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

Efeitos do ácido clorogênico sobre funções de neutrófilos: estudos *in vitro*

Karen Daher Belinati

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:
Prof. Dra Sandra Helena Poliselli Farsky

São Paulo
2010

Karen Daher Belinati

Efeitos do Ácido Clorogênico sobre funções de neutrófilos:
Estudos *in vitro*

Comissão Julgadora da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Sandra Helena Poliselli Farsky
orientador/presidente

_____
1º. examinador

_____
2º. examinador

São Paulo, _____ de _____.

Ao Waldmir e Barbara...

Pelo amor, pela educação, conselhos, exemplos e todo apoio...

Por sempre fazerem de tudo para me oferecer o melhor.

Sou eternamente grata por serem meus pais...

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela vida e por estar sempre presente em minha vida, me guiando sempre que necessário e dando forças para superar todos os obstáculos.

Aos meus pais Waldmir e Barbara, que sempre estiveram presentes, me incentivando, torcendo e sempre apoiando em todas as decisões tomadas por mm durante toda minha caminhada.

Ao meu irmão Tales, pela amizade, amor e carinho durante toda minha vida.

À prof. Dr. Sandra H. P. Farsky pela oportunidade de realização deste curso de mestrado em seu laboratório e por toda a orientação dada a mim neste período.

Ao Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes (FCF-USP/RP) que gentilmente cedeu o ácido clorogênico para a realização deste trabalho.

Aos colegas que se encontram presentes ou já passaram pelo Laboratório de Toxicologia Experimental, André Luiz Ribeiro, André Nakasato, Ana Lucia Shimada, Arícia Horácio, Carine Drewes, Camila Lima, Camila Araújo, Cristina Hebeda, Danielle Maia, Fernanda Pinedo, Gabriela Borracha, Gabriela Müller, Izabel, Kaline Waismam, Paloma Cristina, Rodrigo Dias e Simone Bolonheis pela convivência durante todo o período no laboratório,

À Cristina B. Hebeda e Simone M. Bolonheis que sou imensamente grata pela ajuda na realização da parte experimental deste trabalho.

A todos os colegas da pós-graduação, em especial Amanda, André Bairros, Ana Carolina, Beatriz Bismara, Beatriz Wittlin, Bruno, Cyro, Caroline, Filipe André, Graziella, Joseane, Larissa, Lívia Sanches, Lívia Dati, Lorena, Luana, Mariah, Rafael Menck, Raphael Caio, Simone, Susan, Tiago Oliveira e Vânia pela convivência e momentos agradáveis durante a realização deste mestrado.

Aos professores Dr. Maurício Yonamine, Dr. Ernani Pinto, Dra. Elizabeth de Souza Nascimento, Dra. Regina Lúcia de Moraes Moreau, Dra. Ana Paula Loureiro, Dra. Tania

Markourakis e aos funcionários Angelo, Helena, Luzia, Dalva, Roseli, Nancy, Sueli, Dora, Edna, Ana Dantas, Elaine e Jorge pela convivência agradável e por todo auxílio neste período dentro do Departamento.

Às amigas Beatriz Bismara, Danielle Maia, Fernanda Pinedo, Graziella Bozio, Kaline Waismam, Lívia Sanches pelas amizades que se iniciaram dentro do Departamento, mas que foram se tornando verdadeiras e essenciais nessa jornada.

Às minhas amigas de Londrina, Kisa Cavalieri, Natalia Kondo e Rafaele Moleiro que mesmo morando longe, sempre estiveram presente

Ao CNPq pela bolsa de auxílio à pesquisa no início do mestrado.

A todos que participaram direta ou indiretamente na realização deste trabalho...

... Muito obrigada!!!!!

LISTA DE ABREVIATURAS

5-CQA	Ácido 5-cafeoilquínico
AA	Ácido Aracdônico
ACG	Ácido Clorogênico
ALT	Alanina transaminase
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AST	Aspartato transaminase
BH4	Tetrabiopterina
C5a	fração 5 do sistema complemento
CD18	β2-Integrina
CD31	PECAM-1
CD62L	L-selectina
cNOS	Oxido Nitrico sintase constitutiva
COX	Cicloxigenase
DAD	Detector de Arranjo de Diodos
eNOS	Oxido Nitrico sintase endotelial
FAD	Flavina Adenina Dinucleotídeo
FITC	isotiocianato de fluoresceína
FLA2	Fosfolipase A2
fMLP	Formil-metionil-leucil-fenilalanina
FMN	Flavina Mononucleotídeo
GLP-1	Peptídeo do tipo glucagon-1
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
HUVEC	Célula Endotelial da Veia Umbilical Humana
ICAM-1	Molécula de Adesão Intercelular
IFN-γ	Interferon-gamma
IL	Interleucina
iNOS	Oxido nitrico sintase induzível
IRAK	Receptor de Interleucina-1 associados a quinases 4 e 1

JAM	moléculas de junções
LAD I	Deficiencia de adesão de leucócitos do tipo I
LAD II	Deficiencia de adesão de leucócitos do tipo II
LOX	Lipoxigenase
LPS	Lipopolissacarídeo de parede bacteriana
LTB4	Leucotrieno B4
MAPKs	Proteínas Quinases Ativadas por Mitógenos
MAPK 38	Proteína Quinase p38 Ativada por Mitógenos
MS	Espectometria de Massa
NADPH	Nicotina Amina Dinucleotídeo Fosfato
NFκB	Fator de Transcrição NFkappaB
NO	Óxido Nítrico
NOS	Óxido Nítrico Sintase
PAF	Fator de Ativação Plaquetária
PBS	Solução tamponada de fosfatos
PECAM-1	Molécula de adesão plaqueta-endotelial
PG	Prostaglandina
PGE2	Prostaglandina E2
PGH2	Prostaglandina H2
PMA	Acetato de Forbol Miristrato
PSGL-1	*P-selectin Glycoprotein Ligand-1*
TACE	Enzima conversora de fator de necrose tumoral alpha
TNF-RI	Receptor de Fator de Necrose Tumoral I
TNF-RII	Receptor de Fator de Necrose Tumoral II
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral
TRAF-6	Fator associado do receptor de fator de necrose tumoral-6
VCAM-1	Molécula de Adesão Vascular

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química dos precursores do ACG e do 5-CQA. 4

Figura 2. Processo de interação leucócito-endotélio. 15

Figura 3 Delineamento Experimental 29

Figura 4. Efeito do ACG sobre a viabilidade celular de neutrófilos. 30

Figura 5. Efeito do ACG sobre a secreção da citocina IL-1β por neutrófilos. 31

Figura 6. Efeito do ACG sobre a secreção da citocina TNF-α por neutrófilos. 32

Figura 7. Efeito do ACG sobre a produção de NO por neutrófilos. 33

Figura 8. Efeito do ACG sobre a secreção de NO por neutrófilos. 34

Figura 9. Efeito do ACG sobre a expressão de L-selectina por neutrófilos. 35

Figura 10. Efeito do ACG sobre a expressão de β2 integrina por neutrófilos. 36

Figura 11. Efeito do ACG sobre a expressão de PECAM-1 por neutrófilos. 37

Figura 12. Efeito do ACG sobre a aderência de neutrófilos *in vitro*. 38

Figura 13. Efeito do ACG sobre a quimiotaxia de neutrófilos *in vitro*. 39

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 1
1.1 Ácido clorogênico 1
1.2 Propriedades biológicas do ACG 5
1.3 Migração de neutrófilos no processo inflamatório agudo 10
1.4 Atividade secretória de neutrófilos no processo inflamatório agudo 17
2 OBJETIVO 21
3 MATERIAIS E MÉTODOS 22
3.1 Animais 22
3.2 Reagentes 22
3.3 Obtenção de neutrófilos migrados para o peritônio 23
3.4 Preparo da solução de ácido clorogênico 23
3.5 Viabilidade celular 24
3.6 Quantificação de moléculas de adesão 24
3.7 Determinação de óxido nítrico 25
3.8 Quantificação de Citocinas e de PGE2 25
3.9 Aderência in vitro 26
3.10 Quimiotaxia in vitro: Câmara de Boyden 27
3.11 Análise Estatística 28
4 RESULTADOS 30
4.1 Efeito do ACG sobre a viabilidade de neutrófilos 30
4.2 Efeito do ACG sobre a produção de citocinas pró-inflamatórias 31
4.2.1 Efeito do ACG sobre a secreção da citocina IL-1β 31
4.2.2 Efeito do ACG sobre a secreção de TNF-α 32
4.2.3 Efeito do tratamento com ACG sobre a produção de NO 33
4.2.4 Efeito do tratamento com ACG sobre a secreção de PGE2 34
4.3 Efeito do ACG sobre a expressão de moléculas de adesão por neutrófilos 35
4.3.1 Efeito do ACG sobre a expressão de L-selectina 35
4.3.2 Efeito do ACG sobre a expressão de β2-Integrina 36

4.3.3 Efeito do ACG sobre a expressão de PECAM-1 37
4.4 Efeito do ACG sobre a aderência in vitro 38
4.5. Efeito do ACG sobre a quimiotaxia in vitro 39
5 RESUMO DOS RESULTADOS OBTIDOS 40
6 DISCUSSÃO 41
7 CONCLUSÃO 49
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 50
ANEXOS 63

RESUMO

BELINATI, K.D. **Efeitos do ácido clorogênico sobre funções de neutrófilos: estudos *in vitro.*** 2010. 83 p. Dissertação (M) [Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, São Paulo]

Ácido clorogênico (ACG) é o termo utilizado para designar um grupo de compostos fenólicos oriundos da reação de esterificação entre ácidos hidroxicinâmicos (*p*-cumárico, caféico e ferúlico) e ácido quínico. São amplamente encontrados em produtos naturais e exercem ações antioxidantes, citotóxicas, antitumorais, antibacterianas, antifúngicas e antiinflamatórias. Apesar da descrição dos seus efeitos antiinflamatórios em diferentes modelos experimentais, a literatura é carente quanto suas ações específicas em funções inflamatórias de neutrófilos. Assim, o objetivo do presente trabalho foi investigar os efeitos do ACG sobre funções de neutrófilos *in vitro*. Neutrófilos foram obtidos do lavado peritoneal de ratos Wistar, machos, 4 horas após a injeção local de glicogênio de ostra a 1% e foram incubados, na presença ou ausência de LPS, com ACG nas concentrações de 25, 50, 100 ou 1000 µM. A viabilidade celular (exclusão por *trypan-blue*), a secreção de citocinas e prostaglandina E_2 (ensaio imunoenzimático); a produção de óxido nítrico (reação de Griess); a expressão de moléculas de adesão (citometria de fluxo); a aderência e a quimiotaxia foram avaliadas. Os resultados obtidos mostraram que o ACG não afetou as secreções do fator de necrose tumoral-α,de interleucina 1β, do óxido nítrico e de prostaglandina E_2 em condições basais ou após estimulação pelo LPS. Diferentemente, a incubação com ACG inibiu a aderência de neutrófilos à cultura primária de célula endotelial de microcirculação de ratos e a quimiotaxia *in vitro* frente ao peptídeo formilado (N-formil-metionil-leucil-fenilalanina). Estes últimos efeitos podem estar associados à ação do ACG sobre a expressão de moléculas de adesão, já que o ACG elevou a expressão de L-selectina e reduziu as expressões de β2 integrina e da molécula de adesão plaqueta e endotélio. Os dados obtidos não foram dependentes de alterações da viabilidade celular. Em conjunto, os resultados mostram que o ACG possui efeito direto sobre funções de neutrófilos responsáveis pela interação ao endotélio microvascular e pela migração orientada em resposta a estímulo inflamatório. Estes efeitos podem contribuir, pelo menos em parte, para redução da migração de neutrófilos para focos de inflamação na vigência de tratamento com ACG amplamente descrita na literatura.

Palavras-chaves: neutrófilo, ácido clorogênico, inflamação, mediadores inflamatórios, moléculas de adesão.

ABSTRACT

BELINATI, K.D. **Effects of chlorogenic acid on neutrophils functions: *in vitro* studies.** 2010. 83 p. Dissertação (M) [Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, São Paulo]

Chlorogenic acid (CGA) is the term utilized to design a group of phenolic compounds from the sterification reaction between the hydroxycinnamic acids (*p*-coumaric, caffeic and ferulic acid) and the quinic acid. They are largely found in natural products and exert anti-oxidant, citoxic, anti-tumoral, anti-bactericidal, anti-fungicidal and anti-inflammatory activity. Besides the description of its anti-inflammatory effect in different experimental models, the literature is scarse regarding its specific actions in neutrophil inflammatory functions. Therefore, the aim of this present work was to investigate the CGA effects on neutrophils functions *in vitro.* Neutrophils were obtained from the peritoneal lavage of male Wistar rats four hours after a local injection of oyster glycogen 1% and were incubated, in the presence or absence of LPS, with CGA in the concentrations of 25, 50, 100 or 1000 µM. The cellular viability (trypan-blue exclusion), the cytokines secretions (enzyme-linked immunosorbend assay), production of nitric oxide (Greiss reaction); adhesion molecules expression (flow citometry), adherence and chemotaxis *in vitro* were assessed**.** The results shows that the CGA did not affect the secretion of the tumor necrosis factor-α , of nitric oxide and prostaglandin E2 and only the incubation with 50µM of CGA inhibited the secretion of Interleukin 1β after stimulation with LPS. Differently, the incubation with CGA inhibited the adherence of neutrophils on the primary culture of endothelial cell from the micro-circulation of rats and the chemotaxis *in vitro* against formylated peptide (fenyl-metyl-leucyl-alanin). This lasts effects might be associated with the action of CGA on the expression of adhesion molecules, hence this compound was capable of elevate the expression of L-selectin and reduce the expression of β2 integrin and PECAM-1. The data here obtained are not dependent of cellular viability alterations. In conjunct, the data here obtained shows that the CGA has direct effect on neutrophils functions responsible of the interaction with the micro vascular endothelium and the oriented migration in response to an inflammatory stimuli. These effects can contribute, at least in part, to the decreased neutrophil migration in the inflammatory focus in the presence of CGA treatment.

Keywords: neutrophil, Chlorogenic acid, inflammation, adhesion molecules, inflammatory mediators.

1 INTRODUÇÃO

As plantas medicinais vêm sendo utilizadas desde a antiguidade para o tratamento de diversas doenças e, ainda hoje, desempenham, mundialmente, papel importante nas intervenções terapêuticas, uma vez que mesmo com o avanço observado na síntese de medicamentos, as plantas ainda têm enorme contribuição nos cuidados de saúde (CALIXTO, 2000; RATES, 2001). A prática da utilização de plantas para produção de medicamentos se encaixa na fitoterapia, que segundo a Agência Nacional de Sáude (ANVISA), medicamento fitoterápico é toda e qualquer preparação que contenha em sua composição a mistura de uma ou mais plantas medicinais, bem como de partes da planta tanto no estado bruto como processado (BRASIL, 2004).

O uso de medicamentos fitoterápicos vem aumentando gradativamente pela população, no entanto, na maioria das vezes, o emprego popular é realizado sem critérios adequados, ou seja, sem a fundamentação da literatura científica abrangente, o que pode resultar em efeitos tóxicos (CALIXTO, 2000; CAPASSO, 2000).

Por esse motivo, a realização de estudos mais aprofundados sobre propriedades farmacológicas e toxicológicas das plantas medicinais e de seus princípios ativos isolados; a regulamentação das plantas medicinais, bem como a educação e conscientização da população sobre a forma de cultivo e de utilização de medicamentos naturais são necessários para o uso seguro destes agentes (CALIXTO, 2000; COHEN *et al.,* 2000; RATES, 2001; COLALTO *et al.*, 2010).

1.1 Ácido clorogênico

Ácido clorogênico (ACG) é o nome utilizado para identificar um grupo de ésteres formados a partir da reação de esterificação entre os compostos fenólicos ácidos transcinâmicos (*p*-cumárico, ferúlico e caféico) e ácido quínico, originando uma diversidade de isômeros que se diferem pela posição do grupo hidroxila em que ocorre a esterificação (CLIFFORD, 1999; 2000; SIMÕES, *et al.,* 2003; MANACH *et al.,* 2004*;* DEGÁSPARI & WASZCZYNSKYJ, 2004).

O ACG foi primeiramente identificado e introduzido por Payen (1846), que designou este nome a um composto fenólico com função ácida e estrutura química desconhecida, que conferia cor verde em meio levemente alcalino quando exposto ao ar. Foi pela primeira vez isolado em 1907 na forma de complexo cristalino, denominado clorogenato de cafeína, e com sua estrutura química posteriormente estabelecida por Fisher (1932), como sendo o ácido 3-cafeoilquínico, hoje conhecido como ácido 5-cafeoilquínico (DE MARIA & MOREIRA, 2004).

Dentre os compostos da família dos ACGs, o ácido 5-cafeoilquínico (5-CQA), sintetizado a partir da esterificação de uma molécula do ácido caféico na hidroxila de posição 5 do anel aromático do ácido quinico, é um dos compostos mais abundantes e mais encontrados em alimentos naturais (CLIFFORD, 1999; 2000; SIMÕES, *et al.,* 2003; MANACH *et al.,* 2004*;* DEGÁSPARI & WASZCZYNSKYJ, 2004; HIGDON & FREI, 2006).

O ACG é abundante em grãos de café, frutas vermelhas, maçãs, cidra e em alguns vegetais, como a batata doce e cenoura, além de estar presente em vinhos e diferentes ervas como a *Ilex paraguariensis*, bastante utilizada para o preparo do chimarrão (BRAVO, 1998; CLIFFORD, 1999; DE MARIA *et al.,* 1999; FILIP *et al.,* 2001; DEGÁSPARI & WASZCZYNSKYJ, 2004). É importante salientar que o processo de torração do café causa progressiva destruição e transformação do ACG com cerca de 8 a 10% de perda comparada a 1% de perda no extrato seco (CLIFFORD, 1999). Com base em sua matéria seca, os grãos de café podem conter cerca de 6 a 10% de ACG em sua composição e é a fonte mais importante para humanos (CLIFFORD, 1999; 2000; HIGDON & FREI, 2006; TUNNICLIFFE & SHEARER, 2008). Tem sido proposto que, habitualmente, o consumo de café acarreta a ingestão de cerca de 300 mg a 1,0 g de ACG diariamente (CLIFFORD, 1999; 2000; OLTHOF *et al.,* 2001a).

Mesmo sendo o composto mais encontrado desta classe e o único disponível comercialmente, suas propriedades físico-químicas ainda não são totalmente conhecidas. Sua fórmula molecular é $C_{16}H_{18}O_9$ e massa molar 354,31 g/mol, com faixa de fusão entre 205 e 209 ºC. É estável em pH ácido a temperaturas moderadas e pode ser facilmente oxidado em pH alcalino. A solubilidade em água (25ºC) é de 4%, sendo

mais solúvel em água quente e levemente solúvel em acetato de etila (MERCK INDEX, 1996; FRIEDMAN & JÜRGENS, 2000). As estruturas químicas dos precursores dos ACGs, bem como do 5-CQA estão representadas na **Figura 1**.

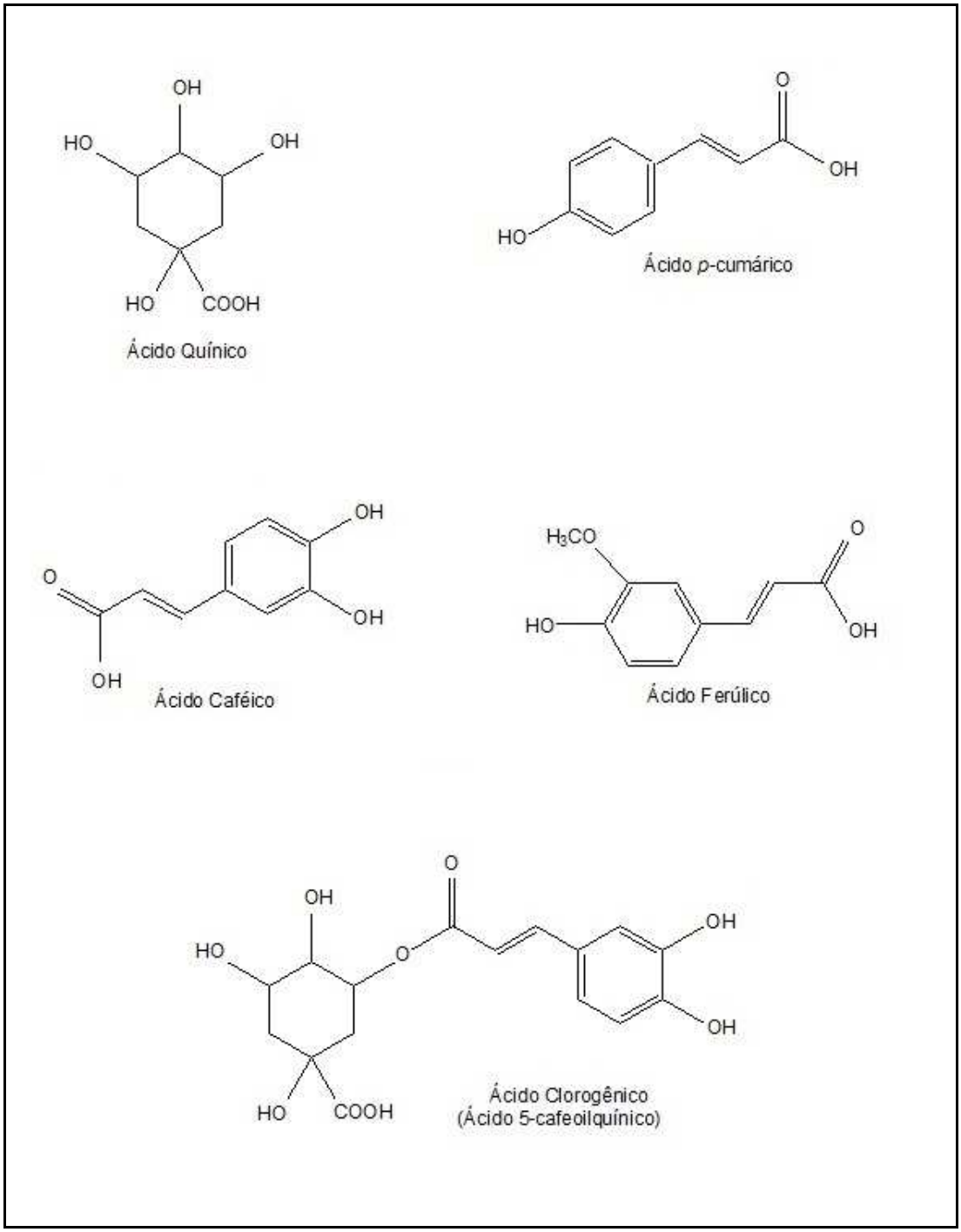

Figura 1. Estrutura química dos precursores do ACG e do 5-CQA.

1.2 Propriedades biológicas do ACG

Uma diversidade de trabalhos na literatura mostra que o ACG possui efeitos benéficos sobre diferentes quadros fisiopatológicos, sendo que sua ação antioxidante tem sido considerada o mecanismo de ação mais relevante (NARDINI *et al.,* 1995; EBERHARDT *et al.,* 2000; ZANG *et al.*, 2003; BIXBY *et al.,* 2005; BONITA *et al.,* 2007; HWANG *et al.*, 2009; HOELZL *et al.,* 2010). 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 induzidos por espécies reativas de oxigênio (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).

Se considerarmos a importância do estresse oxidativo na gênese de doenças, pode-se supor que os efeitos antioxidantes do ACG poderiam proteger o organismo de diferentes enfermidades. Neste contexto, a literatura tem tentado associar o benefício do consumo do ACG à saúde humana. Recentemente, 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 as 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), 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). Estes estudos, embora que sugestivos, corroboram o efeito protetor do ACG demonstrado em uma série de estudos *in vitro* e em

diferentes espécies animais (BIXBY *et al.,* 2005; SCHAEFER *et al.,* 2006; MIURA *et al.,* 2008; HWANG *et al.*, 2009).

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). Uma única administração de ACG (300-600mg/kg) reduziu a pressão arterial em ratos geneticamente hipertensos e a inclusão de 0,5% de 5-CQA na dieta desta mesma linhagem de animais inibiu o desenvolvimento do quadro hipertensivo (SUZUKI *et al.,* 2006). Da mesma forma, outro estudo mostrou 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 espécies reativas de oxigênio ou a inibição das enzimas que geram estas espécies possam estar envolvidas no efeito, favorecendo a manutenção da concentração de óxido nítrico (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 (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). Estudos experimentais têm mostrado que a associação do ACG ao tetra-hidrocurcumina traz maiores benefícios ao efeito anti-diabético (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, como já salientado um dos produtos naturais com maiores concentrações de ACG, está relacionado ao efeito anti-diabético. Adicionalmente, a administração de 1g de ACG modificou a tolerância à glicose, observado pelos níveis menores de glicose e de insulina nestes pacientes (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, 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). 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 sobre o potencial redox destas células, devido ao seu potencial anti-oxidante (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 antiinflamatório 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 previa 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 espécies reativas de oxigênio (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 ácido araquidônico, 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 µM, inibiu a capacidade de adesão de monócitos na célula endotelial humana e suprimiu a síntese gênica de IL-1β, 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. Injúria hepática em camundongos foi ocasionada pela injeção do lipopolissacarídeo da parede bacteriana (LPS) e 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 (NFκB), além da inibição da fosforilação da mesma fração do fator de transcrição (XU *et al.*, 2010).

Tem sido atribuído que muitos dos efeitos terapêuticos de fitoterápicos encontrados em diferentes regiões do mundo são decorrentes da ação do ACG encontrado entre seus componentes (CHEN *et al.,* 2000; YONATHAN *et al.,* 2006; OLMOS *et al.*, 2007; MARRASSINI *et al.,* 2010; TRINH *et al.,* 2010; HAN *et al.,* 2010). Neste contexto, nosso grupo de pesquisa mostrou que a administração i.p. do extrato hidro-alcóolico de *Solidago chilensis,* que no Brasil é popularmente conhecida como arnica do campo, causa atividade antiinflamatória *in vivo*, caracterizada pela inibição da migração de neutrófilos para o tecido subcutâneo inflamado. Neste trabalho foi observado efeito sistêmico do extrato, mesmo se este era administrado antes ou após o início do processo e que um dos mecanismos da redução do infiltrado de neutrófilo pode ser dependente, pelo menos em parte, da redução dos fenômenos de interação leucócito-endotélio. Por ensaios de microscopia intravital, verificou-se que a aplicação

tópica do extrato hidro-alcóolico reduziu o número de leucócitos em comportamento *rolling* e aderidos ao endotélio microvascular do mesentério (TAMURA *et al.,* 2009). A análise do extrato por cromatografia líquida de alta pressão associada à espectrometria de massa (HPLC-DAD-MS e HPLC-MS/MS) mostrou que o 5-CQA é um dos seus principais componentes (TAMURA *et al.,* 2009).

Vale ressaltar que apesar de diferentes tratamentos, quer seja com ACG ou com espécies de plantas e produtos naturais que contêm o ACG, inibirem a migração de neutrófilos em diversos modelos experimentais, não há dados na literatura que mostrem a ação direta deste ácido sobre funções inflamatórias de neutrófilos, principalmente quanto as suas funções ligadas à migração para focos inflamatórios.

1.3 Migração de neutrófilos no processo inflamatório agudo

Em condições fisiológicas, os leucócitos circulam na parte central do vaso sanguíneo e, na vigência de um estimulo inflamatório, são recrutados para o foco da lesão. Neste processo, ocorrem alterações vasculares como vasodilatação, formação de exsudados, que, em conjunto, resultam na diminuição do fluxo sanguíneo e recrutamento celular. Todos estes eventos são mediados pela ação de uma série de substâncias químicos como histamina, bradicinina, metabólitos do ácido araquidônico, fator de ativação plaquetária (PAF), NO, neuropeptídeos e citocinas liberadas ou secretadas por diferentes tipos celulares envolvidos no processo (ABBAS & LICHTMAN, 2003; SEELY *et al.,* 2003; ROIT & DELVES, 2004). A ação dos mediadores químicos contribui para marginação de leucócitos sobre a parede de vênulas pós-capilares, que é um processo altamente complexo, denominado interação leucócito-endotélio, e para subseqüente migração destas células para o foco de lesão, bem como para suas ativações (SEELY *et al.,* 2003; ROIT & DELVES, 2004; SCHMID-SCHÖNBEIN, 2006; KANTARI *et al.,* 2008; MEDZHITOV, 2008).

A **Figura 2** representa os processos envolvidos na interação leucócito-endotélio.

Dentre as células envolvidas no processo inflamatório, os neutrófilos são de grande importância na inflamação. São leucócitos polimorfonucleares, com seu núcleo formado por 2 a 5 lóbulos ligados entre si por finas pontes de cromatina. Este tipo celular, proveniente da medula óssea, é considerado o primeiro grupo celular a ser recrutado e responder a um estímulo lesivo no organismo. Representa em torno de 50 a 60% dos leucócitos circulantes totais e em torno de 90% dos fagócitos circulantes com um tempo de meia vida curta, de 6 a 9 horas no sangue circulante. Por alterações de fluxo sanguíneo ou pela ação de mediadores inflamatórios, os neutrófilos circulantes passam a marginar o endotélio microvascular. Este processo é mediado pela expressão de moléculas de adesão, expressas sucessivamente em ambos os tipos celulares e, subseqüentemente, conseguem transmigrar para o foco da lesão onde irão exercer suas funções fagocíticas e microbicidas (WITKO-SARSAT *et al.,* 2000; SEELY *et al.,* 2003; ROIT & DELVES, 2004; KANTARI *et al.,* 2008).

A primeira classe de moléculas de adesão envolvida neste processo pertence à família das selectinas (P - E- e L-selectinas), responsáveis pelo rolamento dos neutrófilos na superfície do endotélio. As selectinas possuem estrutura molecular comum, sendo que o sítio de ligação é um domínio extracelular N-terminal do tipo lectina. Desta forma seus ligantes são as próprias constituintes desta família ou carboidratos expressos constitutivamente na membrana celular, como as formas sialiladas e fucosiladas do tetrassacarídeo de sialil-Lewis^{x} e a mucina *P-Selectin Glycoprotein Ligand-1* (PSGL-1). As interações das selectinas aos ligantes específicos são fracas, sendo interrompidas facilmente, o que permite que os leucócitos deslizem sobre o endotélio arrastados pelo fluxo sangüíneo. Adicionalmente, as expressões destas moléculas são transientes, decorrente de clivagem ou reinternalização **(**HARLAN *et al.*, 1991; RAINER, 2002; ROITT & DELVES, 2004; SMALEY & LEY, 2005; LEY *et al.*, 2007; SMITH, 2008; LANGER & CHAVAKIS, 2009; CHAVAKIS *et al.,* 2009; CHOI *et al.,* 2010).

A L-selectina (CD62L) é exclusivamente expressa na membrana de leucócitos e na vigência de um estímulo inflamatório, medeia a captura inicial de neutrófilos à parede dos vasos, processo transitório e reversível conhecido como *rolling* (McEver *et*

al., 1995; HAFEZI-MOGHADAM, 2001; RAINER, 2002; PATEL *et al.*, 2002; SMALLEY & LEY, 2005; SMITH, 2008; LANGER & CHAVAKIS, 2009; CHAVAKIS *et al.,* 2009). Existe um *pool* de expressão na membrana celular que é ativado por diferenças hemodinâmicas ou por mediadores inflamatórios. Após ativação, a L-selectina é clivada pela ação de metaloproteases de membranas, como a ADAM-17, também conhecida como *tumor necrosis factor-α-converting enzyme* (TACE), e sua expressão é passageira. O *pool* é mantido por síntese gênica, a despeito da sinalização intracelular para sua expressão não estar devidamente esclarecida (UCHIMURA & ROSEN, 2006; BARTHEL *et al.,* 2007).

A P-selectina é encontrada em plaquetas e estocada nos corpos de Weibel-Palade na célula endotelial. Na vigência de estimulação, a P-selectina é rapidamente mobilizada para a membrana celular, permitindo sua interação com leucócitos circulantes (GENG *et al.*, 1990). A expressão na superfície celular é transiente e a molécula sofre reinternalização por endocitose para posterior expressão (SUBRAMANIAM *et al.,* 1993; SMITH, 2008). Adicionalmente, a P-selectina pode ser regulada transcripcionalmente e sua expressão induzida por LPS ou citocinas como fator de necrose tumoral alfa (TNF-α) e interleucina 1 beta (IL-1β) (PAN *et al.*, 1998; SMITH, 2008).

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

Uma desordem denominada *Leukocyte Adhesion Deficiency* II (LAD II) é caracterizada pela deficiência congênita na produção de ligantes fucosilados funcionais de selectinas, resultando em uma deficiência no rolamento dos leucócitos, que acomete a capacidade dos leucócitos migrarem subsequentemente para sítios de inflamação (LEY *et al.*, 2007; SMITH, 2007; LANGER & CHAVAKIS, 2009; CHAVAKIS *et al.,* 2009).

Uma vez em comportamento *rolling*, os neutrófilos são capazes de responder a substâncias quimiotáxicas, como leucotrieno B_4 (LTB4), a fração 5a do sistema complemento (C5a) ou quimiocinas, que por atuarem em receptores específicos nas membranas celulares levam à expressão qualitativa ou quantitativa das integrinas, que medeiam a firme adesão dos leucócitos ao endotélio. As integrinas são capazes de formar ligações entre a matriz extracelular e o citoesqueleto de neutrófilos, sendo responsáveis pela firme adesão do neutrófilo ao endotélio, bem como pela alteração da conformidade da célula, para posteriormente transmigrar para o foco da lesão. As integrinas são heterodímeros, compostos de uma subunidade α e uma subunidade β, e a perfeita interação entre estas confere o sítio de ligação extracelular. De acordo com a homologia da subunidade β e sua capacidade de ligar-se a diferentes subunidades α, as integrinas foram subdivididas em subfamílias. A subfamília de maior importância em neutrófilos é a família da β2-integrina, que por sua vez são heterodímeros não covalentes compostos de uma subunidade α (CD11) e uma subunidade β (CD18) expressos na superfície celular (ALBELDA, 1994; SEELY *et al.,* 2003; LEY *et al.,* 2007; LUO, *et al.,* 2007; SMITH,2008; CHAVAKIS *et al.,* 2009; LANGER & CHAVAKIS, 2009).

Esta subfamília é composta de 4 moléculas: CD11a/CD18 ou *Lymphocyte Function Associated-1* (LFA-1), *Macrophage Antigen-1* (Mac-1) ou CD11b/CD18, CD11c/CD18 e CD11d/CD18, que possuem um papel relevante na aderência de leucócitos à parede vascular. Diferentes mutações inibem a síntese da subunidade β 2, o que acarretam expressões protéicas reduzidas das diferentes moléculas pertencentes à esta subfamília e caracterizam uma doença conhecida como *Leukocyte Adhesion Deficiency* I (LAD I), que se manifesta em diferentes fenótipos de acordo com a severidade da mutação. Nos pacientes com LAD I ou em animais geneticamente modificados para deficiência de expressão da cadeia β2, os leucócitos deslizam sobre o endotélio normalmente, no entanto, possuem capacidade reduzida de adesão, o que compromete a subseqüente diapedese (ALBELDA, 1994; SEELY *et al.,* 2003; LEY *et al.,* 2007; LUO, *et al.,* 2007; SMITH,2008; CHAVAKIS *et al.,* 2009; LANGER & CHAVAKIS, 2009).

As β2 integrinas ligam-se a diferentes componentes da membrana celular e às moléculas de adesão da superfamília das imunoglobulinas, a saber: *intercelular cell adhesion molecule* (ICAM-1 ou 2), *vascular cell adhesion molecule (*VCAM-1), *platelet-endothelial cell adhesion molecule (*PECAM-1) (GONZÁLEZ-AMARO & SÁNCHEZ-MADRID, 1999). As imunoglobulinas possuem um domínio extracelular constituído por várias unidades repetidas homólogas a domínios de imunoglobulina G, uma região transmembrana e uma pequena cauda citoplasmática. São expressas em diferentes tipos celulares e as expressões de ICAM-1 e VCAM-1 no endotélio quiescente são baixas, mas suas expressões são aumentadas na presença de estímulo inflamatório (HUO & LEY, 2001). Diferentemente, as expressões constitutivas de ICAM-2, isoforma da ICAM-1, e PECAM-1 são significativas (HUO & LEY, 2001).

Como já salientado, a PECAM-1 possui expressão constitutiva e, interessantemente, sua expressão é preferencial nas bordas da célula endotelial, onde exerce papel relevante na manutenção das junções interendoteliais, juntamente com as moléculas da família das ocludinas, moléculas de junções (*junctional adhesion molecules* JAMs) e caderinas (GARRIDO-URBANI *et al.,* 2008). Adicionalmente, é uma molécula essencial para a transmigração de leucócitos para focos de inflamação, já que animais geneticamente modificados para menor expressão de PECAM-1 apresentaram prejuízo na transmigração neutrofílica (SCHENKEL *et al*., 2006). Adicionalmente, neutrófilos e monócitos, na presença de anticorpos monoclonais anti PECAM-1, apresentaram menores transmigrações *in vitro* (MULLER *et al.*, 1993).

Além da expressão endotelial, PECAM-1 também é expressa na superfície de células hematopoéticas e imunes, como plaquetas, neutrófilos, monócitos, megacariócitos, células *natural killer* (NK) e em alguns subtipos de linfócitos (MULLER, 2003; NOURSHARGH *et al.,* 2006).

A PECAM-1 liga-se a ela mesma e a uma variedade de outras moléculas que incluem as integrinas, a CD38 e CD177 expressas nas membranas celulares, sendo que os efeitos biológicos destas ligações tem sido confirmados *in vivo* e *in vitro*. É importante ressaltar que além da sua reconhecida atividade na transmigração leucocitária, a PECAM-1 está envolvida na angiogênese, apoptose, agregação

plaquetária e trombose (NEWMAN, 1997; ILAN & MADRI, 2003; SOLOWIEJ *et al.,* 2003; WOODFIN *et al.,* 2007).

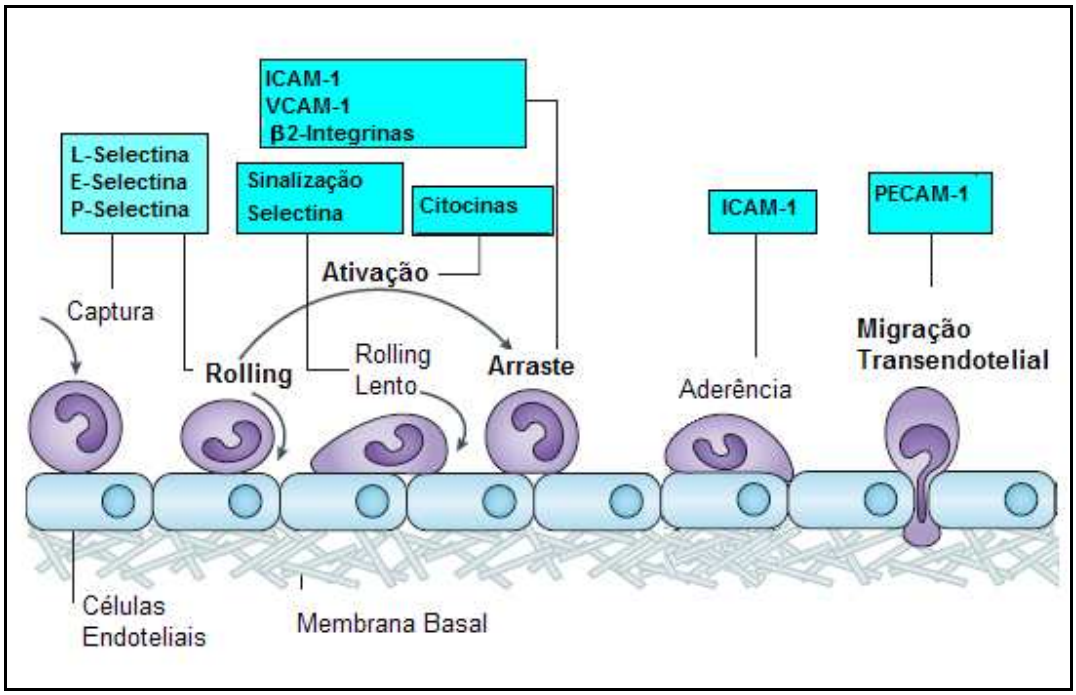

Figura 2. Processo de interação leucócito-endotélio. (Adaptado: Ley *et al.,* 2007).

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

localização dos receptores de membrana. Estas alterações conferem alterações morfológicas e funcionais para a polaridade celular (SWANEY *et al.,* 2010).

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

Após estimulados, os leucócitos sofrem alterações morfológicas e funcionais, tornando-se polarizados, ou seja, adquirem forma alongada, com o surgimento de um amplo lamelipódio na extremidade anterior e um uropódio posterior. Esta polarização está associada a uma reoorganização da membrana plasmática, com agrupamento de receptores de membrana, além da alteração intracelular do citoesqueleto. O núcleo e centríolo passam a se localizar na parte posterior da célula e os microtúbulos e microfilamentos de actina se rearrajam e se agrupam para conferir direcionamento e movimento, respectivamente (MALECH *et al.,* 1977; ZIGMOND *et al.,* 1981).

Dentre as substâncias quimiotáxicas para neutrófilos se destacam o fator de agregação plaquetária (PAF), peptídeos formilados constituintes da parede bacateriana, como o formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLP), fator C5a do sistema complemento e a interleucina-8 (IL-8). Em comum, estes agentes ligam-se a receptores de membrana, em geral, receptores transmembranas ligados à proteína G (STILLIE *et al.,* 2009). A

ativação destes receptores leva a sinalizações intracelulares complexas, que desencadeiam não somente a migração orientada, mas também a desgranulação, a secreção de mediadores inflamatórios e a ativação do *burst* respiratório em neutrófilos (JANETOPOULOS & FIRTEL, 2008).

Do exposto, fica evidente que o processo de migração de neutrófilos para os focos de lesão é complexo e dependente de uma variedade de moléculas de adesão. Estas, em conjunto com mediadores químicos, induzem sinalizações intracelulares para as funções adesivas e locomotoras dos neutrófilos.

1.4 Atividade secretória de neutrófilos no processo inflamatório agudo

Como já salientado para quimiotaxia, o processo de recrutamento de leucócitos, bem como as diferentes funções das células do sistema imune, são regulados por substâncias químicas secretadas por diferentes células envolvidas no desenvolvimento da inflamação. Neste contexto, os neutrófilos secretam uma diversidade destas substâncias, que atuam de maneira autócrina ou parácrina para a instalação, desenvolvimento e resolução do proceso.

Os mediadores inflamatórios, na sua maioria, ligam-se a receptores específicos em membranas celulares e atuam de forma parácrina, autócrina ou exócrina. Os mediadores químicos, pelas suas especificidades e cinética de secreção e/ou produção, orquestram o processo inflamatório (ABBAS & LITCHMAN, 2003; FORTE, 2004; ROIT, 2004).

Prostaglandinas (PGs) compreendem pequenas moléculas lipídicas capazes de regular inúmeros processos no organismo como a função renal, agregação plaquetária, liberação de neurotransmissores e também tem importante papel na modulação da resposta imune. A produção de PGs inicia com a liberação de ácido araquidônico (AA) de fosfolipídeos de membrana pela enzima fosfolipase A2 (FLA2) em resposta a um estímulo inflamatório. Em seguida, o AA sofre ação das enzimas lipoxigenases (LOX), que dão origem aos leucotrienos, e cicloxigenases (COX), que catalisam a formação de

PGs e tromboxano. Durante a síntese de PGs, o AA é convertido em prostaglandina H_2 (PGH_2) pelas enzimas cicloxigenase 1, 2 e 3 (COX-1, COX-2 e COX-3), também conhecidas como prostaglandina endoperóxido H sintases. A COX-1 é expressa de forma constitutiva na maioria dos tecidos do organismo e atua mantendo processos homeostáticos como a secreção da mucosa gástrica e a COX-3, que é uma isoforma da COX-1, é expressa principalmente no cérebro de maneira constitutiva. Pelo contrário, a COX-2 é uma enzima expressa por estímulos inflamatórios, como por exemplo pela ação de citocinas (TNF-α e IL-1β), de fatores de crescimentos ou pela estimulação pelo LPS ou ésteres de forbol, estando envolvida principalmente na regulação da inflamação. As prostaglandinas sintases convertem a PGH_2 em uma série de PGs como a prostaciclina (PGI_2), PGF_2, PGD_2 e PGE_2. A PGE_2 está envolvida na regulação de inúmeras funções biológicas desde reprodução, até função neural, metabólica e imunológica e pode ser liberada por diferentes células do sistema imune. Na inflamação, está envolvida em todos os processos que levam aos sinais clássicos da inflamação como rubor, calor, tumor e dor. Os neutrófilos possuem grande quantidade de AA em sua membrana, bem como expressam as COX e LOX, sendo, portanto, uma fonte importante de lipídeos bioativos em respostas inflamatórias inatas (SMITH, 1994; WISE, 1996; DANNHARDT & KIEFER, 2001; HARRIS *et al.,* 2002; BLACKWELL *et al.,* 2010; FÉLETOU *et al.,* 2010).

O TNF-α é uma citocina sintetizada por monócitos, macrófagos, célula endotelial, neutrófilos e linfócitos na presença de um estímulo inflamatório, após ativação de NF-κB. Após ser produzido e clivado pela ação da enzima conversora de TNF-α (TACE), é liberado e a sua ação nas células-alvo, ocorre pela ligação a receptores específicos, denominados receptores de TNF I e II (TNF-RI e TNF-RII). O TNF-RI é expresso constitutivamente nas células, enquanto o TNF-RII é induzido pela ação de metaloproteinases em resposta a sinais inflamatórios. Quando liberado no local da resposta inflamatória, promove ativação celular bem como a liberação de outras citocinas e mediadores químicos. Além disso, é responsável também pela expressão de moléculas de adesão como P-Selectina, ICAM-1 e VCAM-1 e de citotoxicidade de células fagocíticas frente à presença de vírus ou bactérias (DINARELLO & MOLDAWER, 2000; ABBAS & LITCHMAN, 2003; SEELY, 2003; FORTE, 2004; ROITT, 2004; ISHII *et al.,* 2010)

A IL-1β é uma citocina produzida por diferentes tipos celulares na vigência de um estímulo inflamatório, entre os quais neutrófilos. É sintetizada na forma de precursor (pró-IL-1) e sua ativação se dá pela ação da enzima caspase-1. A sua síntese é estimulada pela ativação do NF-κB e pode induzir a produção de TNF-α e de IL-6 por macrófagos. É uma citocina importante, uma vez que é responsável por iniciar e manter a expressão da COX-2 e da iNOS, o que explica o montante de PGE2 e NO produzido por células expostas a IL-1. Ainda, atua em sinergismo com TNF-α mediando a resposta inflamatória, estimulando a ativação das moléculas de adesão P-Selectina, ICAM-1 e VCAM-1, bem como a citotoxicidade de células fagocíticas (DINARELLO & MOLDAWER, 2000; ABBAS & LITCHMAN, 2003; FORTE, 2004; ROITT, 2004; FAN *et al.,* 2007; NETEA, 2010).

O NO é um radical livre, gasoso, de meia-vida curta (3 a 5 segundos) e constitui um dos mais importantes mediadores químicos no organismo. É um radical oriundo da reação do aminoácido essencial L-arginina com o oxigênio, pela ação de enzimas denominadas oxido nítrico sintases (NOS). As NOS podem ser constitutivamente expressas (cNOS) ou induzidas (iNOS). Ambas atuam como homodimeros, tendo um dominio C-terminal com atividade de redutase que apresenta sítios de ligação para flavina-adenina dinucleotídeo (FAD) flavina mononucleotídeo (FMN) e nicotinamida-adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) e um domínio N-terminal com atividade de oxigenase com sítios de ligação para tetrabiopterina (BH_4), L-arginina e heme. Ainda, as cNOS dividem-se em duas isoformas, a NOS neuronal (nNOS), identificada primeiramente em neurônios e a NOS endotelial (eNOS), inicialmente observada no endotélio. A atividade de ambas é dependente da concentração de cálcio e calmodulina intracelular em resposta a neurotransmissores e substâncias vasoativas, como bradicinina envolvidas na sinalização celular. Já a atividade da iNOS independe da concentração intracelular de cálcio e sua síntese se dá a partir da ativação de células como neutrófilos e macrófagos frente a estímulos inflamatórios como o TNF-α e IL-1β (SETHI & DIKSHIT, 2000; COSTA & FABENI, 2003).

O NO desempenha diferentes papéis na resposta imune. Quando gerado pela eNOS, tem como papel primordial o relaxamento do endotélio vascular. Após a chegada do neutrófilo no foco da lesão, a interação dessas células com citocinas como,TNF-α e IL-1β, ativa a síntese da iNOS dando origem a altas concentrações de NO. A geração de NO pelos neutrófilos nestas condições resulta em citotoxicidade, que pode ser decorrente tanto da sua ação direta ou da sua reação com outros compostos liberados durante o processo inflamatório. Na vigência de um processo inflamatório, células fagocíticas secretam simultaneamente NO e espécies reativas de oxigênio (EROs) como ânion superóxido (O_2^-) e a ação citotóxica direta do NO consiste, principalmente, na reação com essas EROs. A reação entre NO e O_2^- resulta na formação de peroxinitrito ($ONOO^-$), um poderoso oxidante de proteínas (SETHI & DIKSHIT, 2000; COSTA & FABENI, 2003; TRIPATHI *et al.,* 2007a; 2007b; ALVES-FILHO *et al.,* 2008).

Acima foi descrito alguns dos mediadores secretados por neutrófilos na vigência de resposta inflamatória aguda. Como já salientado anteriormente, os neutrófilos são células relevantes para a inflamação aguda e a interferência terapêutica, quer seja nos processos de locomoção para o foco de lesão, bem como em suas atividades secretórias, tem sido investigada por cientistas e de grande interesse para a indústria farmacêutica. Desta forma, o esclarecimento dos mecanismos de ação de novas moléculas que atuem especificamente em cada etapa do processo poderá trazer benefícios para terapia farmacológica do processo inflamatório.

2 OBJETIVO

Visto que o ACG é componente importante em uma diversidade de alimentos e produtos naturais e exerce efeitos biológicos relevantes, entre os quais antiinflamatórios, e que não há evidências da ação direta deste ácido sobre ações inflamatórias de neutrófilos, o objetivo do presente trabalho foi avaliar os efeitos do ACG, *per se*, sobre funções de neutrófilos envolvidas na reação inflamatória inata.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

O presente trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (ANEXO I).

Para a realização deste trabalho, ratos *Wistar* machos, com 6 a 8 semanas de idade e peso entre 180 a 220 g foram fornecidos pelo Biotério do Instituto de Química e da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Os animais foram mantidos em condições normais de biotério, com ciclo de luz e temperatura controlados, bem como acesso a alimento e água *ad libidum* até início dos ensaios.

Os procedimentos experimentais foram realizados após indução de anestesia com cloridrato de ketamina (80 mg/Kg) e cloridrato de xilazina (8 mg/Kg).

3.2 Reagentes

REAGENTE	**MARCA**	**Nº CATÁLOGO**
Anticorpo Anti-CD18	BdBIOSCIENCE	554979
Anticorpo Anti-CD31	BdBIOSCIENCE	555026
Anticorpo Anti-CD62L	BdBIOSCIENCE	554963
Ácido Clorogênico	Sigma-Aldrich	C3878
Albumina	Sigma-Aldrich	A7030
DMEM	Gibco	12100-046
Glicogênio de Ostra	Sigma-Aldrich	G-8751
Lipopolissacarídeo de *E. coli* sorotipo 026:B6	Sigma-Aldrich	L3755
RMPI1640	Sigma-Aldrich	R-4130
Soro Fetal Bovino	Invitrogen	12657029
Kit IL-1β	R&D Systems	DY501
Kit TNF-α	Ebioscience	88-7340-88
Kit PGE2	Cayman chemical	500651

3.3 Obtenção de neutrófilos migrados para o peritônio

Foram injetados 10 mL de solução de glicogênio de ostra (1%, i.p.) para estimular o recrutamento de leucócitos para cavidade peritoneal. Após um período de 4 horas, os animais foram novamente anestesiados e exsanguinados por secção da artéria carótida. Em seguida, 10 mL de solução tampão fosfato-salina (PBS) foram injetados na cavidade peritoneal e após suave massagem, as células foram removidas com auxílio de pipeta *Pasteur.*

As células obtidas foram submetidas à centrifugação (600*g*, 15 min, 4 ºC) e o *pellet* formado foi ressuspendido em 1 mL de meio RPMI 1640 suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (R10). A quantificação total de neutrófilos foi feita em câmara de Neubauer. Um total de 1 x 10^6 neutrófilos foram adicionados por poço em placas de cultura de 96 poços, com volume final completado para 300 µL com meio R10, para obtenção da cultura celular empregada nos ensaios descritos abaixo.

3.4 Preparo da solução de ácido clorogênico

O ACG foi obtido da Sigma (U.S.A.) e gentilmente cedido pelo laboratório do Prof. Dr. Norberto Peporini Lopes (Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo de Ribeirão Preto/SP).

Como já salientado na Introdução, o ACG possui fórmula molecular $C_{16}H_{18}O_9$ e massa molar 354,31g/mol, com faixa de fusão entre 205 a 209 ºC, é estável em pH ácido a temperaturas moderadas e solúvel em água quente (MERCK INDEX, 1996; FRIEDMAN & JÜRGENS, 2000). Desta forma, para a realização dos ensaios, o ACG foi solubilizado em PBS estéril em concentração de 10 mM. A partir desta solução, concentrações de 25, 50, 100 ou 1000 µM foram preparadas por diluição seriada em meio de cultura.

3.5 Viabilidade celular

Para excluir possíveis efeitos citotóxicos do ACG sobre neutrófilos, ensaios de viabilidade celular foram realizados. Para tanto, neutrófilos foram mantidos em cultura por 18 horas com incubação simultânea de ACG e LPS (5µg/mL; sorotipo 026:B6 de *Escherichia coli*), em estufa de CO_2 (atmosfera úmida, a 37ºC 5% CO_2). Vale ressaltar que este foi o maior período de incubação empregado neste estudo. Após o período de incubação, 10 µL de suspensão de neutrófilos foram acrescidos a 10 µL de azul de tripan e a quantificação das células viáveis (não coradas) foi realizada em camara de Neubauer.

3.6 Quantificação de moléculas de adesão

O efeito do ACG sobre a expressão das moléculas de adesão L-selectina, β2-integrina e PECAM-1 foi quantificado por citometria de fluxo. Os neutrófilos foram incubados por 1 hora com ACG nas concentrações de 25, 50, 100 ou 1000 µM, simultaneamente ao LPS, em estufa (atmosfera úmida, a 37 ºC, 5% CO_2). Após este período, as células foram lavadas 2 vezes com PBS (600*g*, 4°C, 10min) e em seguida incubadas com anticorpos monoclonais anti-CD62L (L-selectina, 0,5 mg/mL), anti-CD18 (β2-integrina, 0,5 mg/mL), conjugados ao fluoróforo isotiocianato de fluoresceína (FITC, diluição 1:100) e anti-CD31 (PECAM-1, 0,5 mg/mL), conjugado ao fluoróforo ficoeritrina (PE, diluição 1:100) durante 20 minutos a 4 ℃.

As leituras foram realizadas em citômetro de fluxo FACScalibur (Becton&Dickinson, São José, USA) e os dados de 10.000 eventos foram obtidos. Destes, apenas neutrófilos morfologicamente viáveis foram considerados para análise.

3.7 Determinação de óxido nítrico

Para quantificação indireta da produção de NO, neutrófilos foram mantidos em cultura por 18 horas com incubação simultânea de ACG (25,50, 100 ou 1000 µM) e LPS (5 µg/mL; sorotipo 026:B6 de *Escherichia coli*), em estufa de CO_2 (atmosfera úmida, a 37ºC 5% CO_2). Após a incubação, a concentração de nitrito (NO_2^-) foi determinada no sobrenadante das culturas de neutrófilos utilizando a reação de Griess. Em resumo, 100µL dos sobrenadantes foram adicionados a 100 µL do reagente de Griess (1% de sulfanilamida com 0,1% de α-naftil etilenodiamina, preparado no momento do uso) em placas de 96 poços. Após 10 minutos de incubação em temperatura ambiente, a absorbância de cada amostra foi determinada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 550nm. A concentração de NO_2^- das amostras foi determinada a partir de uma curva padrão de nitrito de sódio ($NaNO_2$).

3.8 Quantificação de Citocinas e de PGE2

As citocinas pró-inflamatórias IL-1β e TNF-α e a PGE2 foram quantificadas no sobrenadante de cultura de neutrófilos após serem incubadas simultaneamente por 18 horas com as diferentes concentrações de ACG (25,50, 100 ou 1000 µM) e LPS (5 µg/mL; sorotipo 026:B6 de *Escherichia coli*), em estufa de CO_2 (atmosfera úmida, a 37 ºC 5% CO_2). A quantificação destas citocinas e do derivado do ácido araquidônico foi realizada pelo método de ELISA, utilizando *kits* comerciais e de acordo com a metodologia fornecida pelos fabricantes. Os protocolos de ensaios podem ser observados no site da BD Biosciences (www.bdbiosciences.com) e da R&D Systems (http://www.rndsystems.com).

3.9 Aderência *in vitro*

Neste ensaio foi avaliado o efeito do ACG sobre a capacidade dos neutrófilos aderirem sobre cultura de células do endotélio microvascular. O preparo de cultura celular foi descrito inicialmente por Chen e colaboradores (1995) e modificado por Lotufo e colaboradores (2001).

Após o sacrifício dos animais, o músculo cremaster foi isolado, cortado em pedaços de aproximadamente 2 x 2 mm e dois fragmentos foram colocados em cada poço de uma placa de 24 poços, juntamente com meio de cultura DMEM suplementado com 20% de soro fetal bovino e 1% de gentamicina. Após 48 horas, os pedaços de músculo foram retirados e o meio de cultura foi trocado. Após confluência, as células foram subcultivadas com solução de tripsina-EDTA em placas de 96 poços. O ensaio de aderência foi realizado apos as células novamente adquirirem confluência.

Para tanto, as células endoteliais foram estimuladas com LPS (5 μg/mL) durante quatro horas (37 ^{o}C, 5% CO_2, atmosfera úmida). Em seguida, as células foram lavadas três vezes com solução de Hanks e incubadas com neutrófilos ($2x10^5$) previamente tratados durante uma hora com 50, 100 ou 1000 μM de ACG (37 ^{o}C). Após 30 minutos de incubação, o endotélio e os neutrófilos aderidos foram lavados cuidadosamente com Hanks (37 ^{o}C) e lisados com 100 μL de solução de Triton X-100 (1% em Hanks) durante 15 minutos a 4 °C. Em seguida, a atividade de mieloperoxidase foi determinada adicionando-se 100 μL de solução contendo partes iguais de TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina) e peróxido de hidrogênio. Após 30 minutos a reação foi bloqueada pela adição de 50 μL de H_2SO_4 (1M) e a absorbância foi determinada em espectrofotômetro em comprimento de onda de 450 nm. O número de neutrófilos aderidos foi calculado correlacionando-se as absorbâncias com uma curva padrão construída com quantidades conhecidas de neutrófilos.

3.10 Quimiotaxia *in vitro*: Câmara de Boyden

O ensaio de migração *in vitro* foi realizado em câmara de quimiotaxia conforme previamente descrito por Boyden (1962) e modificada por Zigmond e Hirsch (1973).

Para avaliar os efeitos do ACG sobre a migração de neutrófilos, alíquotas da suspensão celular contendo 1,5 x 10^6 neutrófilos (em solução de Hanks' contendo 0.01% de albumina) na presença ou ausência de ACG (50, 100 ou 1000 μM) foram adicionadas ao compartimento superior da câmara sobre um papel filtro de celulose com diâmetro médio de poro de 8μM (Millipore). Nos compartimentos inferiores da câmara foram adicionados somente Hank's ou Hank's contendo o agente quimiotáxico fMLP (10^{-8}M). O sistema foi incubado por 2 horas (atmosfera úmida, 37 ^oC, 5% CO_2) e, após este período, os filtros foram removidos para posterior fixação e coloração. Para tanto, os filtros foram imersos na seguinte sequência de reagentes: etanol absoluto por 5 minutos, água destilada por 2 minutos, hematoxilina por 1 minuto, água destilada por 2 minutos, *Tap Water* (1% de sobrenadante de solução saturada de lítio em água destilada) por 10 minutos, etanol 70% por 10 minutos, etanol 95% por 10 minutos, butanol/etanol (80/20, v/v) por 10 minutos, e, por fim, xilol *overnight*.

A distância percorrida pelos neutrófilos no interior dos filtros foi determinada em microscópio óptico conforme previamente descrito por Zigmond e Hirsch (1973). Utilizando a objetiva de 40X, a distância foi quantificada pela diferença entre a parte do filtro que continha o maior número de neutrófilos, distribuídos de forma homogênea, e o plano contendo pelo menos 2 neutrófilos. O ensaio foi realizado em duplicata e 5 campos de cada filtro foram avaliados.

3.11 Análise Estatística

Os resultados obtidos estão representados como média ± erro padrão da média (e.p.m.) e as análises estatísticas realizadas foram feitas pelo teste de Análise de Variância (ANOVA) com correção de Bonferroni quando necessário e seguido pelo Teste de Significância de Tukey-Kramer quando diferença estatisticamente significante entre grupos. Para a realização da análise estatística o programa GraphPad PRISM versão 5.0 foi utilizado.

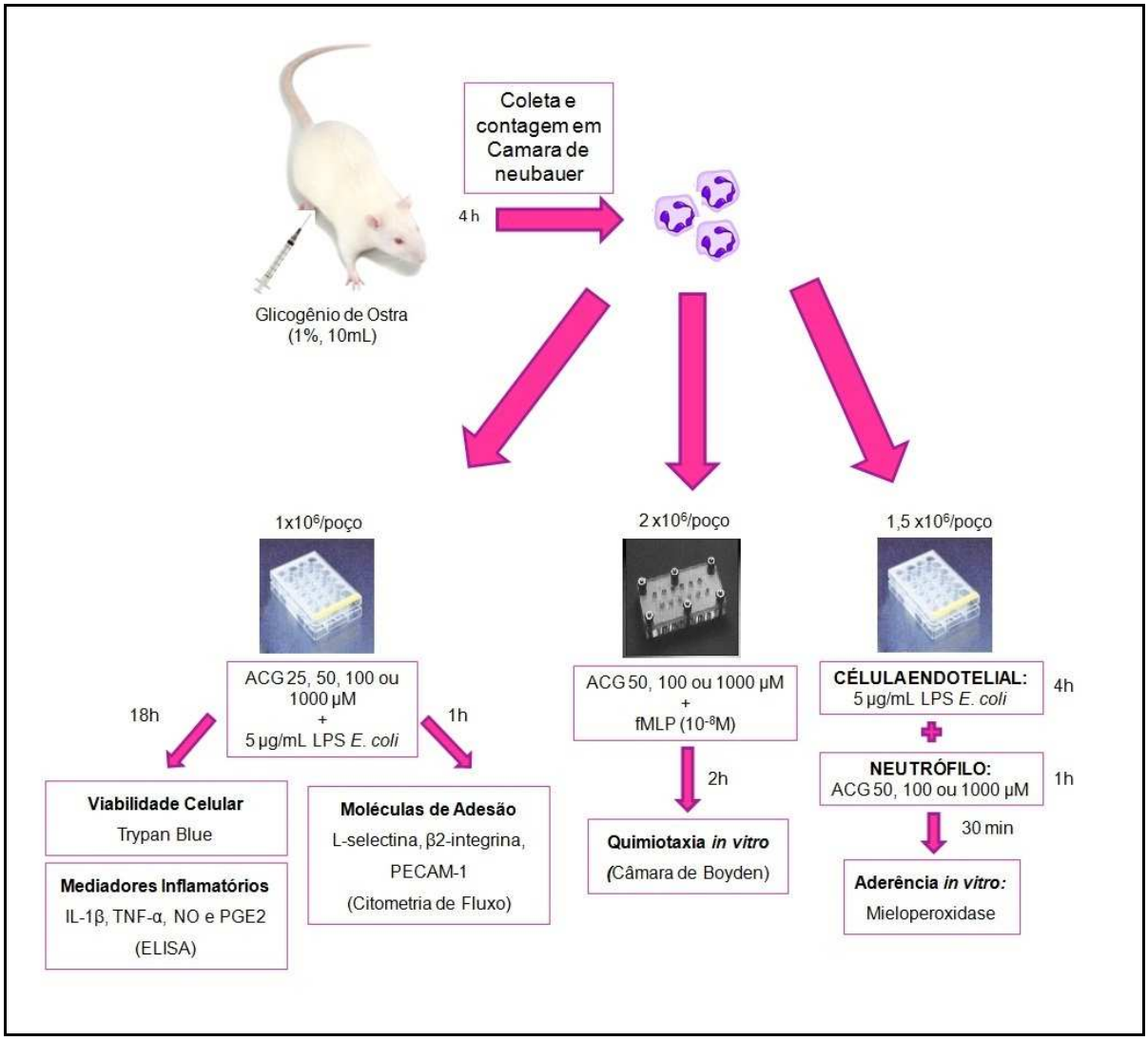

Figura 3 Fluxograma do Delineamento Experimental do Projeto "Efeitos do ácido clogorênico sobre funções de neutrófilos: estudos *in vitro*"

4 RESULTADOS

4.1 Efeito do ACG sobre a viabilidade de neutrófilos

Os resultados apresentados na **Figura 4** mostram que o ACG não afeta a viabilidade de neutrófilos, tanto na presença como na ausência de LPS, garantindo que os resultados obtidos nos ensaios subseqüentes não são decorrentes de morte celular.

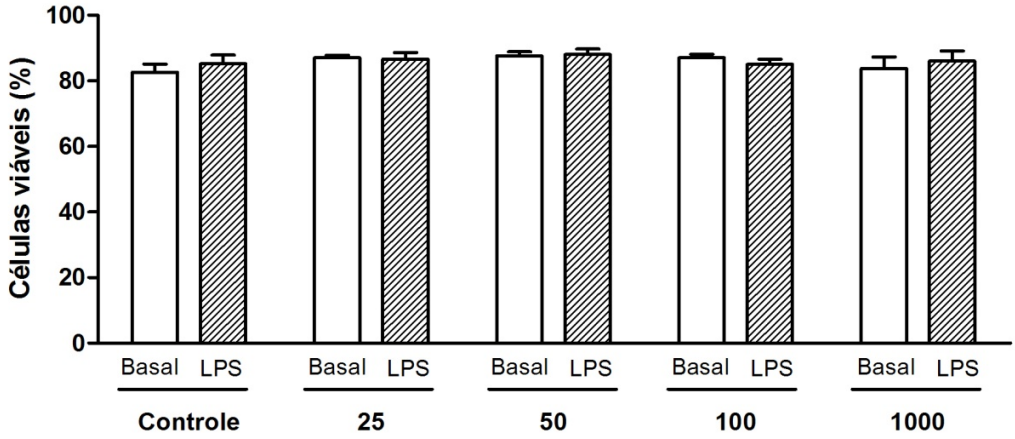

Figura 4. Efeito do ACG sobre a viabilidade celular de neutrófilos. Neutrófilos foram obtidos da cavidade peritoneal de ratos Wistar machos (glicogênio de ostra 1%, 4 horas). Neutrófilos (1x 10^6) foram incubados na presença ou ausência de LPS (5 µg/mL) juntamente com ACG (25, 50, 100 ou 1000 µM) por um período de 18 horas. A viabilidade foi quantificada pela coloração com azul de tripan em microscopia óptica. Os resultados expressam a média ± e.p.m. de células obtidas de 6 animais.

4.2 Efeito do ACG sobre a produção de citocinas pró-inflamatórias

4.2.1 Efeito do ACG sobre a secreção da citocina IL-1β

Os resultados obtidos mostram que o LPS é um estímulo eficiente para indução da secreção de IL-1β, uma vez que a secreção da citocina foi significantemente aumentada em células estimuladas pelo lipopolissacarídeo. Adicionalmente, os dados mostram que a incubação com o ACG, em todas as concentrações testadas, não afetou a secreção basal de IL-1β (**Figura 5**).

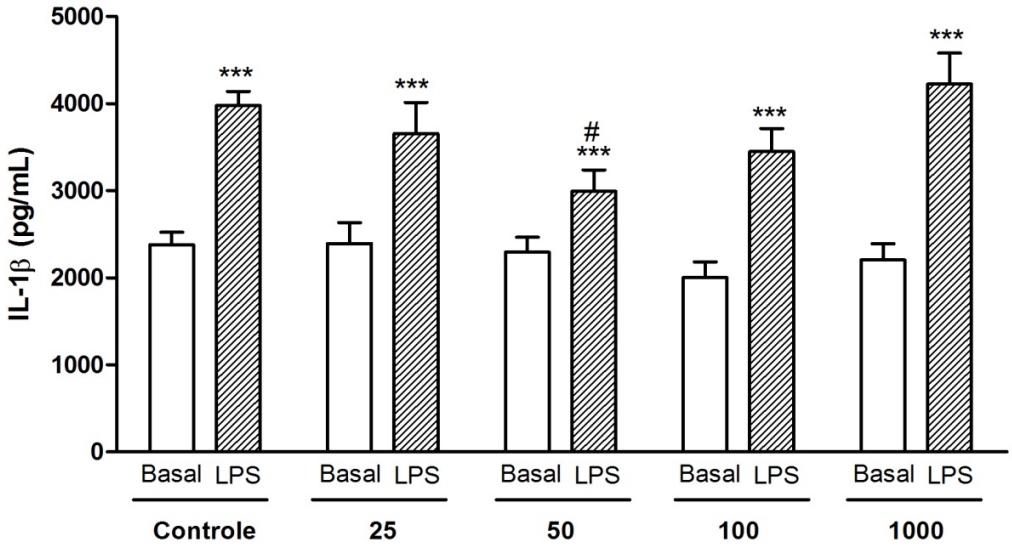

Figura 5. Efeito do ACG sobre a secreção da citocina IL-1β por neutrófilos. Neutrófilos foram obtidos da cavidade peritoneal de ratos Wistar machos (glicogênio de ostra 1%, 4 horas). Neutrófilos (1x 10^6) foram incubados na presença ou ausência de LPS (5 µg/mL) juntamente com ACG (25, 50, 100 ou 1000 µM) por um período de 18 horas. A concentração de IL-1β foi quantificada pelo método de ELISA. Os valores expressam a média ± e.p.m. de ensaios realizados em duplicatas com células obtidas de 4animais em cada grupo. ***P<0,001 vs respectivo controle basal

4.2.2 Efeito do ACG sobre a secreção de TNF-α

Da mesma forma que observado para a IL-1β, a incubação com LPS mostrou ser eficiente para induzir a secreção de TNF-α, já que os valores obtidos após estimulação pelo LPS foram marcantemente maiores que os observados na ausência de estimulação. O tratamento com ACG, em todas as concentrações empregadas, não afetou a produção basal ou estimulada pelo LPS (**Figura 6**).

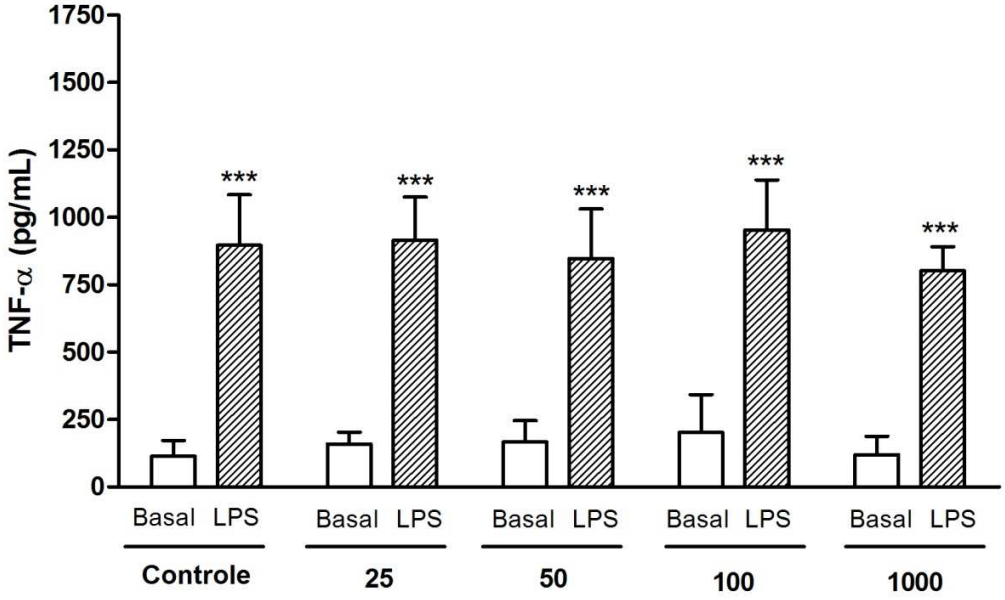

Figura 6. Efeito do ACG sobre a secreção da citocina TNF-α por neutrófilos. Neutrófilos foram obtidos da cavidade peritoneal de ratos Wistar machos (glicogênio de ostra 1%, 4 horas). Neutrófilos (1x 10^6) foram incubados na presença ou ausência de LPS (5 µg/mL) juntamente com ACG (25, 50, 100 ou 1000 µM) por um período de 18 horas. A concentração de TNF-α foi quantificada pelo método de ELISA. Os valores expressam a média ± e.p.m. de ensaios realizados em duplicatas com células obtidas de 4animais em cada grupo. ***P<0,001 vs respectivo controle basal.

4.2.3 Efeito do tratamento com ACG sobre a produção de NO

Os dados apresentados na **Figura 7** mostram que o LPS induziu a produção de NO, quantificado indiretamente pela concentração de nitrito no sobrenadante das culturas celulares. Ainda, o tratamento com ACG, nas diferentes concentrações testadas, não alterou a produção basal de NO, nem a produção proveniente da estimulação pelo LPS.

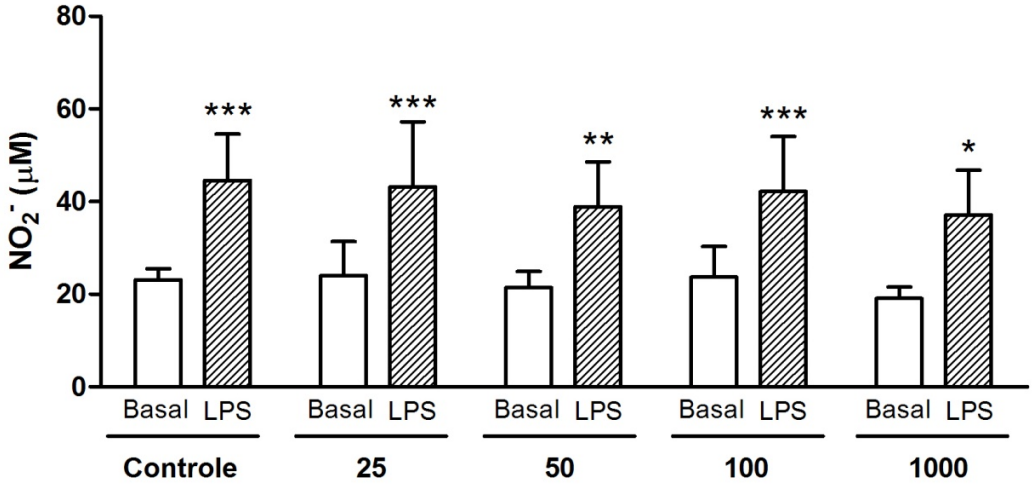

Figura 7. Efeito do ACG sobre a produção de NO por neutrófilos. Neutrófilos foram obtidos da cavidade peritoneal de ratos Wistar machos (glicogênio de ostra 1%, 4 horas). Neutrófilos (1x 10^6) foram incubados na presença ou ausência de LPS (5 µg/mL) juntamente com ACG (25, 50, 100 ou 1000 µM) por um período de 18 horas. A quantificação de nitrito foi realizada pela reação de Griess. Os valores expressam a média ± e.p.m. de ensaios realizados com células obtidas de 4 animais em cada grupo. *P<0,05; **P<0,01 e ***P<0,001 vs respectivo controle basal.

4.2.4 Efeito do tratamento com ACG sobre a secreção de PGE2

As concentrações de PGE_2 no sobrenadante das culturas de neutrófilos estão demonstradas na **Figura 8**. Os resultados obtidos mostram que a incubação com LPS provocou a secreção deste mediador inflamatório e que os tratamentos com ACG não afetou a produção de PGE_2, quer em condição basal ou estimulada pelo LPS.

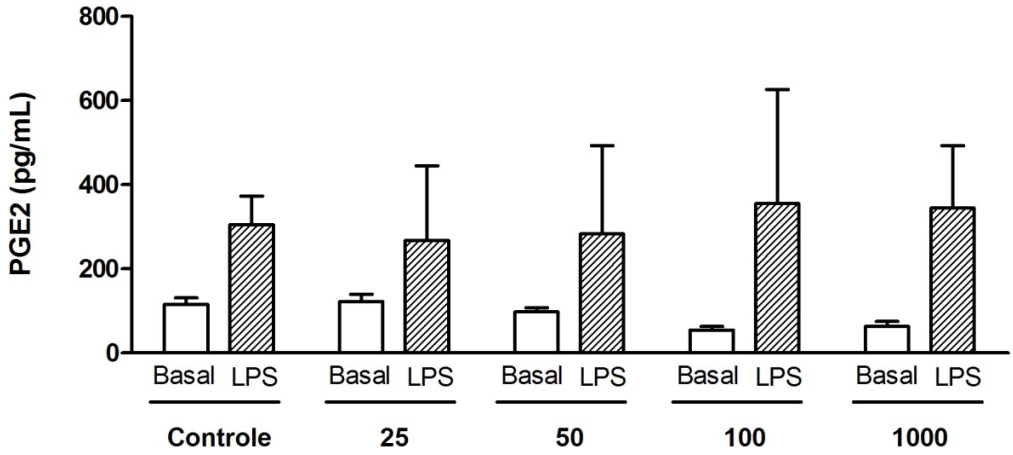

Figura 8. Efeito do ACG sobre a secreção de PGE_2 por neutrófilos. Neutrófilos foram obtidos da cavidade peritoneal de ratos Wistar machos (glicogênio de ostra 1%, 4 horas). Neutrófilos (1x 10^6) foram incubados na presença ou ausência de LPS (5 µg/mL) juntamente com ACG (25, 50, 100 ou 1000 µM) por um período de 18 horas. A quantificação de PGE_2 foi pelo método de ELISA. Os valores expressam a média ± e.p.m. de ensaios realizados em duplicatas com células obtidas de 3 animais em cada grupo.

4.3 Efeito do ACG sobre a expressão de moléculas de adesão por neutrófilos

Com o intuito de investigar se o ACG poderia afetar a expressão de moléculas de adesão em neutrófilos envolvidas na interação leucócito-endotélio, foram quantificadas as expressões de L-selectina, β2 integrina e PECAM-1 que medeiam o comportamento *rolling*, adesão e transmigração, respectivamente.

4.3.1 Efeito do ACG sobre a expressão de L-selectina

Os dados apresentados na **Figura 9** mostram que em neutrófilos controles incubados com LPS, a expressão de L-selectina na membrana celular foi reduzida. Diferentemente, em células incubadas com 25, 50 ou 100 μM de ACG a estimulação com LPS não reduziu a expressão da molécula e o tratamento com 1000 μM acarretou aumento na expressão de L-selectina após estimulação pelo LPS.

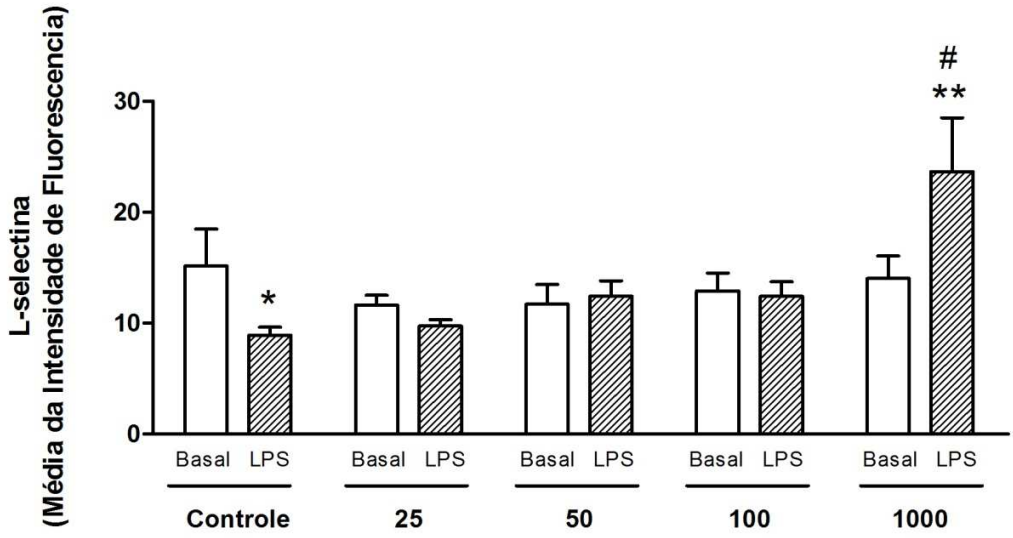

Figura 9. Efeito do ACG sobre a expressão de L-selectina por neutrófilos. Neutrófilos foram obtidos da cavidade peritoneal de ratos Wistar machos 4 horas após a injeção de 10mL de solução de glicogênio de ostra 1%. Neutrófilos (1x 10^6) foram incubados na presença ou ausência de LPS (5 μg/mL) juntamente com ACG (25, 50, 100 ou 1000 μM) por um período de 1 hora. A expressão de L-selectina foi determinada por citometria de fluxo. Os valores expressam a média ± e.p.m. de ensaios realizados com células obtidas de 3 animais em cada grupo. *P<0,05 e **P<0,01 vs. respectivo controle basal e $^{\#}$P<0,01 vs. respectivo controle LPS.

4.3.2 Efeito do ACG sobre a expressão de β2-Integrina

Os resultados obtidos mostram que a incubação com LPS promoveu aumento na expressão de β2 integrina, embora que este não seja significativo. O tratamento com ACG, nas concentrações de 25, 50 ou 100 µM, não alterou este perfil de expressão, nem modificou a expressão basal. No entanto, o tratamento com a concentração de 1000µM de ACG reduziu, tanto a expressão basal de β2 integrina quanto a estimulada pelo LPS (**Figura 10**).

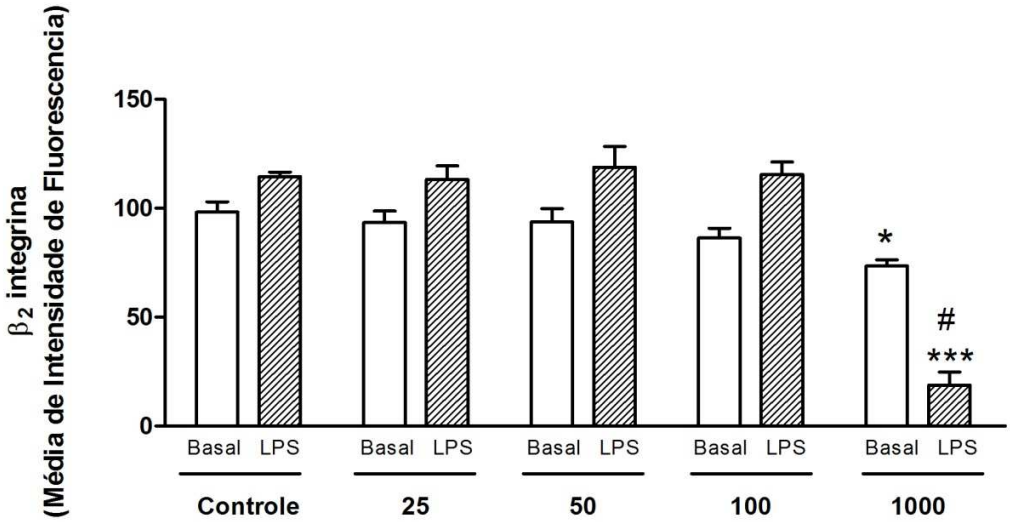

Figura 10. Efeito do ACG sobre a expressão de β2 integrina por neutrófilos. Neutrófilos foram obtidos da cavidade peritoneal de ratos Wistar machos 4 horas após a injeção de 10mL de solução de glicogênio de ostra 1%. Neutrófilos (1x 10^6) foram incubados na presença ou ausência de LPS (5 µg/mL) juntamente com ACG (25, 50, 100 ou 1000 µM) por um período de 1 hora. A expressão de β2 integrina foi determinada por citometria de fluxo. Os valores expressam a média ± e.p.m. de ensaios realizados com células obtidas de 3 animais em cada grupo. *P<0,05 e ***P<0,001 vs. respectivo controle basal e $^{\#}$P<0,001 vs. respectivo controle LPS.

4.3.3 Efeito do ACG sobre a expressão de PECAM-1

A **Figura 11** representa os resultados obtidos da investigação da ação do ACG sobre a expressão de PECAM-1 por neutrófilos. Os resultados obtidos mostram que o LPS induziu a expressão da molécula na membrana celular, já que se observou aumento exacerbado após estimulação pelo LPS em células controles. Ainda, os dados obtidos mostram que os tratamentos com ACG afetam a expressão da molécula sob estimulação pelo LPS e que pode também interferir com a expressão basal, uma vez que esta estava reduzida em células tratadas com 100 µM de ACG.

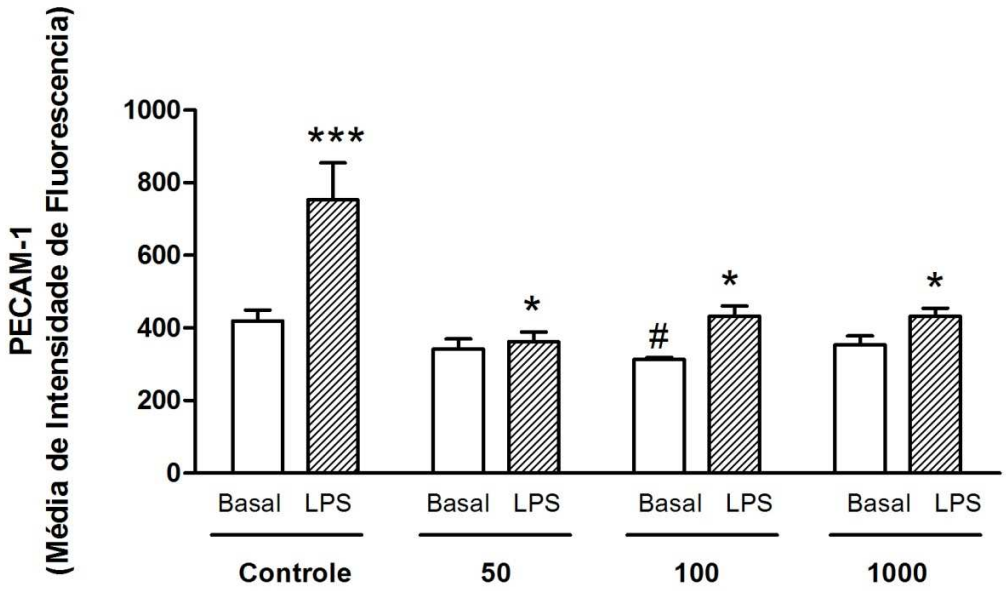

Figura 11. Efeito do ACG sobre a expressão de PECAM-1 por neutrófilos. Neutrófilos foram obtidos da cavidade peritoneal de ratos Wistar machos 4 horas após a injeção de 10mL de solução de glicogênio de ostra 1%. Neutrófilos (1x 10^6) foram incubados na presença ou ausência de LPS (5 µg/mL) juntamente com ACG (50, 100 ou 1000 µM) por um período de 1 hora. A expressão de PECAM-1 foi determinada por citometria de fluxo. Os valores expressam a média ± e.p.m. de ensaios realizados com células obtidas de 3 animais em cada grupo. ***P<0,001 e $^{\#}$P<0,05 vs. respectivo controle basal e *P<0,05 vs. respectivo controle LPS.

4.4 Efeito do ACG sobre a aderência *in vitro*

Neutrófilos foram incubados com meio de cultura ou com diferentes concentrações do ACG e colocados frente à cultura de célula endotelial primária da rede microcirculatória estimulada pelo LPS. Os resultados obtidos e apresentados na **Figura 12** mostram que o tratamento com ACG, nas concentrações de 100 ou 1000µM reduziu significantemente o número de leucócitos aderidos ao endotélio microvascular.

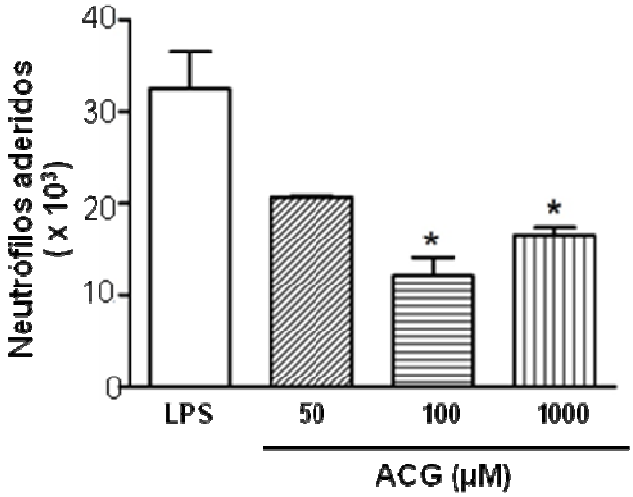

Figura 12. Efeito do ACG sobre a aderência de neutrófilos *in vitro*. Neutrófilos foram obtidos da cavidade peritoneal de ratos Wistar machos 4 horas após a injeção de 10mL de solução de glicogênio de ostra 1%. Neutrófilos (2 x 10^5) foram incubados na presença de ACG (50, 100 ou 1000 µM) por um período de 1 hora. Em seguida, os neutrófilos foram depositados sobre cultura de célula endotelial previamente estimulada com LPS (5 µg/mL; 4 horas). A aderência dos neutrófilos for quantificada pela medida da atividade de mieloperoxidase. Os valores expressam a média ± e.p.m. de ensaios realizados com células obtidas de 3 animais em cada grupo. *P<0,05 vs controle.

4.5. Efeito do ACG sobre a quimiotaxia *in vitro*

Os ensaios realizados na câmara de Boyden mostram que os neutrófilos são aptos a migrar frente ao fMLP, já que as células incubadas com meio de cultura (controle dos ensaios) percorreram distância maior frente ao fMLP que frente ao meio de cultura (basal). A incubação com ACG inibiu a migração neutrofílica frente ao fMLP em todas as concentrações testadas e a concentração de 1000 µM também inibiu a migração basal (**Figura 13**).

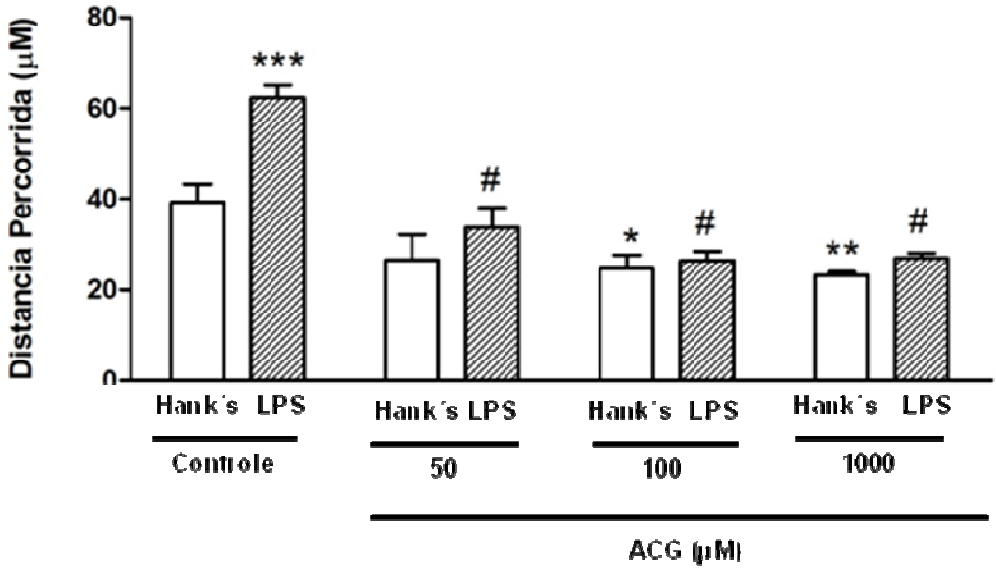

Figura 13. Efeito do ACG sobre a quimiotaxia de neutrófilos *in vitro*. Neutrófilos foram obtidos da cavidade peritoneal de ratos Wistar machos 4 horas após a injeção de 10mL de solução de glicogênio de ostra 1%. A quimiotaxia de neutrófilos foi realizada em câmara de Boyden frente a fMLP (10^{-8} M). Os neutrófilos ($1,5 \times 10^{6}$) foram incubados na presença de ACG (0, 50, 100 ou 1000 µM) e o sistema foi mantido a 37 °C (5% CO_2) por um período de 2 horas. A distância percorrida pelos neutrófilos no interior dos filtros presentes na câmara de Boyden foi quantificada por microscopia ótica. * P<0,05, ** P<0,01 e ***P<0,001 vs controle basal; # P<0,001 vs respectivo controle LPS.

5 RESUMO DOS RESULTADOS OBTIDOS

Os dados apresentados no presente trabalho mostram que nas condições experimentais aqui delineadas, o tratamento de neutrófilos com ACG:

- não altera a viabilidade celular;

- não afeta a secreção de IL-1, TNF-α e de PGE_2 e nem a produção de NO basal ou estimulada pelo LPS;

- não reduz a expressão de L-selectina na membrana celular após estimulação pelo LPS;

- inibe a expressão de β2 integrina e de PECAM-1 em condições basais e estimuladas pelo LPS;

- inibe a adesão de neutrófilos à cultura primária de célula endotelial de microcirculação estimulada pelo LPS;

- inibe a atividade locomoção orientada de neutrófilos frente ao fMLP.

6 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no presente trabalho mostram que o ACG exerce efeitos, *per se*, sobre as funções neutrofílicas ligadas à capacidade destas células migrarem para focos de lesão inflamatória. Apesar de uma diversidade de trabalhos mostrarem que o tratamento *in vivo* com ACG inibe a mobilização de neutrófilos para áreas de lesões inflamatórias (DOS SANTOS *et al.,* 2006; OLMOS *et al.,* 2007; ZHANG *et al.,* 2010; XU *et al.;* 2010), não há dados na literatura, até o momento, que mostrem a ação direta do ACG sobre funções específicas destas células. Desta forma, os dados aqui apresentados são inéditos na literatura e podem contribuir para elucidação dos mecanismos de ação antiinflamatórios do ACG e para seus possíveis empregos terapêuticos.

Como já salientado na Introdução, o ACG é componente de uma variedade de produtos naturais empregados na alimentação humana e na terapia fitoterápica, o que acarreta concentrações diárias significativas de ACG na circulação (CLIFFORD, 1999; OLTHOF *et al.,* 2001; KEMPF *et al.;* 2010). Desta forma, as concentrações de ACG empregadas neste estudo foram baseadas em dados apresentados na literatura provenientes de estudos *in vivo* e *in vitro* (CHANG *et al.,* 2009; XU *et al.,* 2010; KEMPF *et al.,* 2010). A análise das concentrações empregadas mostra que a faixa de concentração aqui utilizada foi de 3 a 300mg/L. É possível que esta seja uma concentração factível em que os neutrófilos circulantes poderiam estar em contato, já que é descrito que humanos em dieta comum, a qual inclui ingestão de café, consomem cerca de 300 mg a 1,0 g de ACG diariamente (CLIFFORD, 1999; OLTHOF *et al.,* 2001). Salienta-se que as comparações de concentrações entre estudos *in vivo* e *in vitro* são imprecisas, se considerarmos as interferências de cinética. Desta forma, não podem ser levadas em conta como base de cálculos para eficácia terapêutica, mas, neste caso, indicam que a faixa de concentração empregada *in vitro* pode ser encontrada *in vivo*.

Os dados apresentados neste trabalho mostram que o ACG não acarreta citotoxicidade significativa em neutrófilos, uma vez que mesmo a maior concentração de ACG utilizada (1000 μM) não provocou alteração da viabilidade celular. Este dado foi o primeiro a ser obtido na realização do trabalho, uma vez que possibilitou concluir que os demais resultados deste estudo não refletiam citotoxicidade do ACG.

Uma linha de investigação apresentada na literatura mostra que um dos mecanismos de ação anti-inflamatória do ACG é a inibição da secreção de mediadores químicos pelos diferentes tipos celulares envolvidos no processo (KRAKAUER, 2002; ZHAO *et al.,* 2008; ZHANG *et al.,* 2010; HAN *et al.,* 2010). Desta forma, dentro da diversidade de mediadores secretados/produzidos/liberados por neutrófilos, escolhemos estudar a ação do ACG sobre a secreção de 4 deles, com base nos seus mecanismos intracelulares de síntese e/ou produção após estimulação pelo LPS.

A ligação do LPS ao receptor TLR-4 ativa vias intracelulares, dependente ou não da molécula adaptadora MyD88. Na via dependente de MyD88, o receptor de IL-1 associados a quinases 4 e 1 (IRAK) é recrutado para a molécula MyD88, onde resíduos de aminoácidos são fosforilados e recrutam o fator 6 associado ao receptor de TNF-α (TRAF-6). Tanto o IRAK-1 quanto o TRAF-6 dissociam-se do receptor, o qual nesta condição ativa o complexo IKK, resultando na translocação dos dímeros p50/p65 do NFκB para o núcleo. Além da ativação do NFκB, a via dependente de MyD88 ativa proteínas quinases p38 ativadas por mitógenos (MAPK 38) e a quinase c-Jun-N-terminal (JNK). Na via independente de MyD88, o TLR-4 ativado recruta a molécula adaptadora TRIF, levando à indução de IRFs e a translocação tardia de NFκB. Ambas as vias resultam na ativação do NFκB, levando à síntese gênica de moléculas pró-inflamatórias, como as citocinas aqui estudadas, a expressão e ativação de enzimas, como a COX-2 e iNOS, além da expressão de moléculas de adesão (DREXLER& FOXWELL, 2009).

É importante ainda ressaltar que tanto a IL-1β como o TNF-α são sintetizados em pró-formas e são ativados pela ação de caspase-1 e da *tumor necrosis factor converting enzyme* (TACE ou ADAM-17), respectivamente, (DINARELLO, 2000; GOOZ, 2010) e

que secreção da PGE2 e produção de NO são dependentes das atividades das enzimas COX-2 e iNOS, respectivamente.

Uma vez que o tratamento com o ACG não afetou a secreção de TNF-α, de IL-1β, de PGE_2 e a produção de NO, pode-se supor que a ativação do receptor TLR-4, as vias intracelulares que culminam com a translocação do NFκB, e as vias pós-transcripcionais para as secreções das citocinas, para PGE_2 e para produção de NO não sejam alteradas pelo ACG em neutrófilos.

Estes resultados diferem de trabalhos apresentados na literatura realizados em outros tipos celulares ou após tratamento *in vivo* com ACG. Xu e colaboradores (2010) mostraram que a redução do infiltrado neutrofílico e das áreas de necrose no fígado, induzidas pelo LPS, em animais tratados com ACG *in vivo* podem ser dependentes da inibição da transcrição gênica de TLR-4 e do NFκB, além da inibição da fosforilação da subunidade p65b do NFκB. Ainda, foi mostrado que o ACG inibe a translocação do NFκB em célula endotelial da veia umbilical humana em cultura (CHANG *et al.*, 2010); que o 5-CQA inibe significantemente a ativação de MAP quinases, JNK em células de linhagem de macrófagos murinos RAW 264.7 ativados pelo acetato de forbol miristato (HAN *et al.,* 2010); que o tratamento *in vivo* com 5-CQA reduz a colite induzida pelo ácido sulfônico dinitrobenzeno e inibe a ativação de NFκB, a expressão de iNOS, das metaloproteases de matriz extracelular 2 e 9 e das moléculas de adesão endotelial ICAM-1 e P-selectina (DI PAOLA *et al.,* 2010); que o 5-CQA reduz a secreção de interleucina-8 (IL-8) induzida pelo TNF-α em células Caco-2 (ZHAO *et al.,* 2008) e que o ACG inibe a secreção de diversas citocinas, incluindo a IL-1β e o TNF-α, por células mononucleares humanas (KRAKAUER, 2002). Por outro lado, outros autores mostram dados divergentes, como os apresentados por Olmos e colaboradores (2007) que mostraram que o tratamento *in vivo* de camundongos com ACG em modelo de inflamação alérgica não afeta a expressão de iNOS, apesar de reduzir a secreção de citocinas inflamatórias; e os mostrados por WANG e MAZZA (2002) nos quais o ACG não afeta a secreção de TNF-α provocada por macrófagos da linhagem RAW 264.7 estimulados por LPS e interferon-γ (IFN-γ).

É possível que os efeitos conflitantes do ACG possam estar relacionados ao tipo celular, e aos delineamentos experimentais, como estados de ativação celular e concentrações de ACG empregadas. Nossos dados mostram, pela primeira vez, que o ACG não possui efeito inibitório sobre as propriedades secretórias de neutrófilos. Esta ausência de efeitos não reflete ineficácia do delineamento experimental, já que os dados subseqüentes deste trabalho, que mostram que o ACG afeta funções neutrofílicas envolvidas no tráfego de neutrófilos, foram obtidas com as mesmas concentrações de ACG.

Como já salientado na Introdução, o tráfego de neutrófilos da circulação para os tecidos inflamados envolve a expressão de uma diversidade de receptores de membranas com funções adesivas, e que, quando ativados, também induzem sinalizações intracelulares para indução de funções importantes para progressão do processo inflamatório (LANGER & CHAVAKIS, 2009; MULLER, 2009). Estes receptores, denominados de moléculas de adesão, justamente pela sua função mais evidente, são expressos seqüencialmente durante a evolução da migração leucocitária, o que foi denominado por diversos autores, como expressão em cascata. Nos neutrófilos, a L-selectina medeia a interação inicial dos leucócitos circulantes ao endotélio microvascular, o comportamento *rolling*, e as β2 integrinas e a PECAM-1 medeiam a firme adesão e a subseqüente transmigração (LANGER & CHAVAKIS, 2009; MULLER, 2009).

Uma vez que a L-selectina possui expressão constitutiva, foi investigado, inicialmente, se o ACG poderia afetar a concentração fisiológica desta molécula na membrana celular. Os resultados obtidos mostraram que o ACG não afetou a expressão basal de L-selectina, mas inibiu sua clivagem após estimulação pelo LPS, o que foi observado em neutrófilos controles. Ainda, a incubação com a maior concentração de ACG, 1000 µM, causou aumento da expressão de L-selectina após estimulação pelo LPS.

A literatura mostra que o aumento da expressão de L-selectina ocorre nas etapas iniciais da ativação celular e que, posteriormente, sua expressão é reduzida pela sua clivagem da membrana por ação de proteases, em especial metaloproteases de

membrana como a TACE (HAFEZI-MOGHADAM *et al.,* 2001; RAINER, 2001; SMALLEY & LEY, 2005). Adicionalmente, a expressão de L-selectina na membrana é dependente de sua expressão gênica durante ativação prolongada (DANG *et al.*, 2009). Desta forma, é possível supor que o ACG possa interferir com a ação das proteases ou estabilizar a membrana dos neutrófilos, impedindo a ação das enzimas e manutenção da L-selectina na membrana celular, ou que o ACG induza a expressão gênica da L-selectina, resultando em sua maior expressão na membrana celular. Esta última hipótese parece ser a menos plausível, uma vez que não houve aumento de expressão de L-selectina em neutrófilos não estimulados pelo LPS e tratados com ACG.

Com relação às β2 integrinas, nossos dados mostraram que tratamento com LPS aumentou a expressão desta molécula na membrana celular de células controles, corroborando dados da literatura (LEITE *et al.,* 2003; BRADFIELD *et al.,* 2007), e que o tratamento com ACG reduziu a expressão da molécula, tanto em condições basais, como na vigência de estimulação pelo LPS. Interessantemente, os efeitos mais pronunciados sobre a expressão de L-selectina, bem como o efeito sobre a β2 integrina, foram evidenciados com o tratamento com a concentração de 1000μM de ACG. Os dados da literatura mostram que a clivagem da L-selectina é fundamental para expressão das β2 integrinas *in vitro* (GREEN *et al.,* 2004; MATTILA *et al.,* 2005; ORR *et al.,* 2007) apesar da demonstração direta desta relação *in vivo* ainda ser controversa (GREEN *et al.,* 2004; ORR *et al.,* 2007). Desta forma, é possível supor que o ACG iniba a clivagem da L-selectina, impedindo a expressão das β2 integrinas, e assim, os neutrófilos permaneceriam rolando sobre o endotélio sem aderir ao mesmo, comprometendo a diapedese. Esta hipótese deverá ser investigada em breve por duas estratégias experimentais, a saber: 1) pela quantificação da expressão gênica da L-selectina e β2 integrinas e, 2) pela quantificação da ação do ACG sobre metaloproteases de membranas. Resultados obtidos anteriormente mostram que o 5-CQA controla a expressão e atividade de metaloproteases, uma vez que sua administração *in vivo* reduziu a expressão das metaloproteases de matriz 2 e 9 (DI PAOLA *et al.,* 2010).

Além da redução da expressão das β2 integrinas, o tratamento com o ACG reduziu marcantemente a expressão de PECAM-1. Este dado é bastante interessante e sugere que o ACG pode interferir com outros processos biológicos importantes em que a PECAM-1 está envolvida, além de ser uma molécula com papel pró ou antiinflamatório (WOODFIN *et al.,* 2007; PRIVRATSKY *et al.,* 2010). Tem sido proposto que a interação de diferentes domínios da molécula com seus ligantes específicos desencadeiam ações pró ou antiinflamatórias (PRIVRATSKY *et al.,* 2010).

Como já descrito, a PECAM-1 é uma molécula expressa na célula endotelial, plaquetas e células hematopoéticas (NOURSHARGH *et al.,* 2006). Seus efeitos pró-inflamatórios estão relacionadas à sua ação adesiva direta que medeia a transmigração de leucócitos pela célula endotelial, além da indução de sinalizações intracelulares para a expressão de outras moléculas importantes para a progressão da migração neutrofílica, como as β1 e β3 integrinas que são expressas nos neutrófilos quando presentes na matriz extravascular, além da modulação do potencial de membrana. Por outro lado, seus efeitos antiinflamatórios estão relacionados à manutenção das junções interendoteliais, à alteração do limiar de ativação de leucócitos e à inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias (PRIVRATSKY *et al.,* 2010). As implicações destas ações pró ou anti-inflamatórias *in vivo* ainda não estão estabelecidas.

A expressão da PECAM-1 na membrana celular é dependente de síntese gênica, dependente da transcrição pelo NFκB, da clivagem protéica e da recirculação intracelular (GARNACHO *et al.,* 2008). A ação do ACG sobre estes mecanismos, bem como, a investigação se o ACG interfere com ações pró ou antiinflamatórias da PECAM-1 será investigada futuramente.

Se associados, os dados apresentados até o momento mostram que o ACG modula a expressão das moléculas de adesão em neutrófilos e sugerem que seus mecanismos de ação possam envolver mecanismos pós-transcripcionais, já que a síntese gênica destas moléculas obedece sinalização intracelular semelhante à responsável pela síntese de citocinas inflamatórias e pela expressão de COX-2 e iNOS. Nossos dados iniciais sugerem que o ACG pode não afetar estes mecanismos.

A literatura sobre a ação do ACG sobre a expressão de moléculas de adesão em neutrófilos é inexistente e alguns poucos trabalhos recentes mostram a ação do ACG sobre a expressão de moléculas de adesão na célula endotelial, inibindo a transcrição gênica (DI PAOLA *et al.,* 2010; CHANG *et al..,* 2010). Assim, não há dados na literatura que permitam a comparação com os aqui observados.

A efetividade das ações do ACG sobre a expressão de moléculas de adesão em neutrófilos foi aquilatada pela menor adesão à cultura primaria de célula endotelial de microvasos estimulada pelo LPS, quando os neutrófilos foram pré-tratados com o ACG. Está bem estabelecido que a ativação endotelial pelo LPS induz a expressão de moléculas de adesão da família das selectinas, em especial da E-selectina, e das imunoglobulinas, como a ICAM-1, VCAM-1 e PECAM-1. Vale ressaltar que esta cultura celular já foi extensivamente caracterizada morfologicamente e funcionalmente, inclusive para as secreções das citocinas e expressões das moléculas de adesão após estimulação pelo LPS (SILVA *et al.,* 2007; CAVALCANTI *et al.,* 2007; WAISMAM *et al.,* 2009). Desta forma, pode-se supor que a menor expressão das moléculas de adesão em neutrófilos seja a responsável pela inibição da adesão *in vitro.*

Após a diapedese, os neutrófilos migram orientadamente para o foco de lesão inflamatória na matriz extravascular, respondendo a um gradiente de concentração de mediadores com atividades quimiotáxicas ligadas ou não à matriz. No presente estudo, para testar a hipótese de que o ACG poderia interferir com os mecanismos envolvidos com a migração orientada de neutrófilos, empregamos o peptídeo formilado fMLP como fator quimiotáxico. O fMLP é um dos agentes quimiotáxicos mais potentes para neutrófilos e liga-se a dois receptores funcionais, denominados *formyl peptide receptor* (FPR) e *FPR like-1* (FPRL1), que possuem alta e baixa afinidades para o fMLP, respectivamente. Estes receptores possuem 7 domínios transmembrana, ligados à proteína G (LIU *et al.,* 2004). A ligação do fMLP ao seu receptor ativa, via proteína G, as fosfolipases C, D e A2 e a fosfatidil inositol 3-quinase (PI3K) e, ainda, a fosforilação de resíduos de tirosina. Os segundos mensageiros resultantes atuam sobre várias quinases intracelulares, incluindo a proteína quinase C (PKC) e as MAPKs, que em

última instância, são responsáveis pelas alterações morfológicas que induzem a quimiotaxia (SELVATICI *et al.,* 2006).

Os dados obtidos no presente trabalho mostram que a incubação prévia de neutrófilos com o ACG inibe a migração orientada de neutrófilos frente ao fMLP. Com base no mecanismo de ação do fMLP, as vias de ação do ACG podem ser inúmeras, que incluem desde alterações na expressão e sensibilidade dos receptores, além da interferência na mediação intracelular.

Em conjunto, os dados apresentados neste trabalho mostram a ação *per se* do ACG sobre neutrófilos e sugerem que este ácido possa afetar propriedades de membranas ou mecanismos intracelulares de adesão e/ou locomoção de neutrófilos, importantes para efetividade destas células no processo inflamatório.

7 CONCLUSÃO

Em conclusão, os resultados obtidos neste trabalho mostram que o tratamento de neutrófilos obtidos da cavidade peritoneal de ratos com ACG inibe funções adesivas e de locomoção destas células, que podem ter implicações no mecanismo de ação terapêutico deste agente.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H. **IMUNOLOGIA BÁSICA: Funções e Distúrbios do Sistema Imune.** 2ed, Rio de Janeiro: Revinter, 2003.

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

ALICE, C.B.; SIQUEIRA, N.C.S.; MENTZ, L.A.; SILVA, G.A.A.B.; JOSÉ, K.F.D. **Plantas medicinais de uso popular: atlas farmacognóstico.** Canoas(RS): ULBRA, 1ed, 205p., 1995.

ALVES-FILHO, J.C.; DE FREITAS, A.; SPILLER, F.; SOUTO, F.O.; CUNHA, F.O. **The Role of Neutrophils in Severe Sepsis.** *Shock,* v.30, n.7, p. 3-9, 2008.

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.

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

BAUMANN, L.S. **Less-known botanical cosmeceuticals** *Dermatoloic Therapy, v.* 20, p. 33-348, Miami-Florida, 2007.

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

BIXBY, M.; SPIELER, L.; MENINI, T.; GUGLIUCCI, A. ***Ilex paraguariensis* extracts are potent inhibitors of nitrosative stress: A comparative study with green tea and wines using a protein nitration model and mammalian cell cytotoxicity.** *Life Sciences,* Vallejo, v. 77, p. 345-358, 2005.

BLACKWELL, K.A.; RAISZ, L.G.; PILBEAM, C.C. **Prostaglandins in bone: bad cop, good cop?** *Trends in Endocrinology and metabolism,* Farmington, v.21, n.5, p.294-301, 2010.

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.

BOYDEN, S. **The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leukocytes,** *J. Exp. Med., v.* 15, p.453-466, 1962.

BRADFIELD, P.F.; Johnson-Léger, C.A.; Zimmerli, C.; Imhof, B.A. **LPS differentially regulates adhesion and transendothlelial migration of human monocytes under static and flow conditions.** *Int. Immunol.,* v.20, n.2, p.247-257, 2008.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC n.48**, 16 de março de 2004. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos

BRAVO, L. **Polyphenols, chemistry, dietary sources, metabolism and nutrition significance.** *Nutrition.,* v. 56, n. 11, p. 317-333, 1998.

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

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

CAVALCANTI, D.M.; LOTUFO, C.M.; BORELLI, P.; FERREIRA, Z.S.; MARKUS, R.P.; FARSKY, S;H. **Endogenous glucocorticoids control neutrophil mobilization from boné marrow to blood and tissues in non-inflammatory conditions.** *BrJ Pharmacol.,* Sao Paulo, v.152, n.8, p.1291-1300, 2007.

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

CHAVAKIS, E.; CHOI, E.Y.; CHAVAKIS T. **Novel aspects in the regulation of the leukocyte adhesion cascade.** *Tromb. Haemost.,* Frankfurt, v. 102, p.191-197, 2009.

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

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.

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

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 and dietary burden.** *J. Sci. Food Agric.,* Surrey, v. 79, p. 362-372, 1999.

CLIFFORD, M.N. **Chlorogenic acids and other cinnamates – nature, occurrence, dieatary burden, absortion and metabolism.** *J. Sci. Food Agric.,* Surrey, v. 80, p. 1033-1043, 2000.

COHEN, S.M.; ROUSSEAU, M. E.; ROBINSON, E.H. **Therapeutic use of Selected Herbs**. *Holist Nurs Pract, New Haven*-Connecticut, v.14, n.3, p.59-68, 2000.

COSTA, M.T.; FABENI, R. DE C.; APTEKMANN, K.P. **Diferentes papéis do óxido nítrico com ênfase nas neoplasias.** *Ciência Rural,* Santa Maria, v. 33, n.5, p. 967-974, 2003.

CSISZAR, A.; WANG, M.; LAKATTA, E.G.; UNGVARI, Z. **Inflammation and endothelial dysfunction during aging: role of NF-κB.** *J. Appl. Physiol.,* v. 105, p. 1333-1341, 2008.

DA CUNHA, F.M.; DUMA, D.; ASSREUY, J.; BUZZI, F.C.; NIERO, R.; CAMPOS, M.M.; CALIXTO, J.B. **Caffeic Acid Derivatives: In vitro and In Vivo Anti-inflammatory Properties.** *Free Radical Research,* v.38, n.11, p. 1241-1253, 2004.

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

DANNHARDT, G. & KIEFER, W. **Cyclooxygenase inhibitors – current status and future prospects.** *Eur J Med Chem,* Germany, v.36, p.109-126, 2001.

DA SILVA, A.G; DE SOUSA, C.P.G.; KOEHLER, J.; FONTANA, J.; CHRISTO, A.G.; GUEDES-BRUNI, R.R. **Evaluation of na Extract of Brazilian Arnica (*Solidago chilensis* Meyen, Asteraceae) in Treating Lumbago.** *Phytotherapy research,* Espírito Santo, v. 24, p. 283-287, 2010.

DE MARIA, C. A. B.; TRUGO, L.C.; DE MARIZ E MIRANDA, L.S. **The contento f individual caffeoylquinic acids in edible vegetables.** *Journal of Food Composition and Analysis,* Rio de Janeiro, v. 12, p. 289-292, 1999.

DE MARIA, C. A. B. & MOREIRA, R. F. A. **Métodos para análise do ácido clorogênico.** *Quimica Nova*, v. 27, n. 4, p. 586-592, 2004.

DINARELLO, C.A. & MOLDAWER, L.L. **Proinflammatory and Anti-inflammatory Cytokines in Rheumatoid Arthritis. A primer for clinicians,** 2ed, Amgen, 2000.

DI PAOLA, R.; ESPOSITO, E.; MAZZON, E.; CAMINITI, R.; TOSO, R.D.; PRESSI, G.; COZZOCREA, S. **3,5-Dicaffeoyl-4-malonylquinic acid reduced oxidative stress and inflammation in a experimental modelo f inflammatory bowel disease.** *Free Radic Res,* Messina, v.44, n.1, p. 74-89, 2010.

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

DREXLER, S.K. & FOXWELL, B.M. **The role of toll-like receptors in chronic inflammation.** *Int. J. Biochem. Cell. Biol.,* London, v.42, n.4, p.506-518, 2009.

FAN, Z.; SÖDER, S.; OEHLER, S.; FUNDEL, K.; AIGNER, T. **Activation of Interleukin-1 Signaling Cascades in Normal and Osteoarthritic Articular Cartilage.** *The American journal of Pathology,* München, v.171, n.3, p. 938-946, 2007.

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.

FELÉTOU, M.; HUANG, Y.; VANHOUTTE, P.M. **Vasoconstrictor prostanoids.** *Eur J Physiol,* Hong Kong, v.459, p.941-950, 2010.

FILIP, R.; LÓPEZ, P.; GIBERTI, G.; COUSSIO, J.; FERRARO, G. **Phenolic compounds in seven South American *Ilex* species.** Fitoterapia, Buenos Aires, v. 72, p. 774-778, 2001.

FORTE, W. N. **Imunologia básica e aplicada.** Porto Alegre: Artmed, 2004.

FRIEDMAN, M. & JÜRGENS, H.S. **Effect of pH on the stability of plant phenolic compounds.** *J. Agric. Food Chem.*, v.48, p.2101-2110, 2000.

GAHMBERG, C.G.; FAGERHOLM, S.C.; NURMI, S.M.; CHAVAKIS, T.; MARCHESAN, S.; GRÖNHOLM, M. **Regulation of integrin activity and signaling.** *Biochemica et Biophysica Ata,* Bethesda, p.431-444, 2009.

GARNACHO, C.; ALBELDA, S.M.; MUZYKANTOV. V.R.; MURO, S. **Differential intra-endothelial delivery of polymer nanocarriers targeted to distinct PECAM-1 epitopes.** *J Control Release,* Philadelphia, v.130, n.3, p.226-233, 2008.

GARRIDO-URBANI, S.; BRADFIELD, P.F.; LEE, B.P.; IMHOF, B.A. **Vascular and epithelial junctions: a barrier for leucocyte migration.** *Biochem. Soc. Trans.,*Geneva, v.36, n. Pt2, p.203-211, 2008.

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

GONZÁLEZ-AMARO, R. & SÁNCHEZ-MADRID, F. **Cell adhesion molecules: selectins and integrins.** *Crit Rev Immunol*., San Luis Potosí, v. 19, n. 5-6, p. 389-429, 1999.

GOOZ, M. **ADAM-17: the enzyme that does it all.** *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.,* v.45, n.2, p.146-169, 2010.

GORDON, M.H. & WISHART, K. **Effects of Chlorogenic acid and bovine serum albumin on the oxidative stability of low density lipoproteins *in vitro.*** *J. Agric. Food. Chem.,* Reading, v.58, n.9, p.5828-5833, 2010.

GOULART, S.; MORITZ, M.I.G.; LANG, K.L.; LIZ, R.; SCHENKEL, E.P.; FRÖDE, T.S. **Anti-inflammatory evaluation of *Solidago chilensis* Meyen in a murine model of pleurisy**. *Journal of Etnopharmacology,* Florianópolis, v.113, p. 346-353, 2007.

GRANADO-SERRANO. A.B.; MARTIN, M.A.; IZQUIERDO-PULIDO, M.; GOYA, L.; BRAVO, L.; RAMOS, S. **Molecular mechanisms of (-)-epicathecin and chlorogenic acid on the regulation of the apoptotic and survival/proliferation pathways in a human hepatoma cell line.** *J. Agric. Food Chem.,* v.55, n.5, p.2020-2027, 2007.

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

HAFEZI-MOGHADAM, A.; THOMAS, K.L.; PROROCK, A.J.; HUO, Y.; LEY, K. **L-Selectin Shedding Regulates Leukocyte Recruitment.** *J Exp Med,* Charlottesville, v.193, n.7, p. 863-872, 2001.

HAN, E.H.; KIM, J.Y.; KIM, H.G.; CHUN, H.K.; CHUNG, Y.C.; JEONG, H.G. **Inhibitory effect of 3-caffeoyl-4-dicaffeoylquinic acid from Salicornia herbacea against phorbol ester-induced cycloxygenase-2 expression in macrophages.** *Chem Biol. Interact.,* v.183, n.3, p.397-404, 2009.

HARRIS, S.G.; PADILLA, J.; KOUMAS, L.; RAY, D.; PHIPPS, R.P. **Prostaglandins as modulators of immunity.** *Trends in Immunology,* New York, v.23, n.3, p.144-150, 2002.

HARLAN, J.M.; VEDDER, N.B.; WINN, R.; RICE, C. **Mechanisms and consequences of Leukocyte-Endothelial Interaction.** *West J Med,* La Jolla, v.155, p. 365-369, 1991.

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.

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.

HIGDON, J.V. & FREI, B. **Coffee and Health: A Review of Recent Human Research.** *Food Science and Nutrition,* Corvallis, v. 46, n. 2, p. 101-123, 2006.

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.

HUO, Y. & LEY, K. **Adhesion molecules and atherogenesis.** *Acta Physiol Scand.*, Charlottesville, v. 173, n. 1, p. 35-43, 2001.

HWANG, Y.P.; YUN, H.J.; CHUN, H.K.; CHUNG, Y.C.; KIM, H.K.; JEONG, M.H.; YOON, T.R.; JEONG, H.G. **Protective mechanisms of 3-caffeoyl,4-dihydrocaffeoylquinic acid from *Salicornia herbacea* against tert-butyl hydroperoxide-induced oxidative damage.** *Chem. Biol. Interact.,* Gwangju, v.181, n.3, p.366-76, 2009.

ILAN, N. & MADRI, J.A. **PECAM-1: old friend, new partners.** *Curr Opin Cell Biol,* Haifa, v.15, n.5, p.515-524, 2003.

ISHII, D.; SCHENK, A.D.; BABA, S.; FAIRCHILD, R.L. **Role of TNFα in Early Chemokine Production and Leukocyte Infiltration into Heart Allografts.** *Am J Transplant,* Sagamihara, v.10, n.1, p. 59-68, 2010.

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

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.

KANTARI, C.; PEDERZOLI-RIBEIL, M.; WITKO-SARSAT, V. **The Role of Neutrophils and Monocytes in Innate Immunity.** *Trends in Innate Immunity*, Paris, v. 15, p. 118-146, 2008.

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.

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.

KEMPF, K.; HERDER, C,; ERLUND, I.; KOLB, H.; MARTIN, S.; CARSTENSEN, M.; KOENIG, W.; SUNDVAL, J.; BIDEL, S.; KUHA, S.; TUOMILEHTO, J. **Effects of coffee consumption on subclinical inflammation and other risk factors for type 2 diabetes: a clinival trial.** *Am. J. Clin. Nutr.,* Dusseldorf, v. 91, p.950-957, 2010.

KRAKAUER, T. **The polyphenol Chlorogenic acid inhibits staphylococcal exotoxin-induced inflammatory cytokines and chemokines.** *Immunopharmacol. Immunotoxicol,* Maryland, v.24, n.1, p.113-119, 2002.

LANGER, H.F. & CHAVAKIS, T. **Leukocyte-endothelial interactions in inflammation.** *J. Cell. Mol. Med.,* Bethesda, v.13, n.7, p.1211-1220, 2009.

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

LEITE, F.; GYLES, S.; ATAPATTU, D.; MAHESWARAN, S.K.; CZYPRYNSKI, C.J. **Prior exposure to Mannheimia haemolytica leukotoxin or LPS enhances beta(2)-integrin expression by bovine neutrophils and augments LKT cytotoxicity.** *Microb Pathog.*¸ Madison, v.34, n.6, p.267-275, 2003.

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

LI, S.; HUANG, N.F.; HSU, S. **Mechanotransduction in endothelial cell migration.** *J Cell Biochem,* San Francisco, v.96, n.6, p.1110-1126, 2005.

LIZ, R.; Vigil, S.V.G.; Goulart, S.; Moritz, M.I.G,; Schenkel, E.P.; Fröde, T.S. **The anti-inflammatory modulatory role of *Solidago chilensis* in the murine model of the air pouch.** *Journal of Pharmacy and Pharmacology,* Florianópolis, v.60, p.515-521, 2008.

LOTUFO, C.M., YAMASHITA, C.E., FARSKY, S.H., MARKUS, R.P. **Melatonin effect on endothelial cells reduces vascular permeability increase induced by leukotriene B4.** *Eur J Pharmacol.*, São Paulo, v.534, n.1-3, p.258-263, 2006.

LUO, B.; CARMAN, C.V.; SPRINGER, T.A. **Structural Basis of Integrin Regulation and Signaling**. *Ann. Rev. Immunol.,* Boston, v. 25, p. 619-647, 2007.

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

MANACH, C.; SCALBERT, A.; MORANG, C.; RÉMÉSY, C.; JIMÉNEZ, L. **Polyphenols: food sources and bioavailability.** *Am J Clin Nutr*, v. 79, p.727-747, 2004.

MARRASSINI, C.; ACEVEDO, C.; MIÑO, J.; GORZALCZANY, S. **Evaluation of antinociceptive, antinflammatory activities and phytochemical analysis of aerial parts of *Urtica urens* L.** *Phytother Res,* Buenos Aires, 2010.

MATTILA, P.E.; GREEN, C.E.; SCHAFF, U.; SIMON, S.I.; WALCHECK, B. **Cytoeskeletal interactions regulate inducible L-selectin clustering.** *Am J Physiol Cell Physiol,* St Paul, v.289, n.2, p.C323-332, 2005.

MIURA, T.; CHIBA, M.; KASAI, K.; NOZAKA, H.; NAKAMURA, T.; SHOJI, T.; KANDA, T.; OHTAKE, Y.; SATO, T. **Apple procyanidins induce tumor cell apoptosis through mitochondrial pathway activation of caspase-3,** *Carcinogenesis,* Japan, v. 29, n. 3, p. 585-593, 2008.

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

MERCK INDEX. **An encyclopedia of chemicals and biologicals**. New Jersey: Merck Researchs Laboratories, Division of Merck & CO, Inc., p. 248, 359, 1583 e 1584, 1996.

MOREL, A.F.; DIAS, G.O.; PORTO, C.; SIMIONATTO, E.; STUKER, C.Z.; DALCO, I.I. **Antimicrobial activity of extractives of *Solidago microglossa.*** *Fitoterapia,* Santa Maria, v.77, p.453-455, 2006.

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

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

NARDINI, M.; D´AQUINO, M.; TOMASSI, G.; GENTILI, V.; DI FELICE, M.; SCACCINI, C. **Inhibition of hman low-density lipoprotein oxidation by caffeic acid and other hydroxycinnamic acid derivatives.** *Free Radical Biology & Medicine*,Viterbo, v.19, n.5, p.541-552, 1995.

NEWMAN, P.J..**The biology of PECAM-1.** *J Clin Invest.*, Milwaukee, v. 99, n. 1, p. 3-8, 1997.

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

OLMOS, A.; GINER, R.M.; RECIO, M.C.; RIOS, J.L.; CERDÁ-NICOLÁS, J.M.; MÁÑEZ, S. **Effects of plants alkylphenols on cytokine production, tyrosine nitration and inflammatory damage in the efferent phase of contact hypersensitivity.** *British Journal of Pharmacology*, Valencia-Espanha, v.152, p.366-373, 2007.

OLTHOF, M.R.; HOLLMAN, P.C.; KATAN, M.B. **Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans.** *J Nutr.,* v.131, n.1, p. 66-71, 2001a.

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, 2001b.

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

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

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.

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

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

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

ROITT, I.M. & DELVES, P.J. **Fundamentos de Imunologia.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 10ed, 489p, 2004.

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.

SCHAEFER, S.; BAUM, M.; EISENBRAND, G.; JANZOWSKI, C. **Modulation of oxidative cell damage by reconstituted mixtures of phenolic apple juice extracts in human colon cell lines.** *Mol. Nutr. Food Res.,* Kaiserslautern, v. 50, p. 413-417, 2006.

SCHENKEL, A.R., CHEW, T.W., CHLIPALA, E., HARBORD, M.W., MULLER, W.A. **Different susceptibilities of PECAM-deficient mouse strains to spontaneous idiopathic pneumonitis.** *Exp Mol Pathol.*, Fort Collins, v. 81, n. 1, p. 23-30, 2006.

SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; Jordan, M.; Gerth, A.; Wilken, D. **Secondary metabolite content in rhizomes, callus cultures and *in vitro* regenerated plantlets of *Solidago chilensis,*** *Z Naturforshch C,* v. 60, e.1-2, p. 5-10, 2005.

SCHMID-SCÖNBEIN, G.W. **Analysis of Inflammation.** *Annu. Rev. Biomed. Eng.,* La Jolla, v, 8, p. 93-151, 2006.

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

SELVATICI, R.; FALZARANO, S.; MOLLICA, A.; SPISANI, S. **Signal transduction pathways triggered by selective formylpeptide analogues in human neutrophils.** *Eur. J. Pharmacol.,* Ferrara, v.534, n.1-3, ´p.1-11, 2006.

SETHI, S. & DIKSHIT, M. **Modulation of Polymorphonuclear Leukocytes Function by Nitric Oxide,** *Trombosis Research,* India, v. 100, p. 223-247, 2000.

SILVA, C.L.; TAMURA, E.K.; MACEDO, S.M.; CECON, E.; BUENO-ALVES, L.; FARSKY, S.H.; FERREIRA, Z.S.; MARKUS, R.P. **Melatonin inhibits nitric oxide production by microvascular endothelial cells in vivo and in vitro. *BrJ Pharmacol,* Sao Paulo, v.151, n.2, p.195-205, 2007.**

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; De MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **FARMACOGNOSIA da planta ao medicamento**. Florianópolis:Editora da Universidade, 3ed., 833p., 2003.

SMALLEY, D.M. & LEY, K. **L-selectin: mechanisms and physiological significance of ectodomain cleavage.** *Journal of Cellular and Molecular Medicine,* Charlottesville, v. 9, n. 2, p. 255-266, 2005.4

SMITH, J.A. **Neutrophils, host defense, and inflammation: a double-edged sword.** *J Leukoc Biol,* Canberra, v.56, p.672-686, 1994.

SMITH, C.W. **Adhesion molecules and receptors.** *J Allergy Clin Immunol,* Houston, v.121, n.2, p. S375-S379, 2007.

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

SPENCER, J.P.; CHOWRIMOOTOO, G.; CHOUDHURY, R.; DEBNAM, E.S.; SRAI, S.K.; RICE-EVANS, C. **The small intestine can both absorb and glucoronidate 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.

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

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

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.

SWANEY, K.F.; HUANG, C.H.; DEVREOTES, P.N. **Eukaryotic chemotaxix: a network of signaling pathways controls motility, directional sensing, and polarity.** *Ann Rev Biophys,* Baltimore, v. 39, p.265-289, 2010.

TAMURA, E.K.; JIMENEZ, R.S.; WAISMAN, K.; GOBBO-NETO, L.; LOPES, N.P.; MALPEZZI-MARINHO, E.A.L.; MARINHO, E.A.V.; FARSKY, S.H.P. **Inhibitory effects of *Solidago chilensis* Meyen hydroalcoholic extract on acute inflammation.** *Journal of Ethnopharmacology,*São Paulo, v.22, p.478-485, 2009.

TRINH, H.T.; BAE, E.A.; HYUN, Y.J.; JANG. Y.A.; YUN, H.K.; HONG, S.S.; KIM, D.H. **Anti-allergic effects of fermented Ixeris sonchifolia and its constituent in mice.** *J Microbiol. Biotechnol.,* Seoul, v.20, n.1, p.217-223, 2010.

TRIPATHI, P.; TRIPATHI, P.; KASHYAP, L.; SINGH, V. **The role of nitric oxide in inflammatory reactions.** *Federation of European Microbiological Scienties,* India, v. 51, p. 443-452, 2007.

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.

UCHIMURA K. & ROSEN, S.D. **Sulfated l-selectin ligands as a therapeutic target in chronic inflammation.** *Trends Immunol.,* San Francisco, v.27, n. 12, p. 559-565, 2006.

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 coffe and the major coffee components Chlorogenic acid and trigonelline on glucose tolerance.** *Diabetes Care,* The Netherland, v.32, n.6, p. 1023-1025, 2009.

WAISMAM, K.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A.M.; CARRIJO-CARVALHO, L.C.; PACHECO, M.T.; FARSKY, S.H. **Lopap: a non-inflammatory and cytoprotective molecule in neutrophils and endothelial cells.** *Toxicon,* São Paulo, v.53, n.6, p.652-659, 2009.

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.

WISE, H. **The inhibitory effect of prostaglandin E2 on rat neutrophil aggregation.** *J Leukoc Biol,* Hong Kong, p.180-186, 1996.

WOODFIN, A.; VOISIN, M.B.; NOURSHARGH, S. **PECAM-1: a multi-functional molecule in inflammation and vascular biology.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol,* London, v.27, n.12, p.2514-23, 2007.

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.

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.

YONATHAN, M.; ASRES, K.; ASSEFA, A.; BUCAR, F. **In vivo anti-inflammatory and anti-nociceptive activities of Cheilanthes farinose.** *J Ethnopharmacol.,* v. 108, n.3, p. 462-470, 2006.

ZANG, L.; COSMA, G.; GARDNER, H.; CASTRANOVA, V.; VALLYATHAN, V. **Effect of Chlorogenic acid on hydroxyl radical.** *Molecular and Cellular Biochemistry,* Morgantown, v. 247, p. 205-210, 2003.

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,* China, v.41, n.7, p.943-949, 2010.

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.

ZHU, J.H. & GRAY, D.G. **Photoyellowing of lignin-rich paper: interaction of excited states with selected additives.** *J Photochem. Photobiol.,* v. 87, p. 267-273, 1995.

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

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

ANEXOS

ANEXO I – Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais (Protocolo nº 278)

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

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

Ofício CEUA/FCF/38/2010

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo Certifica que o Projeto **"Efeitos do ácido clorogênico sobre funções de neutrófilos"** (Protocolo nº 276), de responsabilidade do(a) pesquisador(a) **Karen Daher Belinati** sob a orientação do(a) Profa. Dra. Sandra Helena Poliselli Farsky, está de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA e foi APROVADO em reunião de 10 de maio de 2010.

São Paulo, 11 de maio de 2010.

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

Av. Prof. Lineu Prestes, 580 - Bloco 15 A - Cidade Universitária - CEP 05508-900 - São Paulo - SP
Fone: (11) 3091-3677 / Fax: (11) 3813-5095 - e-mail: ririgo@usp.br

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 - 6723838/1 - Karen Daher Belinati

Email:	karenbelinati@usp.br
Data de Nascimento:	02/01/1987
Cédula de Identidade:	RG - 7.860.517 0 - PR
Local de Nascimento:	Distrito Federal
Nacionalidade:	Brasileira
Graduação:	Farmacêutica - Universidade Norte do Paraná - Paraná - Brasil - 2007

Curso:	Mestrado
Programa:	Toxicologia e Análises Toxicológicas
Data de Matrícula:	06/07/2009
Início da Contagem de Prazo:	06/07/2009
Data Limite:	06/01/2012
Orientador:	Prof(a). Dr(a). Sandra Helena Poliselli Farsky - 06/07/2009 até o presente. E.Mail: sfarsky@usp.br
Prazo para Realização do Exame de Qualificação:	12/08/2010
Data de Aprovação no Exame de Qualificação:	Aprovado em 24/06/2010
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 06/07/2009 Mudança de Regulamento em 06/08/2009 Matrícula de Acompanhamento em 21/07/2010

Aluno matriculado nas normas vigentes a partir de 01/07/2009
Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 21/07/2010
Impresso em: 17/08/10 10:25:49

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

FICHA DO ALUNO

9141 - 6723838/1 - Karen Daher Belinati

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBC5802-2/2	Tópicos Avançados em Toxicologia I	17/08/2009	29/11/2009	30	2	100	A	N	Concluída
EDM5791-5/3	Metodologia do Ensino Superior (Faculdade de Educação - Universidade de São Paulo)	19/08/2009	30/11/2009	120	8	91.5	A	N	Concluída
FBC5728-2/2	Aspectos Toxicológicos da Dopagem no Esporte	19/10/2009	22/11/2009	45	3	100	A	N	Concluída
6045842-1/1	Escola de Altos Estudos em Toxicologia (Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo)	30/11/2009	13/12/2009	60	4	100	A	N	Concluída
FBC5729-5/2	Fundamentos Básicos da Avaliação da Toxicidade a Substâncias Químicas	02/03/2010	22/03/2010	75	5	100	A	N	Concluída
HEP5800-1/2	Bioestatística (Faculdade de Saúde Pública - Universidade de São Paulo)	02/03/2010	11/05/2010	90	6	100	A	N	Concluída
HEP5800-1/1	Bioestatística (Faculdade de Saúde Pública - Universidade de São Paulo)	02/03/2010	11/05/2010	90	0	0	-	N	Pré-matrícula indeferida

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito da dissertação	
Disciplinas:	10	25	28
Estágios:			
Total:	10	25	28

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 21/07/2010
Impresso em: 17/08/10 10:25:49

ANEXO III – Currículo Lattes

Karen Daher Belinati

Possui graduação em Farmácia e Bioquímica pela Universidade Norte do Parana (2007). Especialista em Manipulação Alopática pela Universidade Norte do Paraná (2008). Atualmente é mestranda do Programa de Pós Graduaçào em Toxicologia e Análises Toxicologicas da FCF/USP.
(Texto informado pelo autor)

Última atualização do currículo em 14/06/2010
Endereço para acessar este CV:
http://lattes.cnpq.br/8979858055457327

Certificado pelo autor em 14/06/10

Dados pessoais

Nome Karen Daher Belinati

Nome em citações bibliográficas BELINATI, K. D.

Sexo Feminino

Endereço profissional Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas.
Rua Lineu Prestes, 580
Cidade Universitaria
05508-000 - Sao Paulo, SP - Brasil
Telefone: (011) 30912197 (011) 30912197

Formação acadêmica/Titulação

2009 Mestrado em andamento em Toxicologia e Análises Toxicológicas (Conceito CAPES 4) .
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
Título: Efeitos do Ácido Clorogênico sobre funções de neutrófilos, *Orientador:* Dra. Sandra Helena Poliselli Farsky.
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, Brasil.

2004 - 2007 Graduação em Farmácia e Bioquímica .
Universidade Norte do Paraná, UNOPAR, Brasil.

Formação complementar

2009 - 2009 Extensão universitária em Escola de Altos Estudos em Toxicologia. (Carga horária: 70h).
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

2007 - 2007 Imunologia Clínica. (Carga horária: 60h).
Portal Farmácia online.

2006 - 2006 Farmacotécnica para farmacêuticos iniciantes. (Carga horária: 48h).
Instituto Racine.

2004 - 2004 Extensão universitária em O Laboratório de Pesquisa Biomédica. (Carga horária: 60h).
Universidade Estadual de Londrina.

Atuação profissional

Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

Vínculo institucional

2009 - Atual Vínculo: Livre, Enquadramento Funcional: Acadêmica de Pós-Graduação, Carga horária: 40, Regime: Dedicação exclusiva.

Vínculo institucional

2008 - 2009 Vínculo: Livre, Enquadramento Funcional: Estagiário, Carga horária: 40, Regime: Dedicação exclusiva.

Atividades

07/2009 - Atual Atividades de Participação em Projeto, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, .

Projetos de pesquisa
Efeitos do Ácido Clorogênico sobre funções de neutrófilos

08/2008 - 06/2009 Estágios , Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.

Estágio realizado
Estágio realizado no Laboratório de Toxicologia Experimental para padronização de técnicas utilizadas para realização do projeto intitulado "Efeitos do Amblyomin-X, um inibidor de serinoproteases, sobre funções de macrófagos" sob orientação da Prof..

Polícia Científica do Paraná, PCPR, Brasil.

Vínculo institucional

2008 - 2008 Vínculo: Livre, Enquadramento Funcional: Estagiário, Carga horária: 40, Regime: Dedicação exclusiva.

Atividades

02/2008 - 07/2008 Estágios , Seção Técnica de Londrina, .

Estágio realizado
Exames periciais nos setores de análises bioquímicas, localística, material diverso, engenharia legal, acidentes de trânsito, acidentes de trabalho, degravação de áudio e vídeo e balística.

Centro de Patologia e Analises Clínicas de Londrina, CLINILAB, Brasil.

Vínculo institucional

2007 - 2008 Vínculo: Livre, Enquadramento Funcional: Estagiãrio, Carga horária: 40

Atividades

11/2007 - 02/2008 Estágios , CliniLab, .

Estágio realizado
Exames nos setores de hematologia, urinálise, parasitologia, microbiologia, bioquímica, dosagens hormonais e imunologia.

Farmácia Magistral Droga Norte, DROGANORTE, Brasil.

Atividades

01/2006 - 02/2006 Estágios , Farmácia Magistral Droga Norte, .

Estágio realizado
Atendimento no balcão, televenda e compra de medicamentos/matérias-primas. produção de medicamentos e cosméticos - manipulação, controle de qualidade de matérias-primas e embalagens, administração e documentos.

Projetos de Pesquisa

2010 - Atual Efeitos do Ácido Clorogênico sobre funções de neutrófilos

Descrição: Ácido clorogênico (ACG) é o termo utilizado para designar um grupo de compostos fenólicos oriundos da reação de esterificação entre ácidos hidroxicinâmicos (p-cumárico, caféico e ferúlico) e ácido quínico. São amplamente encontrados em produtos naturais e exercem ações antioxidantes, citotóxicas, antitumorais, antibacterianas, antifúngicas e antiinflamatórias. Apesar da descrição dos seus efeitos antiinflamatórios em diferentes modelos experimentais, a literatura é carente quanto suas ações específicas em funções inflamatórias de neutrófilos. Assim, o objetivo do presente trabalho foi investigar os efeitos do ACG sobre funções de neutrófilos in vitro. Neutrófilos foram obtidos do lavado peritoneal de ratos Wistar, machos, 4 horas após a injeção local de glicogênio de ostra a 1% e foram incubados, na presença ou ausência de LPS, com ACG nas concentrações de 25, 50, 100 ou 1000µM. A viabilidade celular (exclusão por trypan-blue), a secreção de citocinas (ensaio imuno-enzimático); produção de óxido nítrico (reação de Greiss); expressão de moléculas de adesão (citometria de fluxo); aderência e quimiotaxia in vitro foram avaliadas. Os resultados obtidos mostraram que o ACG não afetou as secreções do fator de necrose tumoral-α, do óxido nítrico e de prostaglandina E2 e somente a incubação com 50µM de ACG inibiu a secreção de interleucina 1β após estimulação com LPS. Diferentemente, a incubação com ACG inibiu a aderência de neutrófilos à cultura primária de célula endotelial de microcirculação de ratos e a quimiotaxia in vitro frente ao peptídeo formilado (fenil-metil-leucil-alanina). Estes últimos efeitos podem estar associados à ação do ACG sobre a expressão de moléculas de adesão, já que o ACG elevou a expressão de L-selectina e reduziu as expressões de β2 integrina e da platelet-endothelial cell adhesion molecule (PECAM-1). Os dados obtidos não são dependentes de alterações da viabilidade celular. Em conjunto, os dados obtidos mostram que o
Situação: Em Andamento Natureza: Pesquisa
Integrantes: Karen Daher Belinati; Sandra Helena Poliselli Farsky (Responsável); Norberto Peporine Lopes; Cristina Bichels Hebeda; Simone Marques Bolonheis
Financiador(es): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq

Áreas de atuação

1. *Grande área:* Ciências Biológicas / *Área:* Farmacologia / *Subárea:* Toxicologia.
2. *Grande área:* Ciências da Saúde / *Área:* Farmácia / *Subárea:* Análise Toxicológica.
3. *Grande área:* Ciências da Saúde / *Área:* Farmácia / *Subárea:* Farmacotecnia.
4. *Grande área:* Ciências Biológicas / *Área:* Bioquímica.

Idiomas

Inglês Compreende Bem, Fala Bem, Lê Bem, Escreve Bem.

Italiano Compreende Bem, Fala Razoavelmente, Lê Bem, Escreve Razoavelmente.

Eventos

Participação em eventos

1. XVI Congresso Brasileiro de Toxicologia. 2009. (Congresso).
2. Fórum de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. 2009. (Encontro).

3. II Curso de cuidados farmacêuticos: Dermofarmácia.. 2007. (Seminário).

4. I Curso de cuidados farmacêuticos: Bases clínicas e assistenciais para seu desenvolvimento. 2007. (Seminário).

5. Gerenciamento de resíduos na área da saúde. 2006. (Seminário).

6. Principais doenças de pele e tratamento. 2006. (Seminário).

7. XVII Congresso Brasileiro da Sociedade de Cardiologia do Estado de Sao Paulo - XII Simpósio de Farmacologia. 2006. (Simpósio).

8. VI Congresso Brasileiro de Medicamentos Genéricos - Fórum Internacional de Discussão em Produtos para a Saúde. 2005. (Congresso).

Página gerada pelo Sistema Currículo
Lattes em 17/08/2010 às 10:33:38

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.

2.2 Tempo máximo total de arguição: 3 horas para o mestrado e 5 horas para o doutorado.

3. Não serão permitidas correções na dissertação/tese. Assim, havendo extrema necessidade, poderá ser incluída uma errata.

4. A sessão de defesa será aberta ao público.

5. 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.

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

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

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

São Paulo, 11 de dezembro de 2009.

Profa. Dra. Bernadette D. G. M. Franco
Presidente da CPG/FCF/USP