimed to evaluate the mechanisms of action of ACG in the resolution of inflammation, focusing on mechanisms of neutrophil death and phagocytosis of macrophages. Hence, Swiss adult, male mice were employed as donor of neutrophils and macrophages. Peritoneal neutrophils were recruited 4 hours after local injection of 1% oyster glycogen and used for assessment of cell death mechanism, besides being used as apoptotic cells to be phagocytosed. Peritoneal macrophages recruited 96 hours after the injection of 3% thioglycollate medium were used to 1) phagocytosis assay 2) Quantification of inflammatory mediators in the supernatant 3) quantification of MHC-II and CD36. The results showed that treatment with ACG, during 24 hours, at concentrations of 1, 10, 50 or 100 mM increased the percentage of apoptotic neutrophils and did not induced necrosis; incubation of macrophages during 1 hour with 1, 10, 50 or 100 mM increased the capacity of these cells to phagocyte apoptotic neutrophils; reduced tumor secretion of tumor necrosis factor (TNF-alpha) and did not alter the secretion of interleukin-10, and did not interfere with the expression of MHC-II and CD36. Together, these data suggest that the ACG can control the

resolution of inflammation, by interfering with events in neutrophils and macrophages.

Keywords: apoptosis, phagocytosis, resolution of inflammation, chlorogenic acid

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Efeitos dos tratamentos com ACG sobre a porcentagem de neutrófilos apoptóticos e necróticos.....	19
Figura 2. Efeitos dos tratamentos com ACG sobre a fagocitose de neutrófilos apoptóticos por macrófagos.....	20
Figura 3. Efeitos dos tratamentos com ACG sobre o número de neutrófilos fagocitados por macrófagos.....	21
Figura 4. Análise quantitativa do efeito do ACG sobre a capacidade de macrófagos fagocitarem neutrófilos senescentes.....	21
Figura 5. Efeitos dos tratamentos com ACG sobre a secreção de TNF- α por macrófagos em condições basais e tratados com ACG.....	22
Figura 6. Efeitos do tratamento com ACG sobre a secreção de IL-10 por macrófagos em condições basais e tratadas com ACG.....	23
Figura 7. <i>Dot plot</i> ilustrativo dos efeitos do tratamento com ACG sobre a expressão de CD36 por macrófagos em fagocitose de neutrófilos apoptóticos.....	23
Figura 8. Efeitos do tratamento com ACG sobre a expressão de CD36 e MHCII por macrófagos em fagocitose de neutrófilos apoptóticos.....	24

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Inflamação.....	1
1.1.2 Resolução da inflamação inata.....	6
1.2 Ácido clorogênico (ACG).....	10
2. OBJETIVO E JUSTIFICATIVA	15
3. MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1 Animais	15
3.2 Obtenção de neutrófilos viáveis	16
3.3 Viabilidade de neutrófilos	16
3.4 Obtenção de macrófagos.....	17
3.5 Ensaio de fagocitose.....	17
3.6 Quantificação de mediadores inflamatórios.....	18
3.7 Expressão de CD36 e MHC classell.....	18
3.8 Análise estatística.....	18
4. RESULTADOS	19
4.1 Efeitos do ACG sobre a indução de apoptose de neutrófilos.....	19
4.2 Efeitos do ACG sobre a fagocitose de neutrófilos apoptóticos de macrófagos.....	20
4.3 Efeitos do ACG sobre a secreção de mediadores químicos.....	22
4.4 Efeitos do ACG sobre a expressão de CD36 e MHCII.....	23
DISCUSSÃO	24
5. CONCLUSÕES	29
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	30
ANEXOS.....	52

1 INTRODUÇÃO

1.1 Inflamação

A inflamação é uma reação complexa a vários agentes, que consiste em respostas vasculares e celulares orquestradas pela ação de mediadores químicos, os quais são sintetizados e/ou produzidos por diferentes tipos celulares envolvidos no processo, bem como derivados da ativação de sistemas plasmáticos. As ações dos mediadores químicos podem ou não serem específicas a um único evento do processo, mas na maioria das vezes são pleotrópicas, ou seja, atuam em diferentes fases do processo inflamatório. Ainda, as ações se sobrepõem e na ausência de um mediador, outro pode exercer eficientemente o papel específico no processo (ROSEN, 2004; GILROY & LAWRENCE, 2007; GRIFFIN *et al.*, 2012; SUBRAMANIAN *et al.*, 2012).

Os fenômenos da inflamação iniciam-se com alterações hemodinâmicas na porção microcirculatória da área lesada, com subsequente migração de leucócitos circulantes para o local de lesão. Após exercerem suas funções, alguns tipos leucocitários entram em processo de morte, são fagocitados, ou são drenados para a circulação linfática, para a finalização do processo (ROSEN, 2004; GILROY & LAWRENCE, 2007; GRIFFIN *et al.*, 2012; SUBRAMANIAN *et al.*, 2012).

Nos estágios iniciais do processo inflamatório, ocorrem modificações na reologia da rede microcirculatória, caracterizadas pela constrição e subsequente dilatação dos vasos da microcirculação, em especial das vênulas pós-capilares, além de aumento de permeabilidade vascular, sendo que este último fenômeno ocorre pela contração das células endoteliais. Durante este processo, há aumento do fluxo sanguíneo para o local da área inflamada e extravasamento de proteínas plasmáticas para o interstício extravascular, ocasionado por diferença de pressão osmótica entre os compartimentos. Estes fenômenos provocam calor, eritema e edema no local da inflamação, eventos característicos do processo. Estes fenômenos são mediados por cininas e fatores ativos do sistema complemento, como o fator C3a, além de histamina, serotonina e prostaglandinas liberadas de grânulos mastocitários. Adicionalmente, a adesão de neutrófilos circulantes na parede de vênulas pós-capilares, mediado em especial pela fração C5a do complemento, contribui para a formação do edema. Tanto o aumento de fluxo sanguíneo e de permeabilidade vascular acontece para que mediadores

inflamatórios plasmáticos alcancem o foco de lesão e contribuam para o desenvolvimento do processo inflamatório (LU *et al.*, 2000).

Logo nas etapas iniciais do processo inflamatório, leucócitos da circulação passam a interagir com o endotélio que reveste as vénulas pós-capilares da área inflamada. Os neutrófilos são as primeiras células da circulação a ligarem-se ao endotélio microvascular inflamado e migrarem em direção aos tecidos. Os neutrófilos aderem-se fortemente ao endotélio inflamado, para que não sejam arrastados pela circulação sanguínea. Os neutrófilos ligados devem, então, ultrapassar a parede vascular e migrar para os tecidos subjacentes. O processo de extravasamento dos neutrófilos é dividido em quatro etapas sequenciais: (1) rolamento (rolling), (2) ativação por estímulos quimioatratantes, (3) aprisionamento e adesão e (4) migração transendotelial (KUBY *et al.*, 2003; ATILLA, 2013; EL KEBIR & FILEP, 2013). Estes fenômenos são dependentes de adesões celulares de diferentes intensidades, mediadas, na maioria das vezes, por receptores expressos nas membranas celulares, denominados de moléculas de adesão (KUBY *et al.*, 2003; HALBWACHS & LESAVRE, 2012; PADMANABHAN & GONZALEZ, 2012).

A expressão e ativação das moléculas de adesão nos leucócitos circulantes e no endotélio é regulada pelos mediadores químicos, entre os quais histamina, serotonina, fatores do complemento, interleucinas, derivados do ácido araquidônico (AA), óxido nítrico (NO), fatores de crescimento, entre outros (KUBY *et al.*, 2003; SARANGAPANI *et al.*, 2011; FUTOSI *et al.*, 2013).

A etapa inicial de rolamento é mediado pela expressão de moléculas de adesão da família das selectinas, E e P-selectinas endoteliais e L-selectina nos leucócitos. As selectinas ligam-se a carboidratos existentes nas membranas celulares, como os fucosilados e sialilados. A interação entre os leucócitos e as células endoteliais mediada pelas selectinas é fraca que, devido à força do fluxo sanguíneo, os leucócitos são arrastados e deslizam sobre a parede vascular (KUBY *et al.*, 2003; SARANGAPANI *et al.*, 2011; FUTOSI *et al.*, 2013).

Ao mesmo tempo em que os leucócitos rolam ao longo do endotélio há, também, a ativação do endotélio por diversos quimioatratantes. Estes quimioatratantes podem estar permanentemente na superfície das células endoteliais ou podem ser secretados localmente pelas células envolvidas na resposta inflamatória. Entre os quimioatratantes estão os membros da família das quimiocinas (IL-8 e a proteína inflamatória do macrófago MIP-1 β), algumas proteínas do complemento (C5a, C3a

e o C5b67), fatores de ativação de plaquetas (PAF) e vários peptídeos N-formilados, produzidos pela degradação de proteínas bacterianas, durante infecções. A ligação destes quimioatratantes a receptores da membrana dos neutrófilos desencadeia um sinal de ativação que induz uma alteração conformacional ou a síntese proteica de moléculas de adesão da membrana do leucócito, as integrinas, aumentando a sua afinidade para as moléculas de adesão da superfamília das imunoglobulinas (Ig's), no endotélio. A interação entre as integrinas e as moléculas de adesão das Ig's estabiliza a adesão do leucócito à célula endotelial, permitindo que este fique aderido firmemente à parede vascular (KUBY *et al.*, 2003; SARANGAPANI *et al.*, 2011; FUTOSI *et al.*, 2013). As integrinas compreendem uma grande família de moléculas de adesão composta da perfeita interação de uma cadeia α e outra β . O contato entre as subunidades α e β envolve suas metades amino-terminais que, juntas, formam uma "cabeça" globular e as porções remanescentes formam duas caudas em formato cilíndrico que atravessam a membrana (EL KEBIR & FILEP, 2013).

De acordo com a ligação de diferentes cadeias α com um única cadeia β comum, as integrinas são subdivididas em sub-famílias. Dentre estas, as moléculas da sub-família das $\beta 2$ integrinas, também chamada de CD18, medeiam a adesão dos leucócitos ao endotélio vascular (EL KEBIR & FILEP, 2013). Existem 3 distintas glicoproteínas de superfície molecular da família das $\beta 2$ integrinas, que consiste de uma única subunidade variável α , LFA (CD11a), MAC (CD11b) e p150,95 (CD11c) e a subunidade compartilhada e também designada $\beta 2$ (CD18) (GAHMBERG *et al.*, 2009, EL KEBIR & FILEP, 2013).

A superfamília das imunoglobulinas (IgSF) consiste em proteínas da superfície celular que contém um ou mais domínio semelhantes às Ig's. Cerca de 40% dos 150 ou mais polipeptídios que têm sido caracterizados na superfície dos leucócitos pertencem a esta superfamília. Os membros desta família incluem uma variedade de moléculas de adesão celular, incluindo as expressas no endotélio vascular, importante na adesão leucócito-endotélio, como a VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule-1*), a PECAM-1 (*platelet endothelial cell adhesion molecule-1*), MadCAM-1 (*Mad- cell adhesion molecule*) e as ICAM-1, 2 e 3 (*intercellular cell adhesion molecule*) (LANGER & CHAVAKIS, 2010).

Após a adesão dos leucócitos ao endotélio vascular pela interação das $\beta 2$ -integrinas e imunoglobulinas, o neutrófilo migra através da parede do vaso para os

tecidos (KUBY *et al.*, 2003 SARANGAPANI *et al.*, 2011; FUTOSI *et al.*, 2013). A PECAM-1 situa-se nas junções basolaterais das células endoteliais e atuam facilitando a transmigração de neutrófilos através da barreira endotelial. Nesta migração transendotelial participam várias integrinas e membros da Ig's, como a ICAM-1, VCAM-1 e a já citada PECAM-1 (LANGER & CHAVAKIS, 2010; SCHMIDT *et al.*, 2013)

Os leucócitos em geral, neutrófilos, monócitos, eosinófilos e linfócitos, são guiados em direção ao tecido inflamado pelo gradiente quimiotático de substâncias exógenas, como moléculas derivadas de bactérias, e mediadores endógenos, como componentes do sistema complemento, produtos da via de lipoxigenase, como o leucotrieno B₄, citocinas e quimiocinas, como a IL-8 e o fator quimiotático de monócitos (SCHULTE *et al.*, 2011). Em comum, estes mediadores químicos atuam sobre receptores transmembranais com sete domínios associados à proteína G, levando à ativação de cascatas de sinalização intracelular que induzem a mobilização de cálcio intracelular e a ativação de quinases, que em conjunto, modificam a conformação de filamentos de actina e miosina, que levam a adesão focal ao substrato, movimentação e direção em resposta a um gradiente de concentração (SALLUSTO & MACKAY, 2004; GUERREIRO *et al.*, 2011). No foco de inflamação, a fagocitose representa um antigo mecanismo de adaptação celular. Em organismos primitivos, é utilizada primariamente para a aquisição de nutrientes, enquanto que, em organismos superiores, é desempenhada por células especializadas (ex. macrófagos, neutrófilos e células dendríticas), tornando-se indispensável na realização de uma grande variedade de eventos de defesa especializados (ADEREM, 2003; VERNON & TANG, 2013).

O contato da célula fagocitária com o microorganismo é acompanhado de sinais que ativam processos celulares, tais como rearranjo do citoesqueleto com tráfego da membrana citoplasmática, ativação de mecanismos microbicidas, produção de citocinas pró e anti-inflamatórias, ativação de apoptose celular e mecanismos de apresentação de antígenos para as células do sistema imune adaptativo (URHILNDEL & OZINSKY, 2002; VERNON & TANG, 2013).

Apesar da complexidade de mecanismos de reconhecimento das partículas e sinalizações intracelulares, pode-se subdividir o processo de fagocitose em três etapas cruciais: (1) reconhecimento e internalização; (2) sinalização intracelular e;

(3) acoplamento da atividade fagocitária à resposta inflamatória local e sistêmica (UNDERHILL & OZINSKY, 2002; VERNON & TANG, 2013).

Os processos de reconhecimento e internalização das diferentes partículas microbianas ocorrem por uma grande variedade de mecanismos moleculares e morfológicos. As partículas invasoras podem ser reconhecidas diretamente pelos receptores de membrana dos fagócitos ou pela ligação de opsoninas em sua superfície, que então serão reconhecidas pelos receptores localizados na membrana das células fagocitárias (UNDERHILL & OZINSKY, 2002; VERNON & TANG, 2013).

Após o reconhecimento e ligação das partículas invasoras aos receptores das células fagocitárias, sinais que induzem a polimerização de moléculas de actina sob a membrana no local de contato são gerados e a membrana citoplasmática estende-se em torno da partícula direcionando-a ao centro da célula. O fagossomo transforma-se em fagolisossomo por uma série de eventos de fusão de membranas e, em seu interior ácido e hidrolítico, o patógeno é morto e digerido em preparação para o processo de apresentação de antígenos (ADEREM, 2003; LU & ZHOU, 2013).

A internalização de partículas microbianas pelas células fagocitárias é geralmente acompanhada de sinalização inflamatória e ativação de mecanismos microbicidas. Alguns receptores, como os da porção Fc das Ig's, são capazes de ativar diretamente uma resposta pró-inflamatória, mas existe uma série de receptores adicionais que não necessariamente participam do processo de internalização, mas são capazes de regular a fagocitose, acoplando-a a resposta inflamatória (UNDERHILL & OZINSKY, 2002). Dentro dessa categoria de receptores, destacam-se os *Toll-like* receptors (TLRs), que são recrutados para o interior dos fagossomos, sendo capazes de analisar seu conteúdo e determinar a natureza do patógeno endocitado (ADEREM, 2003; LU & ZHOU, 2013).

A destruição de microrganismo após a fagocitose pode ser mediada por dois mecanismos: metabolismo oxidativo com produção de metabólitos ativos do oxigênio (BABIOR, 1978; MUNDI *et al.*, 1991) ou liberação de enzimas lisossômicas (SEGAL & SOOTHILL, 1983). Adicionalmente, os macrófagos são células relevantes para a resolução do processo inflamatório, uma vez que são responsáveis pelo *clearance* de células e debris inflamatórios resultantes desses processos (MURRAY & WYNN, 2012; ORTEGA-GOMEZ *et al.*, 2013).

Uma vez que o estímulo lesivo foi exterminado, os neutrófilos bem como os *debris* formados devem ser removidos do sítio de inflamação, para que não haja dano ao tecido do hospedeiro, e o retorno a homeostase (ORTEGA-GOMEZ *et al.*, 2013).

1.1.2 Resolução da inflamação inata

A resolução da inflamação já foi considerada um processo passivo e hoje é definida como um processo endógeno ativo, que tem por objetivo a proteção do hospedeiro, evitando uma resposta inflamatória exacerbada (BANNENBERG *et al.*, 2005; SERHAN *et al.*, 2007). Essa resposta é de suma importância para a manutenção da homeostase, sendo a inadequação desse processo a causa de muitas doenças, como artrite, câncer, obesidade, doença de Alzheimer, sepse, aterosclerose, doença de Crohn, entre outras (HELGADOTTIR *et al.*, 2004; KARP *et al.*, 2004; LLODRA *et al.*, 2004, KRISHNAMOORTHY *et al.*, 2006; FERGUSON, 2010; FRANK *et al.*, 2013; MELINDA *et al.*, 2013; DEBORAH *et al.*, 2013).

Como já descrito, em resposta à injúria ou infecções, polimorfonucleares (PMNs) migram para os sítios inflamatórios para neutralizar e eliminar estímulos potencialmente deletérios. Este é o fator talvez mais óbvio, mas com certeza o mais crítico para a resolução da inflamação aguda. Com o fim dos agentes agressores, ocorre a diminuição das vias de sinalização pró-inflamatórias, como a síntese dos mediadores pró-inflamatórios (eicosanoides, quimiocinas, citocinas, moléculas de adesão, etc.) e o início do catabolismo dos mesmos. Em adição a esses eventos, ocorre a liberação de fatores que previnem a migração dos neutrófilos e a formação de edema e, a esse conjunto constitui o início do processo de resolução da inflamação aguda e o retorno a homeostase (SERHAN *et al.*, 2007).

Neste processo ocorre o *clearance* celular, tendo como rotas de saída disponíveis o retorno dos leucócitos inflamatórios para a circulação sistêmica, ou morte local seguida por fagocitose pelos macrófagos teciduais, mesmo que sejam recém recrutados. Após a fagocitose estar completa, a maioria dos macrófagos abandona o sítio inflamatório pela drenagem linfática e uma pequena população morre no local por apoptose. Caso esses passos sejam seguidos, a inflamação aguda será resolvida sem causar grandes danos ao tecido e com poucas possibilidades de complicações (SERHAN *et al.*, 2007). Um fenômeno celular a ser considerado para a resolução e homeostase é o retorno das células do local da

inflamação para o fenótipo não-inflamatório, sendo que a falha nessas vias levaria a uma inflamação persistente (BUCKLEY *et al.*, 2001; FILER *et al.*, 2006).

Assim como na fase inflamatória aguda, cada um dos eventos aqui descritos para a resolução do processo são altamente coordenados e estão sob rigoroso controle de mediadores químicos chamados de pró-resolução, onde há uma troca ativa de mediadores predominantes em exsudatos inflamatórios, sendo inicialmente gerados mediadores clássicos, como as prostaglandinas e leucotrienos, que ativam e amplificam os sinais cardinais da inflamação (dor, calor, rubor, edema). Com o decorrer do processo, as prostaglandinas E2 e D2 induzem a produção de enzimas que promovem gradualmente a síntese de mediadores que possuem atividade, tanto anti-inflamatória quanto pró-resolutiva, tendo entre eles as lipoxinas, resolvinas, protectinas, docosatrienos, neuroprotectinas e maresinas (SERHAN *et al.*, 2007, SERHAN *et al.*, 2008).

O AA é o precursor de mediadores lipídicos com características pró-inflamatórias, como já salientadas, mas também pode gerar mediadores lipídicos anti-inflamatórios, pela ação das Lipoxigenases (LOX), em especial pela 15-LOX, gerando as lipoxinas, que são compostos endógenos que constituem uma família de eicosanoides amplamente envolvidos em eventos celulares relacionados ao sistema imune. Possuem receptores próprios conhecidos como receptores ALX, nos quais se ligam com alta afinidade a LXA4 e seus derivados estruturais (CHIANG *et al.*, 2003). Além do sítio de lipídios, onde se liga a LXA4 e derivados, os receptores ALX também possuem um sítio para a interação de peptídeos derivado da anexina A1 (ANXA1), que é uma proteína induzida por glicocorticoide bastante abundante no citoplasma de PMNs, monócitos e macrófagos, compartilhando do mesmo receptor FPR2/ALX com as lipoxinas (PERRETI *et al.*, 2002). Em PMNs, os ALX são acoplados à proteína G, inibindo a produção do segundo mensageiro inositol-trifosfato (IP3) e consequentemente a mobilização de Ca^{2+} intracelular induzindo diferentes sinais, “stop signals”, limitando seu influxo para os sítios de inflamação (NATHAN, 2002; SERHAN *et al.*, 2004); já em monócitos, a ativação dos receptores ALX pelos LXA4 provoca o acúmulo de Ca^{2+} , gerando para os monócitos, “go signals”, já que de uma maneira não-flogística, ativa-os como fatores atraentes, mas sem estimular os eventos subsequentes como a geração de ânions superóxidos (MADDOX & SERHAN, 1996; MADDOX *et al.*, 1997).

Adicionalmente, as lipoxinas e seus análogos estáveis são potentes agonistas para macrófagos, estimulando a fagocitose de PMNs apoptóticos, um passo chave na resolução (McMAHON *et al.*, 2001). Já as resolvinas e os docosatrienos são potentes reguladores do infiltrado de PMNs (HONG *et al.*, 2003; SERHAN *et al.*, 2010; MADERNA & GODSON, 2009).

As lipoxinas possuem ação dupla por atuarem como anti-inflamatórios e pró-resolução, exibindo mecanismos de ação variados em modelos animais de doenças inflamatórias. No geral, as moléculas de pró-resolução estimulam e aceleram a resolução por diversos mecanismos, reduzindo as moléculas de adesão em leucócitos e endotélio, impedem a infiltração de neutrófilos e eosinófilos para o local da inflamação, reduzem a produção de superóxido e citocinas pelos neutrófilos, estimulam o recrutamento não flogístico de monócitos, ativam a fagocitose de microorganismos e de células apoptóticas por macrófagos, aumentam a saída de fagócitos do local inflamado pelo sistema linfático e estimulam a expressão de moléculas antimicrobianas (SERHAN *et al.*, 2010; MADERNA & GODSON, 2009).

Dentro das vias de pró-resolução, a ativação das vias apoptóticas são de suma importância, pois uma vez ativadas, induzem a morte das células infiltradas sem liberação do conteúdo catalítico das mesmas. A eficiência do *clearance* realizado pelos macrófagos deve acompanhar o aumento da morte celular por apoptose. Caso não haja esse equilíbrio, a consequência pode ser uma necrose secundária e dano tecidual (MADERNA *et al.*, 2005).

Sabe-se que a apoptose é caracterizada morfológicamente pela condensação da cromatina e da marginalização, fragmentação do DNA, formação do botão citoplasmático, encolhimento celular, e, finalmente, fragmentação celular em corpos contendo organelas ligadas à membrana, chamados corpos apoptóticos (WYLLIE *et al.*, 1980). Bioquimicamente, a apoptose é acompanhada pela externalização de fosfatidilserina na membrana plasmática, aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial, com subsequente liberação de proteínas que residem no espaço intermembranar, e a ativação das caspases (WYLLIE, 1985; COMPTON, 1992), sendo que este último efeito promove a desmontagem da membrana nuclear, a hipercondensação da cromatina e a degradação proteolítica das estruturas nucleares e citoplasmáticas (THORNBERRY & LAZEBNIK, 1998; HENGARTNER, 2000).

Além das caspases, as proteínas da família Bcl-2 apresentam uma importante função anti-apoptótica, que é regulada por multi-sítios de fosforilação envolvendo interações entre várias proteínas da família (HALDAR *et al.*, 1995; YAMAMOTO *et al.*, 1999). Níveis elevados de proteínas dessa família de genes bloqueiam a apoptose (Bcl-2 e Bcl-x) e outras promovem-na (Bax, Bad e Bak). Os genes anti-apoptóticos da família Bcl-2 são promotores da sobrevivência celular por inibirem a ocorrência da apoptose (VERMEULEN *et al.*, 2003). A proteína Bcl-2 está localizada na membrana mitocondrial externa de diferentes tipos celulares, como epitélios capazes de proliferação e morfogênese. Dentre suas atuações está o bloqueio da liberação de citocromo c pela mitocôndria após estímulo apoptogênico, impedindo, portanto, a ativação de caspases (YAMAMOTO *et al.*, 1999). O reconhecimento fagocítico de células que morrem por apoptose envolve um arranjo molecular complexo (LAUBER *et al.*, 2004). As células apoptóticas sinalizam que elas estão prontas para serem fagocitadas pela exibição de receptores de membrana, tais como a exposição de fosfatidilserina, e os fagócitos os reconhecem também pela exposição de um painel de receptores de membranas, como integrina α e β , CD36 e o receptor fosfatidilserina. (BYRNE & REEN, 2002). No entanto, para que haja reconhecimento, fagocitose de células apoptóticas, os macrófagos mudam o seu fenótipo influenciado pelo microambiente inflamatório. Assim, sabe-se que os macrófagos são células plásticas, que mudam de perfil inflamatório, conhecido como M1, para o perfil M2, anti-inflamatório mediante a estimulação correta (MANTOVANI *et al.*, 2004; OHRI *et al.*, 2006; MA *et al.*, 2010).

A via de ativação clássica dos macrófagos M1, induzida pelo LPS (lipopolissacarídeo de parede bacteriana) e interferon gama (IFN- γ), induzem a polarização para o fenótipo M1, inflamatório (MANTOVANI *et al.*, 2004; OHRI *et al.*, 2006; MA *et al.*, 2010). Células M1 exercem atividades anti-proliferativa e citotóxica, resultado em parte da sua capacidade de produzir (NO), espécies reativas de oxigênio (ERO) e citocinas pró-inflamatórias (TNF, IL-1 e IL-6) (GINDERACHTER *et al.*, 2006).

A via de ativação alternativa de macrófagos ou M2 é caracterizada pela ativação/modulação destes por meio das citocinas IL-4 e IL-13 (MANTOVANI *et al.*, 2004; OHRI *et al.*, 2006). Os macrófagos polarizados em M2 são, geralmente, orientados ao remodelamento e reparo tissular, resistência a parasitas, regulação da

imunidade e promoção tumoral (MANTOVANI, 2009). As células M2 secretam níveis reduzidos de citocinas inflamatórias e secretam grandes quantidades de moléculas anti-inflamatórias, como IL-10 e TGF-1 β . Exercem função imunossupressora seletiva e inibem a proliferação das células T2. São, ainda, produtores de fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), o qual é ativador da angiogênese, que favorece a cicatrização tecidual (OHRI *et al.*, 2006). Deste modo, um desequilíbrio na proporção de macrófagos ativados classicamente ou alternativamente em processos inflamatórios pode causar, ou pelo menos alterar a resolução da inflamação, o que pode afetar a evolução/resolução da inflamação (GORDON, 2003).

A fagocitose de células apoptóticas leva a expressão de moléculas co-inibidoras; liberação de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 e TGF-1 β , mediadores lipídicos de pró-resolução, como as lipoxinas, inibição da expressão da NO sintase induzível (iNOS) e estimula a expressão da arginase-1 em macrófagos murinos, resultando na supressão do (NO) (FADOK *et al.*, 1998; MCDONALD *et al.*, 1999; HUYNH *et al.*, 2005; FREIRE-DE-LIMA *et al.*, 2006; GIRKONTAITE *et al.*, 2007; BYSTROM *et al.*, 2008 ; GREGORY & POUND, 2010).

Além da fagocitose de leucócitos apoptóticos, os macrófagos também possuem a função de remover *debris* celulares, gerados durante a necrose celular ou do remodelamento tecidual, as *heat shock-proteins* (HSPs), histonas, DNA e outros nucleotídeos, e componentes da matriz extracelular clivadas por proteases celulares (ZHANG & MOSSER, 2008). Os receptores que medeiam estes processos de *clearance* homeostático incluem receptores *scavenger*, receptores fosfatidilserina, receptor de trombospondina, de integrinas e do sistema complemento. (TAYLOR *et al.*, 2005).

Do exposto acima, fica evidente que a reação inflamatória é uma resposta complexa, necessária à defesa do organismo, mas deve ser ajustada à intensidade do estímulo. A complexidade do processo está ligada à imensa diversidade de mediadores químicos que orquestram a plasticidade celular em cada microambiente nas diferentes fases do processo. Desequilíbrios nas fases da inflamação, causados por uma diversidade de fatores endógenos e exógenos, leva gênese de doenças. Desta forma, a compreensão dos mecanismos de controle da inflamação é primordial para determinação de alvos estratégicos para a terapêutica.

1.2. Ácido clorogênico (ACG)

Polifenóis são benéficos para a saúde humana, exercendo diversos efeitos biológicos, tais como a captura de radicais livres, quelação de metal, modulação da atividade enzimática e alteração das vias de transdução de sinal (STOCKER & KEANEY, 2004). Estudos epidemiológicos mostram relação entre o consumo de alimentos ricos em polifenóis e prevenção de doenças, tais como o cancro, doença cardíaca coronária e osteoporose (STEINMETZ & POTTER, 1996). Os polifenóis são principalmente classificados em ácidos fenólicos e flavonoides. A principal classe dos ácidos fenólicos compreende os ácidos hidroxicinâmicos, sendo o ácido clorogênico (ACG) o principal representante dos mesmos (GONTHIER *et al.*, 2003). O ACG é o nome vulgarmente atribuído a uma família de ésteres formados entre determinados ácidos transcinâmicos, como os ácidos cafeico, ferúlico e ácido quínico (LEPELLEY *et al.*, 2007).

O ACG é componente abundante em plantas, frutas e legumes (CLIFFORD, 1999), sendo o kiwi, a cereja, o mirtilo, a maçã e a ameixa, as frutas que contêm as maiores quantidades deste ácido, apresentando de 500mg a 2g por quilo da fruta seca (MACHEIX, 1990). Os grãos de café são uma importante fonte de ACG na dieta, sendo sua ingestão diária por consumidores de café alcança cerca de 1 g (KONISHI *et al.*, 2004). Um litro de café fornece de 500 a 800mg de ACG (OLTHOF *et al.*, 2001). Outra fonte muito importante da substância é a erva mate (*Ilex paraguariensis*) utilizada para o tradicional chimarrão, onde uma cuia (500 mL) contém em média 226 mg do composto (BASTOS *et al.*, 2005).

Os estudos *in vivo* e *in vitro* indicam que o ACG possui uma variedade de funções biológicas, incluindo as atividades antibacterianas, antioxidantes e anticancerígenas (ALMEIDA *et al.*, 2006; ASTI *et al.*, 2000; HUANG *et al.*, 1997; KONO *et al.*, 2008). O mecanismo antioxidante está relacionado à sua atividade redutora e *scavenger* direta, além de sua ação sobre a ativação de enzimas antioxidantes e da supressão da ativação de fatores de transcrição induzidas por (EROs) (ZHAO *et al.*, 2008; XU *et al.*, 2010). Os possíveis efeitos resultantes da ação antioxidante são a redução da oxidação de macromoléculas no organismo, como as lipoproteínas de baixa densidade (LDL) (NARDINI *et al.*, 1995; GORDON & WISHART, 2010), diminuição de inflamação, mesmo a subclínica (KEMPF *et al.*, 2010) e danos oxidativos ao DNA (SCHAEFER *et al.*, 2006; CICHOCKI *et al.*, 2010;

HOELZL *et al.*, 2010). Neste contexto, Kempf e colaboradores (2010) mostraram, a elevação da concentração sérica de ACG em humanos após o aumento do consumo monitorado de café, e que este aumento foi inversamente proporcional às concentrações de indicadores de inflamação e de aterosclerose encontrados no plasma. Desta forma, os autores confirmaram que o ACG é absorvido após ingestão oral (SPENCER *et al.*, 1999; FARAH *et al.*, 2008; STALMACH *et al.*, 2010; LANG *et al.*, 2013), e que este pode trazer benefícios contra o desenvolvimento de doenças de origem inflamatória, como alguns tipos de doenças cardiovasculares. Este dado foi ratificado recentemente por estudo com delineamento experimental semelhante, que sugere que o consumo de café em seres humanos protege contra oxidação do DNA, lipídeos e proteínas associadas a várias doenças, e que a proteção contra o estresse oxidativo pelo consumo de café pode ser benéfica (HOELZL *et al.*, 2010; LANG *et al.*, 2013).

O efeito hipotensor do ACG tem sido mostrado em estudos experimentais em modelos animais e em humanos (WATANABE *et al.*, 2006; BONITA *et al.*, 2007; CHEN, *et al.*, 2009) e que o efeito é dose-resposta, após tratamento oral ou intravenoso (SUZUKI *et al.*, 2002). O mesmo efeito, dose-dependente, foi mostrado em humanos (WATANABE *et al.*, 2006; YAMAGUCHI *et al.*, 2008), no entanto houve aumento significativo da concentração de homocisteína plasmática, que pode ser um fator de risco para doença coronariana (OLTHOF *et al.*, 2001). Os mecanismos envolvidos na ação hipotensora do ACG ainda não são totalmente conhecidos. Tem sido proposto que sua ação sequestradora de EROs ou a inibição das enzimas que geram estas espécies possam estar envolvidas no efeito, favorecendo a manutenção da concentração de (NO), um poderoso agente vasodilatador (KIM *et al.*, 2004; SUZUKI *et al.*, 2006). Outra hipótese é que o ACG tenha uma ação protetora sobre a óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), já que o efeito hipotensor em animais geneticamente hipertensos foi inibido quando tratados com inibidores da atividade desta enzima (SUZUKI *et al.*, 2006).

Além dos efeitos citados acima, alguns estudos têm demonstrado que há uma relação inversa entre a ingestão de café, que contém grandes quantidades de ACG e o desenvolvimento de diabetes tipo 2 e doenças cardiovasculares (ARION *et al.*, 1997; HEMMERLEE *et al.*, 1997; HERLING *et al.*, 1998; ANDRADE-CETTO & WIEDENFELD, 2001; JOHNSTON *et al.*, 2003; SALAZAR-MARTINEZ *et al.*, 2004; VAN DAM & HU, 2005; TUNNICLIFFE & SHEARER, 2008; ANDRADE-CETTO &

VÁZQUEZ, 2010; MONTAGNANA *et al.*, 2012; KANNO *et al.*, 2013; LANG *et al.*, 2013). Estudos experimentais têm mostrado que a associação do ACG ao tetra-hidrocurcumina aumenta efeito antidiabético do fármaco (KARTHIKESAN *et al.*, 2010a; 2010b; PARI *et al.*, 2010). Estes tratamentos, associados, diminuíram os níveis de glicose, de hemoglobina glicosilada, de glicose-6 fosfatase, de frutose 1,6 bi-fosfatase e aumentaram as concentrações de insulina, peptídeo C, hemoglobina e glicogênio em ratos tornados diabéticos pela administração de estreptozocina-nicotinamida (KARTHIKESAN *et al.*, 2010a; 2010b). O mesmo efeito também tem sido mostrado em humanos, uma vez que o consumo de café, está relacionado ao efeito antidiabético. Adicionalmente, a administração de 1g de ACG modificou a tolerância à glicose, observado pelos níveis menores de glicose e de insulina nos pacientes diabéticos (VAN DIJK *et al.*, 2009). Da mesma forma, que para os demais efeitos do ACG, sua potente ação antioxidante é um dos mecanismos envolvidos no efeito anti-diabético (KARTHIKESAN *et al.*, 2010a; 2010b; PARI *et al.*, 2010). No entanto, dados adicionais mostraram que o ACG induz, de modo irreversível, a hidrólise da glicose-6-fosfato translocase, enzima responsável pela regulação e síntese de glicose hepática livre, reduzindo, desta forma, a absorção de glicose no organismo (HEMMERLEE *et al.*, 1997; HERLING *et al.*, 1998; ANDRADE-CETTO & VÁZQUEZ, 2010). Em acréscimo, tem sido proposto que o ACG interfere, também, com a absorção da glicose pelas células epiteliais do intestino por alterar concentrações hormonais do intestino, como o peptídeo do tipo glucagon-1 (GLP-1), liberado em resposta à ingestão de nutrientes. É suposto que o ACG aumente a concentração de GLP-1, resultando em redução da velocidade do esvaziamento gástrico e em aumento da sensibilidade celular à insulina (JOHNSTON *et al.*, 2003).

Tem sido demonstrado que o ACG exerce papel preventivo no desenvolvimento do câncer de cólon humano (ZHENG *et al.*, 2001) e inibe a proliferação de células tumorais de diferentes linhagens (JIANG *et al.*, 2000; HSU *et al.*, 2006, TIAN *et al.*, 2013; RUOSHI *et al.*, 2013). O mecanismo exato deste efeito protetor também não está definido, mas há evidências que a inibição do crescimento celular, a desregulação do ciclo celular, bem como a indução de apoptose (TAN *et al.*, 2000; CHUNG *et al.*, 2001) sejam dependentes da interferência do ACG sobre o potencial redox destas células, devido ao seu potencial antioxidante (GRANADO-SERRANO *et al.*, 2007). Em conjunto, as ações antioxidantes do ACG afetam a regulação de fatores de transcrição e as cascatas de ativação intracelulares, como a

proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs) (WILLIAMS *et al.*, 2004), que culminam na citotoxicidade de células tumorais (GRANADO-SERRANO *et al.*, 2007).

O ACG é um agente anti-inflamatório em uma diversidade de estudos experimentais *in vivo* (KRAKAUER, 2002; DOS SANTOS *et al.*, 2006; OLMOS *et al.*, 2007; ZHANG *et al.*, 2010; MARRASSINI *et al.*, 2010) e, como já salientado anteriormente, as evidências sugerem este mesmo papel em humanos, mesmo em inflamações subclínicas (KEMPF *et al.*, 2010). DOS SANTOS *et al.* (2006) verificaram que o tratamento prévio de ratos com ACG inibe a dor inflamatória causada pela formalina, injetada na pata. Este mesmo efeito foi confirmado por YONATHAN *et al.* (2006) e MARRASINI *et al.* (2010) em diferentes modelos experimentais de inflamação em camundongos e ratos.

Além do efeito antinociceptivo sobre processos de origem inflamatória, o ACG inibe os efeitos vasculares e celulares do processo inflamatório. O tratamento prévio com ACG em ratos inibiu o edema de pata induzido pela carragenina (DOS SANTOS *et al.*, 2006) e o tratamento de camundongos com o extrato alcoólico de *Urtica urens*, que contém altas concentrações de ACG, reduziu o edema de pata também induzido pela carragenina (MARRASSINI *et al.*, 2010).

Diferentes modelos experimentais de inflamação mostram que a administração de ACG, quer seja prévia ou posteriormente à administração de agente flogístico, promove marcada diminuição no influxo leucocitário, em especial de neutrófilos, para focos de inflamação (DOS SANTOS *et al.*, 2006; OLMOS *et al.*, 2007; ZHANG *et al.*, 2010; XU *et al.*, 2010). Os mecanismos envolvidos nestas inibições estão relacionados, até o momento, à:

- 1) ação antioxidante do ACG, uma vez que uma série de trabalhos *in vitro* e *in vivo* mostra que o ACG inibe a formação de EROs (ZHAO *et al.*, 2008; CHANG *et al.*, 2009; ZHANG *et al.*, 2010);

- 2) ação do ACG sobre a secreção e produção de mediadores inflamatórios. Tem sido mostrado em uma diversidade de tipos celulares e em modelos experimentais *in vivo* que o tratamento com ACG inibe a secreção de citocinas e derivados do AA, além da produção de NO (KRAKAUER, 2002; ZHAO *et al.*, 2008; ZHANG *et al.*, 2010; HAN *et al.*, 2010);

- 3) ação do ACG sobre a expressão de moléculas de adesão envolvidas nos fenômenos de interação leucócito-endotélio, em especial sobre as moléculas expressas na célula endotelial. O tratamento *in vitro* com ACG, nas concentrações

de 25 e 50 μ M, inibiu a capacidade de adesão de monócitos na célula endotelial humana e suprimiu a síntese gênica de IL-1 β , VCAM-1, ICAM-1 e E-selectina (CHANG *et al.*, 2009);

4) a redução da transcrição gênica para receptores de LPS e fatores de transcrição. Em modelo de injúria hepática em camundongos ocasionada pela injeção do lipopolissacarídeo da parede bacteriana (LPS), a administração prévia de ACG reduziu a migração de neutrófilos e o número de áreas em necrose, além da redução das concentrações plasmáticas das enzimas alanina transaminase (ALT) e aspartato transaminase (AST), reconhecidas indicadoras de lesão das células hepáticas. A análise molecular das células hepáticas mostrou que o ACG inibiu a transcrição dos receptores *Toll-like* 4 e da fração p65 do fator de transcrição NFkappaB (NF κ B), além da inibição da fosforilação da mesma fração do fator de transcrição (XU *et al.*, 2010).

Apesar da demonstrada ação do ACG na inibição da indução da inflamação, há poucos relatos da ação deste ácido nos processos de resolução. Não há evidência alguma da ação do ACG sobre a apoptose de neutrófilos, nem mesmo sobre a atividade fagocítica de macrófagos.

2 OBJETIVO E JUSTIFICATIVA

Como já salientamos, o ACG exibe várias propriedades biológicas importantes, entre as quais exerce ações inibitórias sobre a instalação da inflamação. No entanto, os dados quanto à ação do ACG na resolução do processo inflamatório são escassos. Desta forma, este projeto teve por objetivo investigar o efeito do ACG sobre a apoptose de neutrófilos e fagocitose de neutrófilos apoptóticos por macrófagos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos Swiss machos, com peso médio de 30g. Os animais foram fornecidos pelo biotério do Instituto de Química e Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo e foram mantidos de acordo com as normas estabelecidas pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório – SBCAL e da lei nº 11.794, Sérgio Arouca de 2008, tornando as

condições compatíveis com os padrões internacionais na produção e experimentação de animais de laboratório.

Os animais foram previamente anestesiados, no procedimento invasivo, na proporção 2:1, com ketamina (Ceva Saúde Animal LTDA – Paulínia/SP - Brasil) e cloridrato de xilazina, (Ceva Saúde Animal LTDA – Paulínia/SP - Brasil), nas doses de 160mg/mL e 2mg/mL, respectivamente.

O projeto está de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de experimentação Animal (CONCEA), certificado pela comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – (Protocolo CEUA/FCF/439) e teve somente o título alterado como sugestão da banca de qualificação, mantendo todas as condições e protocolos idênticos aos aprovados.

3.2 Obtenção de neutrófilos

Para estimular o recrutamento de leucócitos para a cavidade abdominal, os animais receberam 5 mL de solução de glicogênio de ostra 1% (Sigma Aldrich), por via intraperitoneal (i.p.). Após quatro horas, os animais foram anestesiados e exsanguinados por secção da artéria carótida. Em seguida, 3 mL de PBS (Solução tamponada de fosfato) foram injetados na cavidade peritoneal, que foi massageada suavemente, a fim de se obter as células recrutadas, que foram retiradas com o auxílio de pipeta Pasteur. As células obtidas foram submetidas à centrifugação (600 g, 10 minutos, 4°C) e o *pellet* formado foi ressuspenso em 1 mL de PBS. A quantificação de neutrófilos foi realizada em câmara de Neubauer, após diluição de alíquota da suspensão em líquido de Turk (1:20).

3.3 Viabilidade de neutrófilos

A citometria de fluxo é uma técnica de análise automatizada pela qual uma única partícula pode ser caracterizada física e bioquimicamente, em meio líquido. A caracterização inclui o tamanho, granulosidade (ou complexidade interna) e intensidade da fluorescência. Todos esses parâmetros podem ser detectados simultaneamente, medidos, armazenados e analisados empregando-se programas de computação (BRENER, 2000).

Em nossos experimentos, a citometria de fluxo, para: 1) determinação da porcentagem de células em apoptose, pela quantificação da proteína Anexina-V,

empregando anticorpo anti Anexina V acoplado ao fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (FITC; 50 µg/mL; marca do anticorpo) diluído em tampão para anexina V (1:100) e, 2) para mensuração de células em necrose, pela marcação com iodeto de propídio (PI; Sigma Aldrich, USA), na concentração de 50 µg/mL (1:100). Os neutrófilos (1×10^6 /poço) foram incubados por 24 horas em placas de 24 poços em meio de cultura (RPMI 1640, Vitrocell, Campinas, SP, BRA) carenciado (contendo soro fetal bovino SFB; Gibco) (1%) ou não (5%), na presença ou não de ACG (Sigma, USA; 1, 10, 50 e 100 mM em PBS estéril), a 37°C, em estufa de CO₂ a 5 %. Findo este período de incubação, os neutrófilos foram considerados senescentes (em fase de início de apoptose) e apoptóticos e foram incubados por 15 minutos com os anticorpos anti-anexina V e PI, à temperatura ambiente, para posterior leitura das amostras.

Todos os ensaios foram realizados no citômetro de fluxo FACS Canto (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA) e analisados usando o software Flow Jo (versão 9.1).

3.4 Obtenção de macrófagos

Os macrófagos foram obtidos após injeção de 5 mL intraperitoneal de solução de tioglicolato de sódio 3%. Quatro dias após, os animais foram anestesiados e a cavidade peritoneal foi lavada com PBS estéril (5 mL). As células foram centrifugadas (600 g, 10 minutos, 4°C) e ressuspensas em meio RPMI 1640 (Vitrocell, Campinas, SP, BR). A suspensão celular (1×10^6 células/poço) foi incubada em placa de 24 poços, sobre lâminula de vidro redonda, por duas horas a 37°C com 5 % de CO₂, para a aderência dos macrófagos.

3.5 Ensaio de fagocitose

Após a adesão a lâminula de vidro, os macrófagos foram lavados três vezes com PBS estéril, a fim de se retirar as células não aderidas e, em seguida, foram tratados com ACG (1, 10, 50 e 100 mM). Após 1 hora do tratamento, 1×10^6 neutrófilos senescentes foram adicionados sobre as lâminas com os macrófagos e, após 2 horas, as lâminulas foram lavadas 1 vez com PBS para retirada do excesso de neutrófilos senescentes. As lâminas foram coradas com solução de May Grunwald-Giemsa (Sigma Aldrich), modificada (ROSENFELD, 1947).

As lamínulas foram coladas inversamente em lâminas de vidro com Bálsamo do Canadá (Synth, Diadema, SP, BR) e a leitura das mesmas foi feita em microscópio óptico com objetiva de imersão (aumento de 100 vezes). Foram quantificadas 100 células por lâminas e o resultado apresentado como % de macrófagos que fagocitaram 1 ou 2 neutrófilos. Os sobrenadantes obtidos foram armazenados em freezer -80°C para posterior quantificação de mediadores inflamatórios.

3.6 Quantificação de mediadores inflamatórios

As citocinas IL-10 e TNF α foram quantificadas nos sobrenadantes obtidos do ensaio de fagocitose (item 3.5) por ensaio imunoenzimático, de acordo as instruções do fabricante (catálogo número 555252 e 887324, respectivamente, BD Biosciences).

3.7. Expressão de CD36 e MHC classe II

O CD36 é uma proteína transmembrânica com peso molécula de 53kDa contendo um largo domínio hidrofóbico extracelular, o que permite que o seu domínio imunodominante aos ácidos graxos, oxLDL e também células apoptóticas (SILVERSTEIN & FEBBRAIO, 2009).

A molécula MHC II (Complexo Principal de Histocompatibilidade) é uma glicoproteína de superfície de importância central na indução de respostas de linfócitos T, estando envolvida com a função de apresentação de antígeno dos macrófagos, além de caracterizar seu estado de ativação (PAINTER & STERN, 2012).

A expressão do CD36 e do MHCII foi feita em macrófagos fagocíticos tratados ou não com ACG. Para tanto, as células aderidas em placa de 24 poços, tratadas ou não, por uma hora, e incubadas com neutrófilos senescentes por duas horas, foram marcadas com FITC (CD36) e PE (MHCII) e analisada a expressão da marcação por citometria de fluxo.

3.8 Análise estatística

Os resultados obtidos foram apresentados como média $\pm$ e.p.m. e foram analisados estatisticamente pelo Teste “t” de “Student” ou pela Análise de Variância com comparações múltiplas (ANOVA), seguido do teste de Tukey-Kramer, quando

necessário. Para tanto, foi utilizado o programa estatístico Graphpad Prisma 5.0. Os valores obtidos foram considerados significativos quando $P < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1. Efeitos do ACG sobre a indução de apoptose em neutrófilos

Os resultados apresentados na Figura 1 mostram que o tratamento com ACG aumentou significativamente a porcentagem de neutrófilos em apoptose, quando comparado com neutrófilos incubados somente com meios de cultura (basal). A apoptose não foi acompanhada por necrose. É interessante salientar que o efeito não foi concentração-dependente, sendo que o tratamento com 1mM, menor concentração empregada, acarretou apoptose em cerca de 80% das células, enquanto as concentrações de 10 ou 50 mM causaram cerca de 60% de morte celular por apoptose.

Figura 1. Efeitos do tratamento com ACG sobre a porcentagem de neutrófilos apoptóticos e necróticos. Dados são expressos como média $\pm$ e.p.m. de neutrófilos obtidos de oito animais por grupo. Análise estatística realizada utilizando ANOVA seguida dos pós-teste Tukey. * $P < 0,05$ em comparação ao basal (células incubadas com veículo).

4.2. Efeitos do ACG sobre a fagocitose de neutrófilos apoptóticos por macrófagos

Os macrófagos incubados com as diferentes concentrações de ACG apresentaram aumento significativo na atividade fagocítica de neutrófilos apoptóticos, quando comparado a macrófagos incubados somente com meio de

cultura (basal). O efeito do ACG não foi concentração dependente. As concentrações de 1 a 50 mM de ACG elevaram de maneira equivalente a fagocitose de neutrófilos apoptóticos, que foi insignificamente maior que a observada em macrófagos incubados somente com meio de cultura. Diferentemente, o tratamento com 100 mM de ACG não elevou a taxa de fagocitose em relação ao observado em macrófagos tratados com meio de cultura (Figura 2). Adicionalmente, a análise mais acurada das lâminas de fagocitose mostrou que o tratamento com ACG causou também aumento no número de macrófagos que fagocitaram pelo menos 02 neutrófilos apoptóticos. Ainda, observou-se neutrófilos com morfologia alterada no interior do vacúolo fagocítico (Figura 3, 4A=basal, B=1mM, C=10mM, D=50mM, E=100mM).

Figura 2. Efeitos do tratamento com ACG sobre a fagocitose de neutrófilos apoptóticos por macrófagos. Dados são expressos como média $\pm$ e.p.m. de macrófagos obtidos de oito animais por grupo. Análise estatística realizada utilizando ANOVA seguida dos pós-teste Tukey. * $P < 0,05$ em comparação ao basal.

Figura 3. Efeito do tratamento com ACG sobre o número de neutrófilos fagocitados por macrófagos. Dados são expressos como a média $\pm$ e.p.m. de macrófagos obtidos oito animais por grupo. Análise estatística realizada utilizando ANOVA seguida dos pós-teste Tukey. * $P < 0,05$ em comparação ao basal.

Figura 4. Análise quantitativa do efeito do ACG sobre a capacidade de macrófagos fagocitarem neutrófilos senescentes. Contagem de 100 células por quadrante quarteado da lâmina que foi incubada com meio de cultura (A), 1mM de ACG (B), 10mM de ACG (C), 50mM de ACG (D) e 100 mM de ACG (E). Lâmina representativa de macrófagos obtidos de oito animais.

4.3. Efeitos do ACG sobre a secreção de mediadores químicos

O sobrenadante de macrófagos incubados com neutrófilos apoptóticos foram empregados para quantificação de citocinas com papel pro ou anti-inflamatório. Os resultados obtidos mostraram que o tratamento com ACG inibiu a capacidade de macrófagos secretarem TNF-alfa (Figura 5) e não afetou a produção de IL-10 (Figura 6).

Figura 5. Efeitos do tratamento com ACG sobre a secreção de TNF- α por macrófagos em condições basais e tratadas com ACG. Dados são expressos

como média $\pm$ e.p.m. de macrófagos obtidos de oito animais por grupo. Análise estatística realizada utilizando ANOVA seguida dos pós-teste Tukey. * $P < 0,05$ em comparação ao basal.

Figura 6. Efeitos do tratamento com ACG sobre a secreção de IL-10 por macrófagos em condições basais e tratadas com ACG. Dados são expressos como média $\pm$ e.p.m. de macrófagos obtidos de oito animais por grupo. Análise estatística realizada utilizando ANOVA seguida dos pós-teste Tukey.

4.4. Efeitos do ACG sobre a expressão de CD36 e MHCII

A análise de citometria de fluxo mostrou que os tratamentos com ACG não alterou a expressão de CD36 e de MHC de classe II em macrófagos em processo de fagocitose de neutrófilos apoptóticos (Figuras 7 e 8).

Figura 7. Efeitos do tratamento com ACG sobre a expressão de CD36 e MHCII por macrófagos em fagocitose de neutrófilos apoptóticos. Dados são expressos como média $\pm$ e.p.m. de macrófagos obtidos quatro animais por grupo que fagocitaram os neutrófilos durante o período de 1h. Análise estatística realizada utilizando ANOVA de duas vias seguida dos pós-teste Tukey.

Figura 8. *Dot plot* ilustrativo dos efeitos do tratamento com ACG sobre a expressão de CD36 por macrófagos em fagocitose de neutrófilos apoptóticos. As imagens representam a % de macrófagos marcados com CD36 após 1h de fagocitose de neutrófilos apoptóticos.

DISCUSSÃO

Os resultados aqui obtidos mostram que o tratamento com ACG é capaz de induzir a apoptose de neutrófilos e a fagocitose destes por macrófagos peritoneais. Estes resultados são inéditos e mostram que o ACG pode ser indutor dos mecanismos de resolução da inflamação.

Estudos experimentais prévios mostram que o tratamento com ACG inibe funções inflamatórias de neutrófilos envolvidos na secreção e produção de mediadores pró-inflamatórios, e nos eventos de adesão e locomoção para o foco de lesão (IGNATOWICZ *et al.*, 2003; OLMOS *et al.*, 2007; ZHANG *et al.*, 2010; HEBEDA *et al.*, 2011; RUIFENG *et al.*, 2014). Estas ações podem ser responsáveis, pelo menos em parte, pela redução de edema e influxo leucocitário, bem como pela analgesia, observadas em casos de tratamentos *in vivo* com o ACG em diferentes modelos experimentais de doenças associadas à inflamação (DOS SANTOS *et al.*, 2006; OLMOS *et al.*, 2007; ZHANG *et al.*, 2010; YUN *et al.*, 2012; LEE *et al.*, 2013; BAGDAS *et al.*, 2013; RUIFENG *et al.*, 2014; XU *et al.*, 2014). No presente trabalho ampliamos os possíveis mecanismos envolvidos no efeito anti-inflamatório do ACG, uma vez que o tratamento com ácido induziu a apoptose de neutrófilos. Como já salientado na Introdução, a morte programada de neutrófilos no foco de inflamação é um dos mecanismos para a resolução eficiente do processo. Neste contexto, estudo simultâneo do nosso grupo de pesquisa corrobora o efeito do ACG na eferocitose *in vivo*, pois tem mostrado que a administração sistêmica de ACG favorece o processo de cicatrização da úlcera gástrica provocada pelo ácido acético em camundongos (DINIZ *et al.*, 2013).

A literatura mostra que o ACG induz a apoptose em células diferentes de linhagens leucêmicas, como a U937, K562 e HL-60, sendo que o mecanismo proposto é a ativação das vias das caspases e mitocondriais (PUANGPRAPHANT *et al.*, 2011; YANG *et al.*, 2012; LIU *et al.*, 2013). Diferentemente, mostrou-se que o ACG inibe a apoptose de neuroblastoma induzida pela metilglicosilação, que é dependente de alteração do potencial de membrana mitocondrial, ativação de caspase 3 e da clivagem da ADP ribose-polimerase (HUANG *et al.*, 2008). Neste mesmo sentido, uma diversidade de trabalhos na literatura mostra que o ACG inibe a apoptose de diferentes células não neoplásicas submetidas a estados de estresse. Assim, mostrou-se que o ACG reduz a apoptose de células da retina causada por hipóxia, por evitar a super-expressão de BaCl e caspase 3 (JANG *et al.*, 2013); inibe a apoptose de células PC-12 ou cultura primárias de neurônios causadas pelo peróxido de hidrogênio (KIM *et al.*, 2012; PARK, 2013) ou pelo metilmercúrio (LI *et al.*, 2008), sendo que em ambos os casos houve redução de ativação de caspases;

e também inibiu a apoptose de hepatócitos causada pelo acetaminofen, por inibir as vias ativadas pela caspases 3 e 7 (JI *et al.*, 2013).

Com base nestas informações, pode-se supor que o ACG protege o organismo por interferir com diferentes vias sobre a apoptose, pois, tanto indução em células neoplásicas, como inibição do processo em células de origem não neoplásica submetidas ao estresse tem sido demonstradas. No entanto, não há dados na literatura que mostrem o papel do ACG na indução de apoptose de neutrófilos, e ensaios futuros são necessários para esclarecer os mecanismos do ACG sobre este fenômeno. Este parece ser um desafio importante para ser conduzido, já que a apoptose de neutrófilos é dependente da geração de ROS (FULLERTON *et al.*, 2013; ORTEGA-GOMEZ *et al.*, 2013; GABELLONI *et al.*, 2013) e a maioria dos efeitos anti-apoptótica do ACG parece ser devido à sua ação antioxidante (LI *et al.*, 2008; JI *et al.*, 2013; JANG *et al.*, 2013; PARKS *et al.*, 2013). Por outro lado, a indução da apoptose em células cancerosas pela ACG é mediado pela indução da geração de ROS (RAKSHIT *et al.*, 2010).

Vale ressaltar que o tratamento com ACG não causou necrose, o que é relevante para o possível efeito benéfico do ACG sobre a resolução do processo inflamatório. Como já descrito na Introdução, a necrose não é um processo benéfico de morte celular para o retorno da homeostasia, uma vez que neutrófilos em necrose secretam e liberam uma série de agentes químicos que podem ser lesivos ao tecido do hospedeiro (CURTIN *et al.*, 2002; MADERNA *et al.*, 2005).

Adicionalmente, o ACG induziu a fagocitose dos neutrófilos apoptóticos por macrófagos peritoneais. Tem sido demonstrado que o tratamento *in vitro* com ACG inibe a expressão das enzimas COX-2 e iNOS, a secreção de citocinas pró-inflamatórias e adesão de linhagem de macrófagos RAW 264.7, via inibição do fator de transcrição NF κ B (SHAN *et al.*, 2009; HAN *et al.*, 2010; HWANG *et al.*, 2014). No entanto, a ação do ácido sobre a fagocitose de neutrófilos apoptóticos é mostrado aqui pela primeira vez.

Não foi possível, neste trabalho, elucidar o mecanismo de ação do ACG. O possível aumento sobre a expressão de CD36 não foi observado em macrófagos tratados pelo ACG. O CD36 é uma proteína transmembrânica que pertence à família de receptores *scavengers* e é expressa em uma diversidade de células, entre os quais os macrófagos no processo de fagocitose. A interação do CD36 e células apoptóticas parece ser mediada por trombospondina-1 e ao receptor de vitronectina

(SAVILL *et al.*, 1992). Ainda, o CD36 parece ser o mecanismo importante na fagocitose mediada pelo PPAR (BERRY *et al.*, 2007). O papel fundamental do CD36 tem sido observado na fagocitose de neutrófilos apoptóticos em condições de hipóxia e na reação inflamatória pulmonar (ORTIZ-MASIA *et al.*, 2012; PARKS *et al.*, 2013). Da mesma forma, não há relatos da ação do ACG sobre a expressão de CD36. Nossas hipóteses, que conduzirão as etapas seguintes de investigação do laboratório, visarão investigar se o ACG estimula a expressão de TIM-4, que reconhecidamente é ligante para fosfatidilserina, fazendo ponte importante entre neutrófilos apoptóticos e macrófagos (NURTANIO & YANG, 2011; NISHI *et al.*, 2014); se o ACG induz a expressão dos receptores de PPAR, um receptor nuclear que atua como fator de transcrição e possui inúmeros efeitos anti-inflamatórios, entre os quais a fagocitose de neutrófilos apoptóticos (PARKS *et al.*, 2013); se o ACG induz a expressão de anexina A1, uma proteína induzida por glicocorticoides endógenos e que inibe o recrutamento de neutrófilos para o foco de lesão e estimula a apoptose de neutrófilos e sua subsequente fagocitose por macrófagos (ORTEGA-GOMEZ *et al.*, 2013). As duas últimas hipóteses são reforçadas pelas habilidades dos agonistas PPAR e da anexina favorecerem a apoptose de neutrófilos (STANDIFORD *et al.*, 2005; ORTEGA-GOMEZ *et al.*, 2013), o que também foi observado pelo ACG.

Interessantemente, tanto os efeitos do ACG sobre a indução de apoptose de neutrófilos e a fagocitose destes pelos macrófagos não foram concentração-dependente e foram observadas com concentrações de 1 mM. De fato, trabalho recente mostra de doses elevadas de ACG *in vivo* induz a resposta inflamatória, enquanto que doses menores reduzem o processo, e que a controvérsia dos efeitos é decorrente de o desequilíbrio entre a inibição e indução da geração de ROS pelas doses baixas e altas, respectivamente (DU *et al.*, 2013). Desta forma, é nosso objetivo futuro quantificar as ROS nos macrófagos e neutrófilos tratados com as diferentes concentrações de ACG e investigar se os efeitos são mantidos com concentrações menores que 1 mM.

A análise do perfil de secreção de citocinas é uma estratégia experimental relevante para caracterizar o fenótipo de células envolvidas no processo inflamatório, e para elucidar o mecanismo de ação de agentes flogísticos e terapêuticos. Desta forma, neste trabalho foi avaliada a ação do ACG sobre a secreção de TNF-alfa e de IL-10.

O TNF- α é um importante mediador da resposta inflamatória aguda, recrutando neutrófilos e monócitos para o local da inflamação através de diversos mecanismos: induz no endotélio a expressão de moléculas de adesão para neutrófilos, monócitos e linfócitos, principalmente selectinas e integrinas; estimula as células endoteliais a secretarem quimiocinas que acentuam a afinidade entre as integrinas expressas e seus ligantes leucocitários. Concentrações elevadas de TNF- α estimulam a produção de IL-6, que por sua vez induz a liberação de proteínas de fase aguda de inflamação pelos hepatócitos (MAKIS *et al.*, 2000; ABBAS *et al.*, 2012; BILATE, 2007). Desta forma, o TNF- α é uma citocina secretada por macrófagos com fenótipo M1, e sua secreção é reduzida por macrófagos M2 (BILATE, 2007). Os dados aqui obtidos corroboram a atividade do ACG em aumentar a fagocitose de neutrófilos apoptóticos, e que possam levar a polarização de macrófagos para o fenótipo M2. Neste sentido, experimentos futuros investigarão se o ACG induz a polarização de macrófagos, pela incubação de monócitos da linhagem THP-1 por 4 dias com o ACG e pela subsequente mensuração dos receptores de membrana para M1 ou M2 por citometria de fluxo, além da quantificação de citocinas.

O IL-10 é um potente inibidor de macrófagos e células dendríticas e, portanto, está envolvida no controle das respostas imunes natural e mediada por células. Sua principal função é inibir a síntese de outras citocinas, como o IFN- γ , IL-2, IL-12 e TNF- α . Inibe, ainda, a proliferação e a função de células do perfil Th1, favorecendo, então, o desenvolvimento de respostas do perfil Th2 (MAKIS *et al.*, 2000; ABBAS *et al.*, 2012; BILATE, 2007). Sabe-se que a IL-10 é antagonista fisiológico de diversas citocinas inflamatórias, tais como TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-8 (MARQUES *et al.*, 2007), e além de inibir a produção dessas citocinas, também pode suprimir a inflamação por vários outros mecanismos imune-regulatórios, tais como, redução da expressão de HLA classe II (Antígenos leucocitários humanos), por reprimir efeitos biológicos do (IFN- γ ; das citocinas produzidas por neutrófilos e células *Natural Killer* (NK) e atenuar a expressão dos receptores do fator de necrose tumoral na circulação sistêmica e inibir a atividade das células apresentadoras de antígenos (KANG & ALLEN, 2005). Ademais, a IL-10 é secretada por macrófagos M2 na resolução da inflamação. Desta forma, a não alteração dos níveis de IL-10 não corroboram nossa hipótese de que o ACG possa levar a polarização de macrófagos para o fenótipo

anti-inflamatório. No entanto, os experimentos adicionais, citados acima poderão elucidar melhor este resultado.

Em conjunto, os resultados aqui mostraram que o tratamento com ACG aumentou o número de neutrófilos apoptóticos; aumentou a capacidade dos de macrófagos fagocitarem neutrófilos apoptóticos; reduziu a secreção do tumor de necrose tumoral (TNF- α) e não alterou a secreção de interleucina-10 e não interferiu com a expressão de MHC-II e com CD36. Assim, pela primeira vez é mostrado que o ACG pode controlar a resolução da inflamação interferindo com eventos do processo em neutrófilos e macrófagos.

5 CONCLUSÕES

As conclusões abaixo descritas foram obtidas em neutrófilos e macrófagos peritoneais de camundongos Swiss, machos, adultos tratados *in vitro* com ACG. Assim, concluímos que;

- o ACG, induz a apoptose de neutrófilos, mas não induz a necrose;
- o ACG, induz a fagocitose de neutrófilos em apoptose por macrófagos;
- o ACG reduz a secreção de TNF- α por macrófagos em fagocitose;
- o ACG não altera a secreção de IL-10 por macrófagos em fagocitose;
- o ACG não altera a expressão de MHC de classe II ou de CD36 por macrófagos em fagocitose.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. H. I. V. **Imunologia celular e molecular**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.

ABUMRAD, N. A., EL-MAGHRABI, M. R., AMRI, E. Z., LOPEZ, E. & GRIMALDI, P. A. **Cloning of a rat adipocyte membrane protein implicated in binding or transport of long-chain fatty acids that is induced during preadipocyte differentiation. Homology with human CD36.** *J Biol Chem* 268, 17665-8 (1993).

ADEREM, A. **Phagocytosis and the Inflammatory Response.** *The Journal of Infectious Diseases*, v. 187 (Suppl. 2), p. S340-S345, 2003.

AGGARWAL B B (2004). **Nuclear factor-kappaB: the enemy within.** *Cancer Cell*, 6: 203-208.

ALMEIDA, A A, FARAH A, SILVA D A, NUNAN E A, GLÓRIA M B. **Antibacterial activity of coffee extracts and selected coffee chemical compounds against enterobacteria.** *J Agric Food Chem*. 2006 Nov 15;54(23):8738-43.

ANDRADE-CETTO, A. & WIEDENFELD, H. **Hypoglycemic effect of *Cecropia obtusifolia* on streptozotocin diabetic rats.** *J. Ethnopharmacol*, Mexico, v.78, n.2-3, p.145-149, 2001.

ANDRADE-CETTO, A. & VÁZQUEZ, R.C. **Gluconeogenesis inhibition and phytochemical composition of two *Cecropia* species,** *J. Ethnopharmacol*, v.130, n.1, p.93-97, 2010.

ARION, W.J.; CANFIELD, W.K.; RAMOS, F.C.; SCHINDLER, P.W.; BURGER, H.J.; HEMMERLE, H.; SCHUBERT, G.; BELOW, P.; HERLING, A.W. **Chlorogenic acid and hydroxynitrobenzaldehyde: new inhibitors of hepatic glucose 6-phosphatase.** *Arch. Biochem. Biophys.*, New York, v.339, n.2, p.315-322, 1997.

ASTI C, RUGGIERI V, PORZIO S, CHIUSAROLI R, MELILLO G, CASELLI G F. **Lipopolysaccharide-induced lung injury in mice. I. Concomitant evaluation of inflammatory cells and haemorrhagic lung damage.** *Pulm Pharmacol Ther*. 2000;13(2):61-9.

ATTILA MÓCSAI. **Diverse novel functions of neutrophils in immunity, inflammation, and beyond** *J Exp Med*. 2013 July 1; 210(7): 1283–1299.

BABIOR, B.M. **Oxygen dependent microbial killing by phagocytes.** *New England Journal Medicine*, v.298, p.659-68, 1978.

BAGDAS D, CINKILIC N, OZBOLUK HY, OZYIGIT MO, GURUN MS. **Antihyperalgesic activity of chlorogenic acid in experimental neuropathic pain.** *J Nat Med*. 2013 Oct;67(4):698-704.

BALKWILL F, MANTOVANI A. **Inflammation and cancer: back to Virchow?** *Lancet* 2001 Feb 17;357(9255):539-45.

BANNENBERG GL, CHIANG N, ARIEL A, ARITA M, TJONAHEN E, GOTLINGER KH, et al. **Molecular circuits of resolution: formation and actions of resolvins and protectins.** *J Immunol.*2005;174:4345–4355.

BASTOS DHM, FORNARI AC, QUEIROZ YS, SOARES RAM, TORRES EAFS (2005). **The chlorogenic acid and caffeine content of yerba maté (*Ilex paraguariensis*) beverages.** *Acta Farmaceutica Bonaerense* 24, 91-95.

BERG, A. H.; SCHERER, P. E. **Adipose tissue, inflammation and cardiovascular disease.** *Circulation Research.* v. 96, p. 939-949, 2005.

BERRY A, BALARD P, COSTE A, OLAGNIER D, LAGANE C, et al. (2007) **IL-13 induces expression of CD36 in human monocytes through PPARgamma activation.** *Eur J Immunol* 37: 1642–1652.

BILATE, A. M. B. **Inflamação, citocinas, proteínas de fase aguda e implicações terapêuticas.** *Temas de Reumatologia Clínica*, v.8, n.2, p.47-51, 2007.

BISHOP JM (1991). **Molecular themes in oncogenesis.** *Cell* 64:235-248.

BLISS C M, GOLENBOCK D T, KEATES S, LINEVSKY J K, KELLY C P. **Helicobacter pylorilipopolysaccharide binds to CD14 and stimulates release of interleukin-8, epithelial neutrophil-activating peptide 78 and monocyte chemotactic protein 1 by human monocytes.** *Infect. Immun.* 1998; 66: 5357–63.

BONDER, C. S.; DICKENSHEETS, H. L.; FINLAY-JONES, J. J.; DONNELLY, R. P.; HART, P. H. **Involvement of the IL-2 receptor gamma-chain (gammac) in the control by IL-4 of human monocyte and macrophage proinflammatory mediator production.** *J Immunol*, 160(8):4048-56, 1998.

BONESI, M. R, MENICHINI F. **Protective effect of Hypericum calabricum Sprengel on oxidative damage and its inhibition of nitric oxide in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages.** *Biol Res.* 2011;44(3):213-8.

BONITA, J.S.; MANDARANO, M.; SHUTA, D.; VINSON, J. **Coffee and cardiovascular disease: In vitro, cellular, animal and human studies.** *Pharmacological Research, Scranton*, v.55, p. 187-198, 2007.

BOURAOUI Z, BANNI M, GHEDIRA J, CLERANDEAU C, GUERBEJ H, NARBONNE J F, BOUSSETTA H, 2008. **Acute effects of cadmium on liver phase I and phase II enzymes and metallothionein accumulation on sea bream Sparus aurata.** *Fish Physiology and Biochemistry*, 34: 201–207.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução. **Determina a publicação da Lista de Registro Simplificado de Fitoterápicos.** Diário Oficial da União. Resolução nº.89, 16 de março de 2004. Disponível em:<<http://e->

legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=102418word=> Acesso em 05 de abril de 2014.

BREMMER MA, BEEKMAN AT, DEEG DJ, PENNINX BW, DIK MG, HACK CE, HOOGENDIJK WJ. **Inflammatory markers in late-life depression: results from a population-based study.** *J Affect Disord.* 2008;106:249–255.

BROWN, S. B., J. SAVILL. 1999. **Phagocytosis triggers macrophage release of Fas ligand and induces apoptosis of bystander leukocytes.** *J. Immunol.* 162: 480.

BUCKLEY KA, WAGSTAFF SC, MCKAY G, GAW A, HIPSKIND RA, BILBE G *et al.* (2001) **Parathyroid hormone potentiates nucleotide-induced $[Ca^{2+}]_i$ release in rat osteoblasts independently of G_q activation or cyclic monophosphate accumulation: a mechanism for localizing systemic responses in bone.** *J Biol Chem* 276:9565–9571.

BYRNE A, REEN DJ. **Lipopolysaccharide induces rapid production of IL-10 by monocytes in the presence of apoptotic neutrophils.** *J Immunol.* 2002;168(4):1968–1997.

BYSTROM, J., EVANS, I., NEWSON, J., STABLES, M., TOOR, I., VAN ROOIJEN, N. (2008). **Resolution-phase macrophages possess a unique inflammatory phenotype that is controlled by cAMP.** *Blood* 112, 4117–4127.

CHANG, W.; CHEN, C.; LEE, M.; CHANG, T.; YU, Y. **Chlorogenic acid attenuates adhesion molecules upregulation in IL-1 β -treated endothelial cells.** *Eur J Nutr*, Tainan-Taiwan, 2009.

CHEN, Z.; PENG, C.; JIAO, R.; WONG, Y. M.; YANG, N.; HUANG, Y. **Anti-hypertensive Nutraceuticals and Functional Foods.** *J. Agric. Food Chem.* Hong kong, v. 57, p 4485-4499, 2009.

CHEUNG, D.L.; HART, P.H.; VITTI, G.F.; WHITTY, G.A.; HAMILTON, J.A. **Contrasting effects of interferon-gamma and interleukin-4 on the interleukin-6 activity of stimulated human monocytes.** *Immunology*, 71(1):70-5, 1990.

CHIANG N, TAKANO T, ARITA M, WATANABE S, AND SERHAN CN (2003) **A novel rat lipoxin A4 receptor that is conserved in structure and function.** *Br J Pharmacol* 139:89 –98.

CHUNG LY, CHEUNG TC, KONG SK, FUNG KP, CHOY YM, CHAN ZY, KWOK TT. **Induction of apoptosis by green tea catechins in human prostate cancer DU145 cells.** *Life Sci.* 2001 Jan 26;68(10):1207-14.

CICHOKI, M.; BLUMCZYNSKA, J.; BAER-DUBOWSKA, W. **Naturally occurring phenolic acids inhibit 12-O-tetradecanoylphorbol-12-acetate induced NF-kappaB, iNOS and COX-2 activation in mouse epidermis.** *Toxicology, Poznan*, v.268, n. 1-2, p.118-124, 2009.

CLIFFORD, M. N. **Chlorogenic acids and other cinnamates-nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism.** *J. Sci. Food Agric.*, v.80, n.7, p. 1033-1043, 1999.

COMPTON MM (1992). **A biochemical hallmark of apoptosis: inter-nucleosomal degradation of the genome.** *Cancer Metastasis Rev* 11:105–119.

CURTIN, J. F.; DONOVAN, M.; COTTER, T. G. **Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis.** *J. Immunol. Methods.*, n. 265, p. 49-72, 2002.

DEBORAH J. STEARNS-KUROSAWA, MARCIN F. OSUCHOWSKI, CATHERINE VALENTINE, SHINICHIRO KUROSAWA, DANIEL G. REMICK. **The Pathogenesis of Sepsis.** *Annu Rev Pathol.* Author manuscript; available in PMC 2013 June 17.; 6: 19–48.

DELUDE R L, SAVEDRA R, ZHAO H. **CD14 enhances cellular responses to endotoxin without imparting ligand-specific recognition.** *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 1995; 92: 9288–92.

DEON D, AHMED S, TAI K, SCALETTA N, HERRERO C , LEE I, KRAUSE A, IVASHKIV L. **Cross-talk between IL-1 and IL-6 signaling pathways in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts.** *J Immunol.* 2001 Nov 1;167(9):5395-403.

DESJARDINS M, HUBER L. A, PARTON R. G., GRIFTHS G. 1994. **Biogenesis of phagolysosomes proceeds through a sequential series of interactions with the endocytic apparatus.** *J. Cell Biol.* 124:677–88.

DESREUNAUX P, BRANDT E, GAMBIEZ L, EMILIE D, GEBOES K, KLEIN O, ECTORS N, CORTOT A, CAPRON M, COLOMBEL JF. **Distinct cytokine patterns in early and chronic ileal lesions of Crohn's disease.** *Gastroenterology.* 1997;113:118–126.

DEVITT A, MOFFATT O D, RAYKUNDALIA C, CAPRA J D, SIMMONS D L, GREGORY C D. **Human CD14 mediates recognition and phagocytosis of apoptotic cells.** *Nature* 1998; 392: 505–509.

DINIZ, J. F. **Avaliação da atividade do ácido clorogênico em úlcera gástrica induzida pelo ácido acético.** Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Farmácia) - Centro Universitário das Faculdades Metropolitanas Unidas. São Paulo, 2013.

DOS SANTOS, M.D.; ALMEIDA, M.C.; LOPES, N.P.; DE SOUZA, G.E.P. **Evaluation of the Anti-inflammatory, Analgesic and Antipyretic Activities of the Natural Polyphenol Chlorogenic Acid.** *Biol. Pharm. Bull.*, Ribeirão Preto, v. 29, n. 11, p. 2236-2240, 2006.

DU WY, CHANG C, ZHANG Y, LIU YY, SUN K, WANG CS, WANG MX, LIU Y, WANG F, FAN JY, LI PT, HAN JY. **High-dose chlorogenic acid induces inflammation reactions and oxidative stress injury in rats without implication of mast cell degranulation.** *J Ethnopharmacol.* 2013 May 2;147(1):74-83.

EL KEBIR D. & FILEP G. J. **Modulation of Neutrophil Apoptosis and the Resolution of Inflammation through β_2 Integrins.** *Front Immunol.* 2013; 4: 60.

FADOK, V., BRATTON, A., KONOVAL A., FREED. P. W., WESTCOTT, J. Y., +HENSON, P. M. **Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF- β , PGE2 and PAF.** *J. Clin. Invest.* 101, 890–898 (1998).

FADOK *et al.*, 1998a: FADOK, V. A., BRATTON, D. L., FRASCH, S. C., WARNER, M. L., AND HENSON, P. M. (1998) **"The role of phosphatidylserine in recognition of apoptotic cells by phagocytes."** *Cell Death.Differ.* 5 (7), 551-562.

FARAH, A.; MONTEIRO, M.; DONANGELO, C.M.; LAFAY, S. **Chlorogenic acids from Green coffee extract are highly bioavailable in humans.** *J. Nutr.*, Ilha do Fundão, v. 138, n.2, p. 2309-2315, 2008.

FENTON, M.J.; BURAS, J.A.; DONNELLY, R.P. **IL-4 reciprocally regulates IL-1 and IL-1 receptor antagonist expression in human monocytes.** *J Immunol*, 149(4):1283-8, 1992.

FERGUSON LR. **Chronic inflammation and mutagenesis.** *Mutat Res* 2010;690(1-2):3-11.

FILER A., PITZALIS C., BUCKLEY C. D. (2006). **Targeting the stromal microenvironment in chronic inflammation.** *Curr. Opin. Pharmacol.* 6 393–400.

FRANCISCO V, COSTA G, FIGUEIRINHA A, MARQUES C, PEREIRA P, MIGUEL NEVES B, CELESTE LOPES M, GARCÍA-RODRÍGUEZ C, TERESA CRUZ M, TERESA BATISTA M. **Anti-inflammatory activity of Cymbopogon citratus leaves infusion via proteasome and nuclear factor- κ B pathway inhibition: contribution of chlorogenic acid.** *J Ethnopharmacol.* 2013 Jun 21;148(1):126-34.

FRANK I. SCOTT, MD, MSCE AND MARK T. OSTERMAN, MD, MSCE. **Medical Management of Crohn Disease.** *Clin Colon Rectal Surg* 2013;26:67–74.

FREIRE DE LIMA, C.; XIAO, Y. Q.; GARDAL, S. J.; BRATTON, D. L.; SCHLEMANN, W. P.; HENSON, P. M. **Apoptotic Cells, through Transforming Growth Factor- γ , Coordinately Induce Anti-inflammatory and Suppress Pro-inflammatory Eicosanoid and NO Synthesis in Murine Macrophages.** *The Journal of Biological Chemistry.* v. 281, n. 50, p. 3876-3884, 2006.

FUKUDA, K.; KOBAYASHI, A.; WATABE. **The Role of tumor-associated macrophage in tumor progression.** *Frontiers in Bioscience* S4, 787-798, January 1, 2012.

FULLERTON JN, O'BRIEN AJ, GILROY DW. **Pathways mediating resolution of inflammation: when enough is too much.** *J Pathol.* 2013 Sep;231(1):8-20.

FUTOSI K., FODOR S, MÓCSAI A. **Neutrophil cell surface receptors and their intracellular signal transduction pathways.** *Int Immunopharmacol.* 2013 November; 17(3): 638–650.

GABELLONI ML, TREVANI AS, SABATTÉ J, GEFFNER J. **Mechanisms regulating neutrophil survival and cell death.** *Semin Immunopathol.* 2013 Jul;35(4):423-37.

GAHMBERG C. G, FAGERHOLM S. C, NURMI S. M, CHAVAKIS T, MARCHESAN S, GRÖNHOLM M. **Regulation of integrin activity and signalling.** *Biochim Biophys Acta.* Author manuscript; available in PMC 2010 June 1. Published in final edited form as: *Biochim Biophys Acta.* 2009 June; 1790(6): 431–444.

GHONTHIER, M. P. et al. **Chlorogenic acid bioavailability largely depends on its metabolism by the gut microflora in rats.** *J. Nutr.*, v. 133, n. 6, p. 1853-1859, 2003.

GINDERACHTER JO A VAN, MOVAHEDI K, GHASSABEH G H, MEERSCHAUT S, BESCHIN A, RAES G, et al. **Classical and alternative activation of mononuclear phagocytes: Picking the best of both worlds for tumor promotion.** *Immunobiology.* 2006; 211: 487-501.

GIRKONTAITE, I., URBONAVICIUTE, V., MASEDA, D., NEUBERT, K., HERRMANN, M., & VOLL, R. E. (2007). **Apoptotic cells selectively suppress the Th1 cytokine interferon gamma in stimulated human peripheral blood mononuclear cells and shift the Th1/Th2 balance towards Th2.** *Autoimmunity* 40, 327–330.

GILROY, D. W., LAWRENCE, T., PERRETTI, M. & ROSSI, A. G. **Inflammatory resolution: new opportunities for drug discovery.** *Nature Rev. Drug Discov.* 3, 401–416 (2004).

GOERDT, S.; BHARDWAJ, R.; SORG, C. **Inducible expression of MS-1 highmolecular- weight protein by endothelial cells of continuous origin and by dendritic cells/macrophages in vivo and in vitro.** *Am J Pathol*, 142(5):1409- 22, 1993.

GOLPON, H.A. et al. **Life after corpse engulfment: phagocytosis of apoptotic cells leads to VEGF secretion and cell growth.** *FASEB J.* 18, 1716–1718 (2004).

GORDON S. **Alternative activation of macrophages. Inhibitory effects of curcumin on tumorigenesis in mice.** *Nature.* 2003; 3:23-35.

GORDON S. **The macrophage: Past, present, and future.** *Eur. J. Immunol.* 2007; 37:S9–S17.

GORDON, M. H. & WISHART, K. (2010). **Effects of chlorogenic acid and bovine serum albumin on the oxidative stability of low density lipoproteins in vitro.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58 (9). pp. 5828-5833.

GRANADO-SERRANO AB, MARTÍN MA, IZQUIERDO-PULIDO M, GOYA L, BRAVO L, RAMOS S. **Molecular mechanisms of (-)-epicatechin and chlorogenic acid on the regulation of the apoptotic and survival/proliferation pathways in a human hepatoma cell line.** *J Agric Food Chem.* 2007 Mar 7;55(5):2020-7. Epub 2007 Feb 8.

GRIFFIN J D, RITZ J, NADLER L M, SCHLOSSMAN S F. **Expression of myeloid differentiation antigens on normal and myeloid cells.** *J. Clin. Invest.* 1981;68: 932–41.

GRIFFIN GK, NEWTON G, TARRIO ML, BU DX, MAGANTO-GARCIA E, AZCUTIA V, ALCAIDE P, GRABIE N, LUSCINSKAS FW, CROCE KJ, LICHTMAN AH. **IL-17 and TNF- α sustain neutrophil recruitment during inflammation through synergistic effects on endothelial activation.** *J Immunol.* 2012 Jun 15;188(12):6287-99.

GREGORY, C., & POUND, J. (2010). **Microenvironmental influences of apoptosis in-vivo and in-vitro.** *Apoptosis* 15, 1029–1049.

GRONERT K. Resolution, the Grail for Healthy Ocular Inflammation. *Exp Eye Res.* 2010 October; 91(4): 478–485.

GUERREIRO R, SANTOS-COSTA Q, AZEVEDO-PEREIRA JM (2011). **The chemokines and their receptors: characteristics and physiological functions.** *Acta Med Port.* 24 Suppl 4:967-76.

GUICCIARDI M E, GORES G J. **Apoptosis: A mechanism of acute and chronic liver injury.** *Gut.* 2005;54:1024–1033.

GOMEZ G. I., TANG J., WILSON C. L., WEI YAN, JAY W. HEINECKE, JOHN M. HARLAN, ELAINE W. RAINES. **Metalloproteinase-mediated Shedding of Integrin β 2 Promotes Macrophage Efflux from Inflammatory Sites.** *J Biol Chem.* 2012 February 10; 287(7): 4581–4589.

GONTHIER, M. P.; VERNY, M.A.; BESSON, C.; RÉMÉSY. C.; SCALBERT, A. **Chlorogenic acid bioavailability largely depends on its metabolism by the gut microflora in rats.** *Journal of Nutrition.* 133, 1853-1859, 2003.

HAN EH, KIM JY, KIM HG, CHUN HK, CHUNG YC, JEONG HG. **Inhibitory effect of 3-caffeoyl-4-dicaffeoylquinic acid from *Salicornia herbacea* against phorbol ester-induced cyclooxygenase-2 expression in macrophages.** *Chem Biol Interact.* 2010 Feb 12;183(3):397-404.

HALBWACHS L. & LESAVRE P. **Endothelium-Neutrophil Interactions in ANCA-Associated Diseases.** *J Am Soc Nephrol.* 2012 September; 23(9): 1449–1461.

HALDAR, S.; JENA, N.; CROW, C. M. **Inactivation of Bcl-2 by phosphorylation.** *Proc. Natl. Acad. Sci.*, n. 92, p. 4507-4511, 1995.

HEBEDA CB, BOLONHEIS SM, NAKASATO A, BELINATI K, SOUZA PD, GOUVEA

DR, LOPES NP, FARSKY SH. **Effects of chlorogenic acid on neutrophil locomotion functions in response to inflammatory stimulus.** *J Ethnopharmacol.* 2011 May 17;135(2):261-9.

HELGADOTTIR A , MANOLESCU A, THORLEIFSSON G, GRETARSDOTTIR S, JONSDOTTIR H, THORSTEINSDOTTIR U, SAMANI NJ, et al (2004) **The gene encoding 5-lipoxygenase activating protein confers risk of myocardial infarction and stroke.** *Nat Genet* 36:233–239.

HEMMERLE, H.; BURGER, H.J.; BELOW, P.; SCHUBERT, G.; RIPPEL, R.; SCHINDLER, P.W.; PAULUS, E.; HERLING, A.W. **Chlorogenic acid and synthetic Chlorogenic acid derivatives: novel inhibitors of hepatic glucose-6-phosphate translocase.** *J. Med. Chem.*, Germany, v.40, n.2, p.137-145, 1997.

HENGARTNER, M. O. **The biochemistry of apoptosis.** *Nature*, n. 407, p. 770-776, 2000.

HERLING, A.W.; BURGER, H.J.; SCHWAB, D.; HEMMERLE, H.; BELOW, P.; SCHUBERT, G. **Pharmacodynamic profile of a novel inhibitor of the hepatic glucose-6-phosphatase system.** *Frankfurt*, v.274, n. 6 Pt1, p. G1087-1093, 1998.

HOELZL, C.; KASMULLER, S.; WAGNER, K.; ELBLING, L.; HUBER, W.; KAGER, N.; FERK, F.; EHRLICH, V.; NERSENSYAN, A.; NEUBAUER, O.; DESMARCHELIER, A.; MARIN-KUAN, M.; DELATOUR, T.; VERGUET, C.; BEZENÇON, C.; BESSONS, A.; GRATHWOHL, D.; SIMIC, T.; KUNDIS, M.; SCHILTER, B.; CAVIN, C. **Instant coffee with high Chlorogenic acid levels protects human against oxidative damage of macromolecules.** *Mol. Nutr. Food Res.*, Vienna, v. 54, p. 1-12, 2010.

HOFSETH, L. J. **Nitric oxide as a target of complementary and alternative medicines to prevent and treat inflammation and cancer.** *Cancer Letters*, v.268, n. 1, p. 10-30, 2008.

HONG S, GRONERT K, DEVCHAND P, MOUSSIGNAC R-L, SERHAN CN. **Novel docosatrienes and 17S-resolvins generated from docosahexaenoic acid in murine brain, human blood and glial cells: autacoids in anti-inflammation.** *J Biol Chem.* 2003;278:14677–14687.

HSU CL, HUANG SL, YEN GC. **Inhibitory effect of phenolic acids on the proliferation of 3T3-L1 preadipocytes in relation to their antioxidant activity.** *J Agric Food Chem.* 2006 Jun 14;54(12):4191-7.

HUANG M T, NEWMARK H L, FRENKEL K. **Inhibitory effects of curcumin on tumorigenesis in mice.** *Journal of Cellular Biochemistry.Supplement: Cancer Chemoprevention Agents.* Volume 67, Issue Supplement 27, pages 26–34, 1997.

HUANG SM, CHUANG HC, WU CH, YEN GC. **Cytoprotective effects of phenolic acids on methylglyoxal-induced apoptosis in Neuro-2A cells.** *Mol Nutr Food Res.* 2008 Aug;52(8):940-9.

HUYNH, M. L., MALCOLM, K. C., KOTARU, C., TILSTRA, J. A., WESTCOTT, J. Y., FADOK, V. A. (2005). **Defective apoptotic cell phagocytosis attenuates prostaglandin E2 and 15-hydroxyeicosatetraenoic acid in severe asthma alveolar macrophages.** *Am J Respir Crit Care Med* 172, 972–979.

HYONG, A.; JADHAV, V.; LEE, S.; TONG, W.; ROWE, J.; ZHANG, J.H.; TANG, J.P. **Rosiglitazone, a PPAR gamma agonist, attenuates inflammation after surgical brain injury in rodents** *Brain Research*, 1215 (2008), pp. 218–224.

HWANG S J, KIM Y W, PARK Y, LEE H J, KIM K W. **Anti-inflammatory effects of chlorogenic acid in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells.** *Inflamm Res.* 2014 Jan;63(1):81-90.

IGNATOWICZ E, BALANA B, VULIMIRI SV, SZAEFER H, BAER-DUBOWSKA W. **The effect of plant phenolics on the formation of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-DNA adducts and TPA-stimulated polymorphonuclear neutrophils chemiluminescence in vitro.** *Toxicology*. 2003 Aug 1;189(3):199-209. PubMed PMID: 12832153.

JANG H, AHN HR, JO H, KIM KA, LEE EH, LEE KW, JUNG SH, LEE CY. **Chlorogenic Acid and Coffee Prevent Hypoxia-Induced Retinal Degeneration.** *J Agric Food Chem*. 2013 Dec 20.

JEFFCOATE WJ. **Abnormalities of vasomotor regulation in the pathogenesis of the acute charcot foot of diabetes mellitus.** *Int J Low Extrem Wounds*. 2005;4:133–137.

JI L, JIANG P, LU B, SHENG Y, WANG X, WANG Z. **Chlorogenic acid, a dietary polyphenol, protects acetaminophen-induced liver injury and its mechanism.** *J Nutr Biochem*. 2013 Nov;24(11):1911-9.

JIANG Y, KUSAMA K, SATOH K, TAKAYAMA E, WATANABE S, SAKAGAMI H. **Induction of cytotoxicity by chlorogenic acid in human oral tumor cell lines.** *Phytomedicine*. 2000 Dec;7(6):483-91.

JOHNSTON, K.L.; CLIFFORD, M.N.; MORGAN, L.M. **Coffee acutely modifies gastrointestinal hormone secretion and glucose tolerance in humans: glycemic effects of Chlorogenic acid and caffeine.** *Am. J. Clin. Nutr.*, Guildford, v.78, n.4, p.728-733, 2003.

JONSSON, H., ALLEN, P. & PENG, S.L. **Inflammatory arthritis requires Foxo3a to prevent Fas ligand-induced neutrophil apoptosis.** *Nat. Med.* (2005).

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, C. **Histologia básica.** 10^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; p.223-37, 2004.

KANG, S S; ALLEN, P M. **Priming in presence of IL-10 results indirect enhancement of CD8+ T cell primary responses and inhibition of secondary responses.** *The Journal of Immunology*. V. 174, n. 9, p. 5382-5389, 2005.

KANNO Y, WATANABE R, ZEMPO H, OGAWA M, SUZUKI J, ISOBE M. **Chlorogenic acid attenuates ventricular remodeling after myocardial infarction in mice.** *Int Heart J.* 2013;54(3):176-80. PubMed PMID: 23774243.

KARP, C. L., FLICK, L. M., PARK, K. W., SOFTIC, S., GREER, T. M., KELEDJIAN, R., YANG, R., UDDIN, J., GUGGINO, W. B., ATABANI, S. F., BELKAID, Y., XU, Y., WHITSETT, J. A., ACCURSO, F. J., WILLS-KARP, M., AND PETASIS, N. A. (2004). **Defective lipoxin-mediated anti-inflammatory activity in the cystic fibrosis airway.** *Nat. Immunol.* 5, 388–392.

KARTHIKESAN, K.; PARI, L.; MENON, V.P. **Antihyperlipidemic effect of Chlorogenic acid and tetrahydrocurcumin in rats subjected to diabetogenic agents.** *Chem. Biol. Interact.*, 2010a.

KARTHIKESAN, K.; PARI, L.; MENON, V.P. **Combined treatment of tetrahydrocurcumin and Chlorogenic acid exerts potential antihyperglycemic effect on streptozotocin-nicotinamide-induced diabetic rats.** *Gen. Physiol. Biophys.*, v.29, n.1, p.23-30, 2010b.

KEMPF, K.; HERDER, C.; ERLUND, I.; KOLB, H.; MARTIN, S.; CARSTENSEN, M.; KOENIG, W.; SUNDVALL, J.; BIDEL, S.; KUHA, S.; TUOMILEHTO, J. **Effects of coffee consumption on subclinical inflammation and other risk factors for type 2 diabetes: a clinical trial.** *Am J Clin Nutr* 2010 ; 91 : 950-7.

KLEIN B, ZHANG XG, JOURDAN M, PORTIER M, BATAILLE R. **Interleukin-6 is a major myeloma cell growth factor in vitro and in vivo especially in patients with terminal disease.** *Curr Top Microbiol Immunol.* 1990;166:23–31.

KIM, A.R.; ZOU, Y.N.; PARK, T.H.; SHIM, K.H.; KIM, M.S.; KIM, N.D.; KIM, J.D.; BAE, S.J.; CHOI, J.S.; CHUNG, H.Y. **Active components from Artemisia iwayomogi displaying ONOO- Scavenging activity.** *Phytother. Res.*, Pusan, v. 18, p.1-7, 2004.

KIM J, LEE S, SHIM J, KIM HW, KIM J, JANG YJ, YANG H, PARK J, CHOI SH, YOON JH, LEE KW, LEE HJ. **Caffeinated coffee, decaffeinated coffee, and the phenolic phytochemical chlorogenic acid up-regulate NQO1 expression and prevent H₂O₂-induced apoptosis in primary cortical neurons.** *Neurochem Int.* 2012 Apr;60(5):466-74.

KODELJA, V.; MÜLLER, C.; TENORIO, S.; SCHEBESCH, C.; ORFANOS, C.E.; GOERDT, S. **Differences in angiogenic potential of classically vs alternatively activated macrophages.** *Immunobiology*, 197(5):478-93, 1997.

KOLACZKOWSKA E. & KUBES P. **Neutrophil recruitment and function in health and inflammation.** *Nature Reviews Immunology* 13, 159-175 (March 2013).

KONOSHI Y, KASHINES S, YONEYAMAS T, SAKAMOTOS Y, MATSUISY, SHIBATAS H. **Iron chelation by chlorogenic acid as a natural antioxidant.** *Biosci Biotechnol Biochem.* 1998 Jan;62(1):22-7.

KONISHI, Y.; KOBAYASHI, S. **Transepithelial transport of chlorogenic acid, caffeic acid, and their colonic metabolites in intestinal caco-2 cell monolayers.** *J. Agric. Food Chem.*, v. 52, n. 9, p. 2518-2526, 2004.

KONO, H & KENNETH L. ROCK. **How dying cells alert the immune system to danger.** *Nature reviews. Immunology.* 2008 Apr;8(4):279-89.

KRAKAUER T. **The polyphenol chlorogenic acid inhibits staphylococcal exotoxin-induced inflammatory cytokines and chemokines.** *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 2002 Feb;24(1):113-9.

KRIETE A, MAYO KL. **Atypical pathways of NF-kappaB activation and aging.** *Exp Gerontol.* 2009;44:250–255.

KRISHNAMOORTHY S, HONN KV. **Inflammation and disease progression.** *Cancer Met Rev.* 2006;25:481–1.

KUBY, J., KINDT, T., OSBORN, B., GOLDSBY, R. **Immunology** (5a ed.). USA: W.H. *Freeman and Company*, 2003.

KUBONISHI I, MIYOSHI I. **Establishment of a Ph1 chromosome-positive cell line from chronic myelogenous leukemia in blast crisis.** *Int J Cell Cloning.* 1983;1: 105-117.

KUMAR, V.; COTRAN, R. S.; SCHOEN, F.J. **Robbins – Patologia estrutural e funcional.** *Ed. Elsevier.* 7a ed, 2005.

LANG R, DIEMINGER N, BEUSCH A, LEE YM, DUNKEL A, SUESS B, SKURK T, WAHL A, HAUNER H, HOFMANN T. **Bioappearance and pharmacokinetics of bioactives upon coffee consumption.** *Anal Bioanal Chem.* 2013 Oct;405 (26):8487-503.

LANGER H. F. & CHAVAKIS T. **Leukocyte-Endothelial Interactions in Inflammation.** *J Cell Mol Med.* Author manuscript; available in PMC 2010 July 1.13(7): 1211–1220.

LAUBER, K.; BLUMENTHAL, S.G.; WAIBEL, M.; WESSELBORG, S. 2004. **Clearance of apoptotic cells: getting rid of the corpses.** *Mol. Cell.* 14:277–287.

LAVROVSKY Y, CHATTERJEE B, CLARK RA, ROY AK (2000). **Role of redox-regulated transcription factors in inflammation, aging and age-related diseases.** *Exp. Gerontol.* 35(5):521-532.

LEE, A., WHYTE, M.K. & HASLETT, C. **Inhibition of apoptosis and prolongation of neutrophil functional longevity by inflammatory mediators.** *J. Leukoc. Biol.* 54, 283–288 (1993).

LEE CH, YOON SJ, LEE SM. **Chlorogenic acid attenuates high mobility group box 1(HMGB1) and enhances host defense mechanisms in murine sepsis.** *Mol Med.* 2013 Jan 22;18:1437-48.

LEPELLEY, M.; CHEMINADE, G.; TREMILLON, N.; SIMKIN, A.; CAILLET, V.; MCCARTHY, J. (2007) - **Chlorogenic acid synthesis in coffee: An analysis of CGA content and real-time RT-PCR expression of HCT, HQT, C3H1, and CCoAOMT1 genes during grain development in C. canephora.** *Plant Science*,172: 978–996.

LLODRA J, ANGELI V, LIU J, TROGAN E, FISHER EA, RANDOLPH GJ. **Emigration of monocyte-derived cells from atherosclerotic lesions characterizes regressive, but not progressive, plaques.** *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004;101:11779–11784.

LI Y, SHI W, LI Y, ZHOU Y, HU X, SONG C, MA H, WANG C, LI Y. **Neuroprotective effects of chlorogenic acid against apoptosis of PC12 cells induced by methylmercury.** *Environ Toxicol Pharmacol.* 2008 Jul;26(1):13-21

LIU YJ, ZHOU CY, QIU CH, LU XM, WANG YT. **Chlorogenic acid induced apoptosis and inhibition of proliferation in human acute promyelocytic leukemia HL-60 cells.** *Mol Med Rep.* 2013 Oct;8(4):1106-10.

LU, H., BALLANTYNE, C., SMITH, C. W. **LFA-1 (CD11a/CD18) triggers hydrogen peroxide production by canine neutrophils.** *J Leukoc Biol.*; 68(1):73-80, 2000.

LU N. & ZHOU Z. **Membrane Trafficking and Phagosome Maturation During the Clearance of Apoptotic Cells.** *Int Rev Cell Mol Biol.* Author manuscript; available in PMC 2013 January 22. 293: 269–309.

MA J, LIU L, CHE G, YU N, DAI F, YOU Z. **The M1 form of tumor-associated macrophages in non-smal cell lung cancer is positively associated with survival time.** *BMC Cancer.* 2010; 10:112.

MCDONALD PP, FADOK VA, BRATTON D, HENSON PM. **Transcriptional and translational regulation of inflammatory mediator production by endogenous TGF- β in macrophages that have ingested apoptotic cells.** *J Immunol.* 1999;163:6164–6172.

MACHEIX, J. J.; FLEURIET, A.; BILLOT, J.; **Fruit Phenolics,** *CRC Press: Boca Raton*, 1990.

MADDOX JF, SERHAN CN. **Lipoxin A₄ and B₄ are potent stimuli for human monocyte migration and adhesion: selective inactivation by dehydrogenation and reduction.** *J Exp Med.* 1996;183:137–146.

MADDOX JF, HACHICHA M, TAKANO T, PETASIS NA, FOKIN VV, SERHAN CN. **Lipoxin A₄ stable analogs are potent mimetics that stimulate human monocytes and THP-1 cells via a G-protein linked lipoxin A₄ receptor.** *J Biol Chem.* 1997;272:6972–6978

MADERNA P, YONA S, PERRETTI M, GODSON C. **Modulation of phagocytosis of apoptotic neutrophils by supernatant from dexamethasone-treated macrophages and annexin-derived peptide Ac(2-26).** *J Immunol.* 2005;174:3727–3733.

MADERNA P. & GODSON C. **Lipoxins: revolutionary road.** *Br J Pharmacol.* 2009 October; 158(4): 947–959.

MAKIS, A; HATIZIMICHAEL, E; BOURANTAS, K. **The role of cytokines in sickle cell disease.** *Annals of hematology*, v. 79, n. 8, p. 470-413, 2000.

MANTOVANI A, SICA A, SOZZANI S, ALLAVENA P, VECCHI A, LOCATI M. **The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization.** *Trends in immunology.* 2004; 25:677–686.

MANTOVANI A. **Orchestration of macrophage polarization.** *Blood.* 2009; 114: 3135-3136.

MARQUES, A H; CIZZA, G; STERNBERG, E. **Brain-immune interactions and implications in psychiatric disorders.** *Revista Brasileira de Psiquiatria*, v. 29, p. 27-32, 2007.

MARRASSINI C, ACEVEDO C, MIÑO J, FERRARO G, GORZALCZANY S. **Evaluation of antinociceptive, antiinflammatory activities and phytochemical analysis of aerial parts of *Urtica urens* L.** *Phytother Res.* 2010 Dec;24(12):1807-12. doi: 10.1002/ptr.3188.

MCCMAHON, L., LEGOUIS, R., VONESCH. J. L., LABOUESSE, M. (2001). **Assembly of *C. elegans* apical junctions involves positioning and compaction by LET-413 and protein aggregation by the MAGUK protein DLG-1.** *J. Cell Sci.* 114, 2265-2277.

MELINDA C. POWER, JENNIFER WEUVE, JOSHUA J. GAGNE, MATTHEW B. MCQUEEN, ANAND VISWANATHAN, DEBORAH BLACKER. **The association between blood pressure and incident Alzheimer disease: a systematic review and meta-analysis.** *Epidemiology.* Author manuscript; available in PMC 2013 May 1; 22(5): 646–659.

MENDOZA- NUNEZ VM, ROSADO-PEREZ J, SANTIAGO-OSORIO E, ORTIZ R, SANCHEZ-RODRIGUEZ MA, GALVAN-DUARTE RE. **Aging linked to type 2 diabetes increases oxidative stress and chronic inflammation.** *Rejuvenation Res.* 2011;14:25–31.

MONTAGNANA M, FAVALORO EJ, LIPPI G. **Coffee intake and cardiovascular disease: virtue does not take center stage.** *Semin Thromb Hemost.* 2012 Mar;38 (2):164-77.

MOSSER, D.M. AND EDWARDS, J. P. 2008. **Exploring the full spectrum of macrophage activation.** *Nature Reviews Immunology.* 8:958-969.

MUNDI, H.; B.; SVANBORG, C.; OHMAN, L.; DAHLGREN, C. **Extracellular release of reactive oxygen species from human neutrophils upon interaction with *Escherichia coli* strains causing renal scarring.** *Infection and Immunity*, v.59, p.4168-72, 1991.

MURRAY PJ, WYNN TA (2011). **Obstacles and opportunities for understanding macrophage polarization.** *J Leukoc Biol*, 89(4):557-63.

MURRAY P. J. & WYNN T. A. **Protective and pathogenic functions of macrophage subsets.** *Nat Rev Immunol.* Author manuscript; available in PMC 2012 August 18.; 11(11): 723–737.

NARDINI, M., D'ACQUINO, M., TOMASSI, G., GENTILI, V., DI FELICE, M., SCACCINI, C., 1995. **Inhibition of human low-density lipoprotein oxidation by caffeic acid and other hydroxycinnamic acid derivatives.** *Free Radic. Biol. Med.* 19, 541–552.

NATHAN, C. (2002). **Points of control in inflammation.** *Nature* 420, 846–852.

NISHIKAWA K, ARAI H, INOUE K. **Scavenger receptor-mediated uptake and metabolism of lipid vesicles containing acidic phospholipids by mouse peritoneal macrophages.** *J. Biol. Chem.* 1990; 265: 5226–31.

NISHI C, TODA S, SEGAWA K, NAGATA S. **Tim4- and MerTK-mediated engulfment of apoptotic cells by mouse resident peritoneal macrophages.** *Mol Cell Biol.* 2014 Apr;34 (8):1512-20

NURTANIO N, YANG P-C. **Role of TIM-4 in innate or adaptive immune response.** *N Am J Med Sci.* 2011 May; 3(5): 217–221.

OHRI C M, SHIKOTRA A, GREEN R H, WALTER D A, BRADDING P. **Macrophages within NSCLC tumor islets are predominantly of a cytotoxic M1 phenotype associated with extended survival.** *Eur. Respir. J* 2009; 33:118-126.

ONOZUKA K, KIRIKAE T, KIRIKAE F. **Participation of CD14 in the phagocytosis of smooth-type *Salmonella typhimurium* by the macrophage-like cell line, J774.1.** *Microbiol. Immunol.* 1997; 41: 765–72.

OLMOS A, GINER RM, RECIO MC, RIOS JL, CERDÁ-NICOLÁS JM, MÁÑEZ S. **Effects of plant alkylphenols on cytokine production, tyrosine nitration and inflammatory damage in the efferent phase of contact hypersensitivity.** *Br J Pharmacol.* 2007 Oct;152(3):366-73.

OLTHOF, M.R.; HOLLMAN, P.C.; ZOCK, P.L.; KATAN, M.B. **Consumption of high doses of chlorogenic acid, present in coffee, or of black tea increases plasma total homocysteine concentrations in humans.** *Am. J. Clin. Nutr.*, v. 73, n.3, p. 532-538, 2001.

ORTEGA-GÓMEZ A, PERRETTI M, SOEHNLEIN O. **Resolution of inflammation: an integrated view.** *EMBO Mol Med.* 2013 May;5(5):661-74.

ORTIZ-MASIÀ D, DÍEZ I, CALATAYUD S, HERNÁNDEZ C, COSÍN-ROGER J, HINOJOSA J, ESPLUGUES JV, BARRACHINA MD. **Induction of CD36 and thrombospondin-1 in macrophages by hypoxia-inducible factor 1 and its relevance in the inflammatory process.** *PLoS One.* 2012;7(10):e48535.

PAINTER C A & STERN L.J. **Conformational variation in structures of classical and nonclassical MHCII proteins and functional implications.** *Immunol Rev.* 2012 November; 250(1): 144–157.

PARI, L.; KARTHIKESAN, K.; MENON, V.P. **Comparative and combined effect of Chlorogenic acid and tetrahydrocurcumin on antioxidant disparities in chemical induced experimental diabetes.** *Mol. Cell. Biochem.*, v.341, n.1-2, p. 109-117, 2010.

PARK JB. **Isolation and quantification of major chlorogenic acids in threemajor instant coffee brands and their potential effects on H2O2-inducedmitochondrial membrane depolarization and apoptosis in PC-12 cells.** *Food Funct.* 2013 Nov;4(11):1632-8.

PARKS BW, BLACK LL, ZIMMERMAN KA, METZ AE, STEELE C, MURPHY-ULLRICH JE, KABAROWSKI JH. **CD36, but not G2A, modulates efferocytosis, inflammation, and fibrosis following bleomycin-induced lung injury.** *J Lipid Res.* 2013 Apr;54(4):1114-23

PADMANABHAN J & GONZALEZ A. L. **The Effects of Extracellular Matrix Proteins on Neutrophil-Endothelial Interaction — A Roadway To Multiple Therapeutic Opportunities.** *Yale J Biol Med.* 2012 June; 85(2): 167–185.

PALUMBO, M. I. P.; MACHADO, L. H. A.; CONTI, J. P.; OLIVEIRA, F. C.; RODRIGUES, J. C.. **Incidência das dermatopatias auto-imunes em cães e gatos e estudo retrospectivo de 40 casos de lúpus eritematoso discóide, atendidos no serviço de dermatologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP – Botucatu.** *Revista Semina: Ciências Agrárias.* Londrina, v. 31, n. 3, p. 739-744, 2010.

PERRETTI M, CHIANG N, LA M, FIERRO IM, MARULLO S, GETTING SJ, SOLITO E, AND SERHAN CN (2002) **Endogenous lipid- and peptide-derived anti-inflammatory pathways generated with glucocorticoid and aspirin treatment activate the lipoxin A4 receptor.** *Nat Med* 8: 1296-1302.

PETERSON P K, GEKKER G, HU S. **CD14 receptor-mediated uptake of nonopsonized Mycobacterium tuberculosis by human microglia.** *Infect. Immun.* 1995; 63: 1598–602.

PRADHAN A. D., MANSON J. E., RIFAI N., BURING J. E., RIDKER P. M. 2001 **C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus.** *J. Am. Med. Assoc.* **286**, 327–334.

PUGIN J, HEUMANN D, TOMASZ A. **CD14 is a pattern recognition receptor.** *Immunity* 1994; 1: 509–516.

PUANGPRAPHANT S, DE MEJIA EG. **Saponins in yerba mate tea (Ilex paraguariensis A. St.-Hil) and quercetin synergistically inhibit iNOS and COX-2 in lipopolysaccharide-induced macrophages through NFkappaB pathways.** *J Agric Food Chem.* 2009 Oct 14;57(19):8873-83.

PUANGPRAPHANT S, BERHOW MA, VERMILLION K, POTTS G, GONZALEZ DE MEJIA E. **Dicaffeoylquinic acids in Yerba mate (Ilex paraguariensis St. Hilaire) inhibit NF-κB nucleus translocation in macrophages and induce apoptosis by activating caspases-8 and -3 in human colon cancer cells.** *Mol Nutr Food Res.* 2011 Oct;55(10):1509-22.

RAKSHIT S, MANDAL L, PAL BC, BAGCHI J, BISWAS N, CHAUDHURI J, CHOWDHURY AA, MANNA A, CHAUDHURI U, KONAR A, MUKHERJEE T, JAISANKAR P, BANDYOPADHYAY S. **Involvement of ROS in chlorogenic acid-induced apoptosis of Bcr-Abl+ CML cells.** *Biochem Pharmacol.* 2010 Dec 1;80(11):1662-75.

REN, Y. et al. **Non-phlogistic clearance of late apoptotic neutrophils by macrophages: Efficient phagocytosis independent of β2 integrins.** *J. Immunol.* 166, 4743–4750 (2001).

RICE-EVANS C. A., MILLER J. M., AND PAGANGA G. **Structure-antioxidant activity relationship of flavon-oids and phenolic acids.** *Free Radic. Biol. Med.* 1996, 20, -933Ð956.

ROSEN, S. D. **Ligands for L-selectin: homing, inflammation, and beyond.** *Annual Rev Immunol*; 22:129-56, 2004.

ROSSI A, LIGRESTI A, LONGO R, RUSSO A, BORRELLI F, SAUTEBIN L. **The inhibitory effect of propolis and caffeic acid phenethyl ester on cyclooxygenase activity in J774 macrophages.** *Phytomedicine.* 2002 Sep;9(6):530-5

RUOSHI XU, QIUMEI KANG, JIE REN, ZUKUN LI, XIAOPING XU. **Antitumor Molecular Mechanism of Chlorogenic Acid on Inducting Genes GSK-3β and APC and Inhibiting Gene β-Catenin.** *J Anal Methods Chem.* 2013; 2013: 951319.

RUOSLAHTI E. **RGD and other recognition sequences for integrins.** *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1996;12:697-715.

RUTGEERTS P, GEBOES K. **Understanding inflammatory bowel disease--the clinician's perspective.** *Eur J Surg Suppl.* 2001:66–72.

RUIFENG G, YUNHE F, ZHENGKAI W, ERSUN Z, YIMENG L, MINJUN Y, XIAOJING S, ZHENGTAO Y, NAISHENG Z. **Chlorogenic acid attenuates lipopolysaccharide-induced mice mastitis by suppressing TLR4-mediated NF- κ B signaling pathway.** *Eur J Pharmacol.* 2014 Apr 15;729:54-8.

SAADI AT, BLACKWELL CC, ESSERY SD, RAZA MW, EL AHMER OR, MACKENZIE DA, JAMES VS, WEIR DM, OGILVIE MM, ELTON RA, BUSUTTIL A, KEELING JW. **Developmental and environmental factors that enhance binding of Bordetella pertussis to human epithelial cells in relation to sudden infant death syndrome (SIDS).** *FEMS Immunol Med Microbiol.* 1996 Nov;16(1):51-9.

SALAZAR-MARTINEZ, E.; WILLETT, W.C.; ASCHERIO, A.; MANSON, J.E.; LEITZMANN, M.F.; STAMPFER, M.J.; HU, F.B. **Coffee consumption and risk for type 2 diabetes mellitus.** *Ann. Intern. Med.*, Boston, v.140, n.1, p. 1-8, 2004.

SALLUSTO, F & MACKAY, C.R. **Chemoattractants and their receptors in homeostasis and inflammation.** *Curr. Opin. Immunol.*, Dec, 16(6),p724-31, 2004.

SARANGAPANI K. K., MARSHALL B. T., MCEVER R. P., ZHU C. **Molecular Stiffness of Selectins.** *J Biol Chem.* 2011 March 18; 286(11): 9567–9576.

SAVILL J, DRANSFIELD I, HOGG N, HASLETT C. **Vitronectin receptor mediated phagocytosis of cells undergoing apoptosis.** *Nature* 1990; **343**: 170–73.

SAVILL J, HOGG N, REN Y, HASLETT C. **Thrombospondin cooperates with CD36 and the vitronectin receptor in macrophage recognition of neutrophils undergoing apoptosis.** *J. Clin. Invest.* 1992; 90: 1513–22.

SCHAEFER, S., BAUM, M., EISENBRAND, G., & JANZOWSKI, C. (2006). **Modulation of oxidative cell damage by reconstituted mixtures of phenolic apple juice extracts in human colon cell lines.** *Molecular Nutrition and Food Research*, 50, 413–417

SCHEBESCH, C.; KODELJA, V.; MÜLLER, C.; HAKIJ, N.; BISSON, S.; ORFANOS, C.E.; GOERDT, S. **Alternatively activated macrophages actively inhibit proliferation of peripheral blood lymphocytes and CD4+ T cells in vitro.** *Immunology*, 92(4):478-86, 1997.

SCHMIDT ME, STEINDORF K, MUTSCHELKNAUSS E, SLANGER T, OBI N, KROPP S, BERGER J, BRAENDLE W, FLESCHE-JANYS D, CHANG-CLAUDE J (2007) **Physical activity and postmenopausal breast cancer: effective periods in**

life and effect modification by different breast cancer characteristics. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 2008 Dec;17(12):3402-10.

SCHMIDT E. P., LEE W. L., ZEMANS R. L., YAMASHITA C., DOWNEY G. P. **On, Around, and Through: Neutrophil-Endothelial Interactions in Innate Immunity.** *Physiology (Bethesda)* Author manuscript; available in PMC 2013 June 17. 26(5): 334–347.

SCHULTE D, KÜPPERS V, DARTSCH N, BROERMANN A, LI H, ZARBOCK A, KAMENYEVA O, KIEFER F, KHANDOGA A, MASSBERG S, VESTWEBER D. **Stabilizing the VE-cadherin-catenin complex blocks leukocyte extravasation and vascular permeability.** *EMBO J.* 2011 Aug 19;30(20):4157-70.

SCHWAB, J. M., CHIANG, N., ARITA, M., & SERHAN, C. N. (2007). **Resolvin E1 and protectin D1 activate inflammation-resolution programmes.** *Nature* 447, 869–874.

SEGAL, A.W.; SOOTHILL, J.F. Phagocytes. In: SOOTHILL,J.F. **Pediatric immunology.** *Oxford: Blackweel*, 1983. p.37.

SERHAN CN. **A search for endogenous mechanisms of anti-inflammation uncovers novel chemical mediators: missing links to resolution.** *Histochem Cell Biol.* 2004;122:305–321.

SERHAN CN, BRAIN SD, BUCKLEY CD, GILROY DW, HASLETT C, O'NEILL LAJ, et al. **Resolution of inflammation: state of the art, definitions and terms.** *FASEB J.* 2007;21:325–332.

SERHAN CN, CHIANG N, VAN DYKE TE. **Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators.** *Nat Rev Immunol.* 2008;8:349–361.

SERHAN CN. **Novel lipid mediators and resolution mechanisms in acute inflammation.** *AM J PATHOL.* 2010 OCTOBER; 177(4): 1576–1591.

SHAN J, FU J, ZHAO Z, KONG X, HUANG H, LUO L, YIN Z. **Chlorogenic acid inhibits lipopolysaccharide-induced cyclooxygenase-2 expression in RAW264.7 cells through suppressing NF-kappaB and JNK/AP-1 activation.** *Int Immunopharmacol.* 2009 Aug;9(9):1042-8.

SHAPIRO, H. M. **Practical flow cytometry.** 4th ed. *New Jersey: Wiley-Liss.* 2003. 681p.

SHI H, DONG L, JIANG J, ZHAO J, ZHAO G, DANG X, LU X, JIA M. **Chlorogenic acid reduces liver inflammation and fibrosis through inhibition of toll-like receptor 4 signaling pathway.** *Toxicology.* 2013 Jan 7;303:107-14.

SHI, Q., BAO, Z., ZHU, Z., YING, Q., AND QIAN, Q. (2006). **Effects of different treatments of salicylic acid on heat tolerance, chlorophyll fluorescence, and antioxidant enzyme activity in seedlings of cucumis sativa L.** *Plant Growth Regul.* 48, 127–135.

SILVERSTEIN, R. L. & FEBBRAIO, M. **CD36 and atherosclerosis.** *Curr Opin Lipidol* 11, 483-91. (2000).

SILVERSTEIN, R. L. & FEBBRAIO, M. **CD36, a Scavenger Receptor Involved in Immunity, Metabolism, Angiogenesis, and Behavior.** *Sci Signal.* 2009 May 26; 2(72): re3.

SPENCER, J.P.; CHOWRIMOOTO, G.; CHOUDHURY, R.; DEBNAM, E.S.; SRAI, S.K.; RICE-EVANS, C. **The small intestine can both absorb and glucuronidate luminal flavonoids.** *FEBS Lett.*, London, v. 458, n.2, p.224-230, 1999.

STALMACH, A.; STEILING, H.; WILLIAMSON, G.; CROZIER, A. **Bioavailability of Chlorogenic acids following acute ingestion of coffee by humans with an ileostomy.** *Arch. Biochem. Biophys.*, Glasgow, v. 501, n.1, p. 98-105, 2010.

STANDIFORD, T. J.; KUNKEL, S. L.; LIEBLER, J. M.; BURDICK, M. D.; GILBERT, A. R.; STRIETER, R. M. **Gene expression of macrophage inflammatory protein-1 alpha from human blood monocytes and alveolar macrophages is inhibited by interleukin-4.** *Am J Respir Cell Mol Biol*, 9(2):192-8, 1993.

STATTI GA, CONFORTI F, MENICHINI F, MARRELLI M, GANGALE C, TUNDIS R, LOIZZO. **Protective effect of Hypericum calabricum Sprengel on oxidative damage and its inhibition of nitric oxide in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages.** *Biol Res.* 2011;44(3):213-8. Epub 2011 Nov 7.

STEINMETZ K A & POTTER J D. **Vegetable, fruit, and cancer prevention: a review.** *J Am Diet Assoc*, 1996, 96: 1027–39.

STOCKER R & KEANEY J F JR. **Role of Oxidative Modifications in Atherosclerosis.** *Physiol Rev.* 2004; 84:1381–1478.

STANDIFORD TJ, KESHAMOUNI VG, REDDY RC. **Peroxisome proliferator-activated receptor- γ as a regulator of lung inflammation and repair.** *Proc Am Thorac Soc.* 2005;2(3):226-31.

SUBRAMANIAN H, GRAILER JJ, OHLRICH KC, RYMASZEWSKI AL, LOPPNOW JJ, KODERA M, CONWAY RM, STEEBER DA. **Signaling through L-selectin mediates enhanced chemotaxis of lymphocyte subsets to secondary lymphoid tissue chemokine.** *J Immunol.* 2012 Apr 1;188(7):3223-36.

SUNG MJ, DAVAATSEREN M, KIM SH, KIM MJ, HWANG JT. **Boehmeria nivea attenuates LPS-induced inflammatory markers by inhibiting p38 and JNK phosphorylations in RAW264.7 macrophages.** *Pharm Biol.* 2013 Sep;51(9):1131-6.

SUZUKI, A.; KAGAWA, D.; OCHIAI, R.; TOKIMITSU, I.; SAITO, I. **Green coffee bean extract and its metabolites have a hypotensive effect in spontaneously hypertensive rats.** *Hypertens. Res.*, v. 25, p. 99–107, 2002.

SUZUKI, A.; YAMAMOTO, N.; JOKURA, H.; YAMAMOTO, M.; FUJII, A.; TOKIMITSU, I.; SAITO, I. **Chlorogenic acid attenuates hypertension and improves endothelial function in spontaneously hypertensive rats.** *J Hypertens.*, Tokyo, v.24, n.6, p.1065-1073, 2006.

TAN X, ZHOU D, ZHANG Y, JIANG B. **Effects of different catechins on cell cycle arrest and induction of apoptosis in LoVo cells.** *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi*. 2000 Nov;34(6):333-5. Chinese.

TAYLOR, ANNA L., WATSON, CRISTOPHER J. E. AND BRADLEY, J. ANDREW (2005). **Immunosuppressive agents in solid organ transplantation: mechanisms of action and therapeutic efficacy.** *Critical reviews in Oncology/Hematology* 56, 23 – 46.

THORNBERRY, N. A.; LAZEBNIK, Y. **Caspases: enemies within.** *Science*, n. 281, p. 1312-1316, 1998.

TIAN YI KANG, HUA RONG YANG, JIE ZHANG, DAN LI, JIE LIN, LI WANG, XIAOPING XU. **The Studies of Chlorogenic Acid Antitumor Mechanism by Gene Chip Detection: The Immune Pathway Gene Expression.** *J Anal Methods Chem*. 2013; 2013: 617243.

TOMIMORI K, NAKAMA S, KIMURA R, TAMAKI K, ISHIKAWA C, MORI N. **Antitumor activity and macrophage nitric oxide producing action of medicinal herb, Crassocephalum crepidioides.** *BMC Complement Altern Med*. 2012 Jun 21;12:78.

TUNNICLIFFE, J.M. & SHEARER, J. **Coffee, glucose homeostasis, and insulin resistance: physiological mechanisms and mediators.** *Appl Physiol Nutr Metab.*, Canada, v. 33, n. 6, p. 1290-300, 2008.

TURNBERG, D.; BOTTO, M. **The regulation of the complement system: insights from genetically-engineered mice.** *Mol Immunol*, v. 40, p. 145-153, 2003.

UNDERHILL, D.M.; OZINSKY, A. **Phagocytosis of Microbes: Complexity in Action.** *Annuals Reviews of Immunology* , v.20, p. 825-852, 2002.

ULEVITCH R J & TOBIAS P S. **Receptor-dependent mechanisms of cell stimulation by bacterial endotoxin.** *Annu. Rev. Immunol*. 1995; 13: 437–57.

VALKO, M., LEIBFRITZ, D. J., MONCOL, CRONIN, M. T., MAZUR, M., TELSER, J. **Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease,** *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 39 (2007) 44–84.

VAN DAM, R.M. & HU, F.B. **Coffee consumption and risk of type 2 diabetes: a systematic review.** *JAMA, The Netherland*, v.294, n.1, p.97-104, 2005.

VAN DIJK, A. E.; OLTHOF, M. R.; MEEUSE, J. C.; SEEBUS, E.; HEINE, R. J.; VAN DAM, R. M. **Acute Effects of Decaffeinated Coffee and the Major Coffee Components Chlorogenic Acid and Trigonelline on Glucose Tolerance.** *Diabetes Care*. v. 32, n. 6, p. 1023-1025, 2009.

VERMEULEN, K.; BERNEMAN, Z. N.; VAN BOCKSTAELE, D. R. **Cell cycle and apoptosis.** *Cell Prolif.*, n. 36, p. 165-175, 2003.

VERNON P. J., TANG D. **Eat-Me: Autophagy, Phagocytosis, and Reactive Oxygen Species Signaling.** *Antioxid Redox Signal*. 2013 February 20; 18(6): 677–691.

VOLL, R.E. *et al.* **Immunosuppressive effects of apoptotic cells.** *Nature* **390**, 350–351 (1997).

WANG J, MAZZA G. **Effects of anthocyanins and other phenolic compounds on the production of tumor necrosis factor alpha in LPS/IFN-gamma-activated RAW 264.7 macrophages.** *J Agric Food Chem*. 2002 Jul 17;50(15):4183-9.

WATANABE, T.; MITSUI, Y.; KUSAURA, T.; OKAWA, W.; KAJIHARA, Y.; SAITO, I. **The blood pressure-lowering effect and safety of Chlorogenic acid from green coffee bean extract in essential hypertension.** *Clin. Exp. Hypertens.*, Tokyo, v. 28, n. 5, p. 439-449, 2006.

WEIDEMANN B, SCHLETTER J, DZIARSKI R. **Specific binding of soluble peptidoglycan and muramyl dipeptide to CD14 on human monocytes.** *Infect. Immun.* 1997; 65: 858–64.

WILLIAMS, R.J., SPENCER, J.P.E., RICE-EVANS, C., 2004. **Flavonoids: Antioxidant or signalling molecules?** *Free Radical Biology & Medicine* 36, 838-849.

WYLLIE AH, KERR JF, CURRIE AR. **Cell death: The significance of apoptosis.** *Int Rev Cytol*. 1980;68:251–306

WYLLIE, A. H. **The biology of cell death in tumors.** *Anticancer Res.*, n. 5, p. 131-142, 1985.

WOOTEN R M, MORRISON T B, WEIS J H, WRIGHT S D, THIERINGER R, WEIS J J. **The role of CD14 in signaling mediated by outer membrane lipoproteins of *Borrelia burgdorferi*.** *J. Immunol.* 1998; 160: 5485–92.

WRIGHT S D, RAMOS R A, TOBIAS P S, ULEVITCH R J, MATHISON J C. **CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein.** *Science* 1990; 249: 1431–3.

WU HZ, LUO J, YIN YX, WEI Q. **Effects of chlorogenic acid, an active compound**

activating calcineurin, purified from Flos Lonicerae on macrophage. *Acta Pharmacol Sin.* 2004 Dec;25(12):1685-9.

YAMAGUCHI, T.; CHIKAMA, A.; MORI, K.; WATANABE, T.; SHIOYA, Y.; KATSURAGI, Y.; TOKIMITSU, I. **Hydroxyhydroquinone-free coffee: a double-blind, randomized controlled dose-response study of blood pressure.** *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.*, v.18, p. 408–414, 2008.

YAMAMOTO, K.; ICHIJO, H.; KORSMEYER, S. J. **Bcl-2 is phosphorylated and inactivated by an ASK1/Jun N-terminal protein kinase pathway normally activated at G(2)/M.** *Mol. Cell. Biol.*, n. 19, p. 8469-8478, 1999.

YANG JS, LIU CW, MA YS, WENG SW, TANG NY, WU SH, JI BC, MA CY, KO YC, FUNAYAMA S, KUO CL. **Chlorogenic acid induces apoptotic cell death in U937 leukemia cells through caspase- and mitochondria-dependent pathways.** *In Vivo.* 2012 Nov-Dec;26(6):971-8.

YUN N, KANG JW, LEE SM. **Protective effects of chlorogenic acid against ischemia/reperfusion injury in rat liver: molecular evidence of its antioxidant and anti-inflammatory properties.** *J Nutr Biochem.* 2012 Oct;23(10):1249-55.

YAZID, S., NORLING, L. V., & FLOWER, R. J. (2011). **Anti-inflammatory drugs, eicosanoids and the annexin A1/FPR2 anti-inflammatory system.** *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 98, 94–100.

XU, Y.; CHEN, J.; YU, X.; TAO, W.; JIANG, F.; YIN, Z.; LIU, C. **Protective effects of Chlorogenic acid on acute hepatotoxicity induced by lipopolysaccharide in mice,** *Inflammation Research*, 2010.

XU D, HU L, XIA X, SONG J, LI L, SONG E, SONG Y. **Tetrachlorobenzoquinone induces acute liver injury, up-regulates HO-1 and NQO1 expression in mice model: The protective role of chlorogenic acid.** *Environ Toxicol Pharmacol.* 2014 Apr 26;37(3):1212-1220.

ZHAO, Z.; SHIN, H.S.; SATSU, H.; TOTSUKA, M.; SHIMIZU, M. **5-Caffeoylquinic Acid and Caffeic Acid Down—Regulate the Oxidative Stress-and TNF- α -induced Secretion of Interleukin-8 from Caco-2 Cells.** *J. Agric. Food. Chem.*, Tokyo, v. 56, p. 3863-3868, 2008.

ZHANG, X. MOSSER, D.M. 2008. **Macrophage activation by endogenous danger signals.** *J. Pathol.* 214:161-78.

ZHANG X, HUANG H, YANG T, YE Y, SHAN J, YIN Z, LUO L. **Chlorogenic acid protects mice against lipopolysaccharide-induced acute lung injury.** *Injury.* 2010 Jul;41(7):746-52.

ZIEGLER-HEITBROCK H W. **Molecular mechanism in tolerance to lipopolysaccharide.** *J. Inflamm.* 1995; 45: 13–26.

ANEXOS

ANEXO I – Parecer da Comissão de Ética no uso de Animais (Protocolo nº 439)

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

Ofício CEUA/FCF 10.2014-P439

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, da Universidade de São Paulo, **CERTIFICA** que o Projeto de Pesquisa "**Mecanismos moleculares do ácido clorogênico na resolução da inflamação: efeitos sobre neutrófilos e macrófagos**" (Protocolo CEUA/FCF/439), de responsabilidade do(a) pesquisador(a) **Tathiana da Cunha Castro Moreira**, está de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi **APROVADO** em reunião de 21 de fevereiro de 2014.

São Paulo, 24 de fevereiro de 2014.

Prof. Dr. Jollson de Oliveira Martins
Coordenador da CEUA/FCF/USP

ANEXO II – 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 - 8445411/1 - Tathiana da Cunha Castro Moreira

Email:	tathimoreira@gmail.com
Data de Nascimento:	31/12/1985
Cédula de Identidade:	RG - 56.952.281-X - SP
Local de Nascimento:	Estado do Mato Grosso do Sul
Nacionalidade:	Brasileira
Graduação:	Bacharel em Farmácia - Centro Universitário Nossa Senhora do Patrocínio - Brasil - 2012

Curso:	Mestrado
Programa:	Toxicologia e Análises Toxicológicas
Data de Matrícula:	21/01/2013
Início da Contagem de Prazo:	21/01/2013
Data Limite para o Depósito:	21/07/2015
Orientador:	Prof(a). Dr(a). Sandra Helena Poliselli Farsky - 21/01/2013 até o presente. E.Mail: sfarsky@usp.br
Proficiência em Línguas:	Inglês, Aprovado em 21/01/2013
Data de Aprovação no Exame de Qualificação:	Aprovado em 20/03/2014
Data do Depósito do Trabalho:	
Título do Trabalho:	
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 21/01/2013 Matrícula de Acompanhamento em 21/07/2014

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 5473 em vigor de 18/09/2008 até 19/04/2013)

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 21/07/2014

Impresso em: 21/08/14 19:34:19

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9141 - 8445411/1 - Tathiana da Cunha Castro Moreira

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBC5803-3/1	Sistemas de Garantia da Qualidade em Laboratórios de Ensaio	04/03/2013	17/03/2013	30	2	100	A	N	Concluída
FBC5802-3/2	Tópicos Avançados em Toxicologia I	05/03/2013	17/06/2013	15	1	90	A	N	Concluída
BMF5868-2/1	Neuroinflamação e as Doenças Neurodegenerativas (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	23/04/2013	27/05/2013	120	8	95	A	N	Concluída
FBC5752-2/4	Danos em Biomoléculas e o seu Papel no Monitoramento da Exposição a Agentes Tóxicos	05/06/2013	09/07/2013	45	3	100	A	N	Concluída
FBC5746-3/1	Comprometimento do Sistema Imunológico nas Intoxicações	05/08/2013	15/09/2013	120	8	100	B	N	Concluída
FBA5728-3/8	Aprimoramento Didático	15/10/2013	11/11/2013	60	4	87	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito da dissertação	
Disciplinas:	10	25	26
Estágios:			
Total:	10	25	26

Créditos Atribuídos à Dissertação: 71

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 21/07/2014

Impresso em: 21/08/14 19:34:19

ANEXO III – Currículo lattes

Tathiana da Cunha Castro Moreira

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/6981835810852581>

Última atualização do currículo em 07/09/2014

Resumo informado pelo autor

Farmacêutica generalista formada pelo pelo Centro Universitário Nossa Senhora do Patrocínio (CEUNSP), Mestranda em Toxicologia e Análises e Toxicológicas na USP. Tem experiência no âmbito hospitalar onde estagiou durante um ano, a partir de 2008, na Santa Casa de Sorocaba, atuando nas farmácias: central, pronto-socorro, centro-cirúrgico, e ainda no Controle de antibióticos e psicotrópicos. Fez Iniciação Científica na Universidade de Sorocaba na área de Farmacologia. Estagiou no Laboratório de Análises Clínicas do CEUNSP que faz atendimento gratuito à comunidade local e ao município de Capela do Alto.

(Texto informado pelo autor)

Dados pessoais

Nome	Tathiana da Cunha Castro Moreira
Filiação	Gilberto Moreira e Lucia Helena Rodrigues da Cunha C Moreira
Nascimento	31/12/1985 - Campo Grande/MS - Brasil
Carteira de Identidade	200523120021 SSP - MA - 20/03/2002
CPF	017.955.023-39
Endereço residencial	Rua Tacoma Brooklin Paulista - São Paulo 04561010, SP - Brasil Telefone: 11 97493357 Celular 11 977493357
Endereço profissional	Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas Avenida Professor Lineu Prestes Butantã - São Paulo 05508000, SP - Brasil Telefone: 11 30912197
Endereço eletrônico	E mail para contato : tathimorcira@gmail.com e-mail alternativo : tathimoreira@yahoo.com.br

Formação acadêmica/titulação

2013 Mestrado em Toxicologia e Análises Toxicológicas.
Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
Título: MECANISMOS DE AÇÃO DO ÁCIDO CLOROGÊNICO SOBRE A RESOLUÇÃO DA
INFLAMAÇÃO: EFEITOS EM NEUTRÓFILOS E MACRÓFAGOS
Orientador: Prof. Dra. Sandra Helena Poliselli Farsky

Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

2008 - 2012 Graduação em Farmácia.
Centro Universitário Nossa Senhora do Patrocínio, CEUNSP, Itu, Brasil
Título: Participação da anexina A1 sobre a expressão da proteína translocadora (TSPO) em células do
sistema imune.
Orientador: Prof. Dra. Sandra Helena Poliselli Farsky

Formação complementar

2014 Curso de curta duração em Programa de Aperfeiçoamento de Ensino.
Faculdade de Ciências Farmacêuticas / USP, FCF/USP, Brasil
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

2013 - 2013 Curso de curta duração em Citometria de fluxo.
Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil

Atuação profissional

1. Universidade de São Paulo - USP

Vínculo institucional

2012 - Atual Vínculo: Estágio , Enquadramento funcional: Estagiária, Regime: Dedicação exclusiva

Atividades

07/2012 - Atual Estágio, Faculdade de Ciências Farmacêuticas

*Estágio:
Laboratório de Toxicologia Experimental*

2. Centro Universitário Nossa Senhora do Patrocínio - CEUNSP

Vínculo institucional

2012 - 2012 Vínculo: Estudante , Enquadramento funcional: Estágio, Regime: Parcial

Atividades

07/2012 - 12/2012 Estágio, CEUNSP

*Estágio:
Laboratório de Análises Clínicas - Parasitologia, Imunologia, Microbiologia, Hematologia e Urinálise.*

3. Universidade de Sorocaba - UNISO

Vínculo institucional

2011 - 2011 Vínculo: Estágio , Enquadramento funcional: Aluna, Regime: Parcial

2010 - 2010 Vínculo: Estágio , Enquadramento funcional: Aluna, Regime: Parcial

2010 - 2011 Vínculo: Pesquisadora , Enquadramento funcional: Iniciação científica, Regime: Dedicação exclusiva

Atividades

02/2011 - 07/2011 Estágio, Uniso

*Estágio:
CAPS - Centro de Atenção Psicossocial (Atenção Farmacêutica).*

08/2010 - 07/2011 Pesquisa e Desenvolvimento, Uniso

*Linhas de pesquisa:
Farmacologia - etnofarmacologia, antinocicepção e anti-inflamatórios.*

06/2010 - 12/2010 Estágio, Uniso

*Estágio:
Laboratório analítico*

4. Santa Casa de Misericórdia de Sorocaba - SCMS

Vínculo institucional

2008 - 2009 Enquadramento funcional: Contrato , Carga horária: 44, Regime: Dedicação exclusiva

Atividades

12/2008 - 12/2009 Estágio, Santa Casa de Sorocaba

*Estágio:
Nas Farmácias: do Centro-cirúrgico, Pronto-socorro e Central. Controle de antibióticos e psicotrópicos da Instituição.*

Linhas de pesquisa

1. Farmacologia - etnofarmacologia, antinocicepção e anti-inflamatórios.

Áreas de atuação

1. Farmacologia e Toxicologia Experimental
2. Análises Clínicas
3. Farmácia Hospitalar

Projetos

Projetos de pesquisa

2013 - Atual Efeitos do ácido clorogênico sobre fenômenos celulares da resolução da inflamação

Situação: Em andamento Natureza: Projetos de pesquisa
Integrantes: Tathiana da Cunha Castro Moreira (Responsável); ; Profa. Dra. Sandra Helena Poliselli Farsky

2010 - 2011 Estudo da atividade antinociceptiva e anti-inflamatória do extrato bruto da *Solanum variabile* Mart.

Situação: Concluído Natureza: Projetos de pesquisa
Alunos envolvidos: Graduação (3); Doutorado (1);
Integrantes: Tathiana da Cunha Castro Moreira; Luciane Cruz Lopes (Responsável); maria carolina oliveira e silva; ana caroline manzutti

Projeto de extensão

Implantação da Farmácia Clínica na Santa Casa de Misericórdia de Sorocaba

2009 - Atual

Descrição: Participação no projeto de implantação de Farmácia Clínica na Santa Casa de Sorocaba.
Situação: Em andamento Natureza: Projeto de extensão
Integrantes: Tathiana da Cunha Castro Moreira (Responsável); ; EVELYN M. KRAHEMBUHL RAMOS

Idiomas

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

Página gerada pelo sistema Currículo Lattes em 07/09/2014 às 19:58:26.

ANEXO IV - Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/Doutorado

1. O candidato fará uma apresentação oral do seu trabalho, com duração máxima de trinta minutos.

2. Os membros da banca farão a arguição oral. Cada examinador disporá, no máximo, de trinta minutos para arguir o candidato, exclusivamente sobre o tema do trabalho apresentado, e o candidato disporá de trinta minutos para sua resposta.

2.1 Com a devida anuência das partes (examinador e candidato), é facultada a arguição na forma de diálogo em até sessenta minutos por examinador.

3. A sessão de defesa será aberta ao público.

4. Terminada a arguição por todos os membros da banca, a mesma se reunirá reservadamente e expressará na ata (relatório de defesa) a aprovação ou reprovação do candidato, baseando-se no trabalho escrito e na arguição.

4.1 Caso algum membro da banca reprove o candidato, a Comissão Julgadora deverá emitir um parecer a ser escrito em campo exclusivamente indicado na ata.

4.2 Será considerado aprovado o aluno que obtiver aprovação por unanimidade ou pela maioria da banca.

5. Dúvidas poderão ser esclarecidas junto à Secretaria de Pós-Graduação: pgfarma@usp.br, (11) 3091 3621.

São Paulo, 23 de maio de 2014.

Prof. Dr. Adalberto Pessoa Junior
Presidente da CPG/FCF/USP