



Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

Mestrado

**EFEITO DO EXTRATO DE *Dysphania ambrosioides* (L) NA
RESPOSTA DE NEUTRÓFILOS HUMANOS**

LILLIAN NUNES GOMES

São Luís

2018

LILLIAN NUNES GOMES

**EFEITO DO EXTRATO DE *Dysphania ambrosioides* (L) NA
RESPOSTA DE NEUTRÓFILOS HUMANOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Vitor Soeiro Pereira

São Luís

2018

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Núcleo Integrado de Bibliotecas/UFMA

Nunes Gomes, Lillian.

EFEITO DO EXTRATO DE *Dysphania ambrosioides* L NA
RESPOSTA DE NEUTRÓFILOS HUMANOS / Lillian Nunes Gomes. -
2018.

87 f.

Orientador(a): Paulo Vitor Soeiro Pereira.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em
Ciências da Saúde/ccbs, Universidade Federal do Maranhão,
São Luis, 2018.

1. Burst oxidativo. 2. Degranulação. 3. Inflamação.
4. Mastroz. 5. Neutrófilos. I. Soeiro Pereira, Paulo
Vitor. II. Título.

LILLIAN NUNES GOMES

**EFEITO DO EXTRATO DE *Dysphania ambrosioides* (L) NA
RESPOSTA DE NEUTRÓFILOS HUMANOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação
em Ciências da Saúde da Universidade Federal do
Maranhão como requisito para obtenção do título de
Mestre em Ciências da Saúde.

Aprovada em / /

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Paulo Vitor Soeiro Pereira (Orientador)
Universidade Federal do Maranhão- UFMA

Prof. Dr. Sandro Félix Perazzio
Universidade Federal de São Paulo- UNIFESP

Prof^a Dr^a Flavia Raquel Fernandes do Nascimento
Universidade Federal do Maranhão- UFMA

Prof^a Dr^a Ana Paula Silva de Azevedo Sousa
Universidade Federal do Maranhão- UFMA

“Não é sobre chegar no topo do mundo e saber que venceu. É sobre escalar e sentir que o caminho te fortaleceu”

Ana Vilela

Dedico este trabalho... À minha família...Minha mãe, Ana Lúcia, pelo amor incondicional, companheirismo, por sempre sonhar os meus sonhos e juntamente com meu pai, Lourival Gomes, fazer sempre o possível para que estes sejam realizados. Aos meus irmãos Louriane e Lourival Filho, pelos momentos vividos, por torcerem e vibrarem com minhas conquistas. Este trabalho é nosso!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida, e por estar sempre ao meu lado conduzindo o meu caminho e não permitindo que eu fraquejasse frente as dificuldades.

Ao meu orientador, Professor Dr. Paulo Vitor, por sua dedicação e paciência que foram fundamentais para a realização deste trabalho. Serei sempre grata pela orientação segura e por confiar que eu poderia concluir este trabalho. Hoje és inspiração para mim, como pessoa e profissional. Obrigada pelas oportunidades que me concedeste e pela melhor orientação que poderia ter tido durante os desafios deste mestrado, que certamente fizeram a diferença na minha formação pessoal e profissional, como professora e pesquisadora.

À Marcelo Hortegal, obrigada por se fazer presente mesmo distante. Seu cuidado comigo é a prova real de que para estar junto não precisa estar perto. Obrigada pelo apoio, pelo conforto e pela torcida de sempre. Amo-te.

Ao meu pequeno Davi, quem me faz esquecer o cansaço do dia-a-dia e me incentiva, mesmo sem saber a ser uma pessoa melhor.

A todos do Grupo de Pesquisa em Imunologia Humana-UFMA, em especial às “irmãs” ou “filhas” científicas, Kelly, Carlinha e Laís, por terem me acolhido no grupo, pelo incentivo, carinho e torcida de sempre. E ao Eder pelo auxílio experimental e “psicológico” nos momentos finais deste mestrado.

Aos amigos, Liana, Douglas, André, Patrícia, Jefferson, Aluísio, pelos estudos compartilhados, pela disponibilidade em ajudar sempre que precisei. E sem falar dos nossos “rolezinhos”, sem o qual este mestrado não teria sido o mesmo. Obrigada por tornarem o dia-a-dia de laboratório mais prazeroso.

Às ICs do LPBM: Luana e Carol. Obrigada pelo companheirismo, pelos dias/noites em que me fizeram companhia nos experimentos, na maioria das vezes para não me deixar sozinha, e por todo empenho em me ajudar no que fosse preciso. Meninas, obrigada por tudo!

À ThiareFortes, eterna “mãe científica”, que foi uma grande incentivadora desde início dessa caminhada, a quem agradeço pelo esforço para que eu adentrasse no mestrado e pelo incentivo e torcida durante esses dois anos.

À Profa Dr^a Lucilene Silva, obrigada pelo apoio desde a graduação, por ter me acolhido no LPBM e me abraçado como sua aluna e amiga, sempre teve uma palavra carinhosa e um “abraço” confortante quando precisei.

Às professoras Flávia Nascimento, Ana Paula e Rosane Guerra, por serem inspiração para todos nós do laboratório de imunofisiologia (LIF). Obrigada pela oportunidade de trilhar o cansativo, porém prazeroso caminho que é a pesquisa ao lado de vocês. Isso com certeza fez a diferença na minha formação. Muito obrigada!

Ao prof. Dr. Antônio Condino, por abrir as portas do Laboratório de Imunologia Humana (LIH) – USP para a realização de parte desta pesquisa. Obrigada pela colaboração que certamente foi um diferencial neste trabalho e na minha formação. Obrigada, professor.

A todos do LIH, pela receptividade por me fazer sentir em casa (LIF). À Cris, Cristiane, Edson, Walmir, Jusley, Gabriela, Marina e principalmente a Paola Vendramini e a Tábata Takahashi pelo auxílio na realização dos experimentos. MUITO obrigada.

À Mirtes e Sulayne, minhas coletoras oficiais, pela disponibilidade que sempre precisei, dentro ou fora do laboratório. Obrigada, girls.

Aos amigos de longas datas, Marina e Marquinhos, pelos “Happy hours”, pela paciência em me ouvir falar do mestrado, pelas palavras de incentivo, torcida e amizade de sempre.

A professora Dr^a. Claudia Rocha pelo suporte no preparo e caracterização química do extrato. Obrigada pela disponibilidade em sanar as dúvidas que surgiram durante a elaboração deste trabalho.

À Dona Sonia e Dona Joana pelo carinho e cuidado que tens comigo.

À todos os doadores voluntários, MUITO obrigada!

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Maranhão- FAPEMA pela bolsa concedida e auxílio para realização deste trabalho.

E a todos, aqui não citados, que contribuíram de alguma forma para concretização deste trabalho.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REFERENCIAL TEÓRICO	3
2.1 Ontogenia e desenvolvimento dos neutrófilos.....	3
2.2 Reconhecimento e Fagocitose	6
2.3 Grânulos e degranulação	8
2.4 <i>Burst</i> Oxidativo	10
2.5 <i>Neutrophil extracellular traps</i> – NETs ou Armadilhas Extracelulares de Neutrófilos ..	12
2.6 Neutrófilos: uma nova visão.....	14
2.7 Neutrófilos como alvo terapêutico	15
2.8 <i>Dysphania ambrosioides</i> e seu potencial sobre o sistema imune.....	17
3. OBJETIVOS.....	21
4. MATERIAL E MÉTODOS	22
4.1 Extrato hidroalcoólico de <i>Dysphania ambrosioides</i> (EHDA).....	22
4.2 Caracterização química do EHDA.....	23
4.3 Análise <i>in silico</i> da ligação de flavonoides à proteína kinase C.....	23
4.4 Obtenção dos leucócitos do sangue periférico	24
4.5 Tratamento com EHDA.....	25
4.6 Avaliação da citotoxicidade do EHDA.....	25
4.7 Avaliação da fagocitose.....	26
4.8 Avaliação da degranulação	26
4.9 Avaliação do <i>burst</i> oxidativo.....	27
4.10 Quantificação das <i>Neutrophil extracellular traps</i> (NETs)	28
4.11 Análise estatística	29
5. RESULTADOS	30
5.1 Caracterização química do Extrato hidroalcoólico de <i>Dysphania ambrosioides</i> - EHDA	30
5.2 Ensaio <i>in silico</i> sugere interação do Kaempferol e Quercetina com a PKC.....	31
5.3 EHDA não demonstrou citotoxicidade elevada sobre neutrófilos.....	32
5.4 O tratamento com EHDA não interfere na fagocitose de fungos por neutrófilos humanos.	33
5.5 O EHDA estimula a exocitose dos grânulos citosólicos de neutrófilos humanos.....	34
5.6 O EHDA modula o <i>burst</i> oxidativo em neutrófilos humanos	37
5.7 O EHDA reduz a liberação das redes extracelulares de neutrófilos humanos.	39

6. DISCUSSÃO.....	42
7. CONCLUSÕES.....	49
REFERÊNCIAS	50
APÊNDICES	61
ANEXO	66

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AR: Artrite reumatoide

ATP: Adenosina trifosfato

BHI: *Brain Heart Infusion Broth*

CaCl₂: Cloreto de Cálcio

CCL2: Quimiocina quimioatrativa para monócitos

CD: *Cluster of differentiation*

CDs: Células dendríticas

CID: Dissociação induzida por colisão

CLR: Receptores para lectinas, do inglês *C-type lectin receptors*

CO₂: Dióxido de Carbono

COX-2: Cicloxigenase 2

CXCL12: Quimiocina 12

CXCR2: Receptor de quimiocina tipo 2

CXCR4: Receptor de quimiocina tipo 4

DAMPs: Padrões moleculares associados ao dano, do inglês *Damage-associated molecular patterns*

DGC: Doença granulomatosa crônica

DNA: Ácido desoxirribonucleico

EHDa: Extrato hidroalcolico de *Dysphania ambrosioides*

EROs: Espécies reativas de oxigênio

ESI: Ionização por eletrospray

FIA-ESI-IT-Msn: Espectrometria de Massas por infusão direta com fonte eletrospray e analisador ion trap

fMLP: Peptídeo N-formilado, do inglês N-Formylmethionyl-leucyl-phenylalanine

FPR1: receptor para peptídeos formilados, do inglês formyl peptide receptors

FSC: *Forward Scatter*

G-CSF: Fator estimulador de crescimento de granulócitos, do inglês Granulocyte colony-stimulating fator

GDP: Guanosina difosfato

GFP: Proteína fluorescente verde, do inglês *Green Fluorescent Protein*

GM-CSF: Fator estimulador de crescimento de monócitos e granulócitos, do inglês *Granulocyte macrophage colony-stimulating factor*

H₂O₂: Peróxido de hidrogênio

HCl: Ácido Clorídrico

HClO: Ácido hipocloroso

ICAM: Molécula de adesão intercelular, do inglês *Intercellular Adhesion Molecule 1*

IFN: Interferon

IL-1: Interleucina 1

IL-17: Interleucina 17

IL-23: Interleucina 23

IL-6: Interleucina 6

IL-8: Interleucina 8

LAD: Deficiência na adesão leucocitária

LAF-1: Antígeno associado a função linfocitária 1, do inglês *Lymphocyte function-associated antigen 1*

LAMP II: Proteína de membrana associada ao lisossoma 2, do inglês *Lysosome-associated membrane protein 2*

LES: Lúpus eritematoso sistêmico

LT: Leucotrieno

MAC-1: Antígeno de macrófago -1, do inglês *macrophage-1 antigen*

MAP: Proteína quinase ativada por mitógeno, do inglês *Mitogen Activated Protein Kinases*

MFI: Media de intensidade de fluorescência

MHC I: Complexo principal de histocompatibilidade I, do inglês *major histocompatibility complex I*

MHC II: Complexo principal de histocompatibilidade II, do inglês *major histocompatibility complex II*

MPO: Mieloperoxidase

NADPH: Fosfato de Dinucleotídeo Nicotinamina e Adenina, do inglês *Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*

NETs: Armadilhas extracelulares de neutrófilos, do inglês *Neutrophils extracellular traps*

NF-κB: Fator de transcrição nuclear κ-B

NO: óxido nítrico

NOD: Receptor do tipo NOD

O₂⁻: Ânion Superóxido

PAD-4: *protein arginine deiminase 4*

PAMPs: Padrões moleculares associados ao patógenos, do inglês *Pathogen-associated molecular patterns*

PBMC: Células mononucleares do sangue periférico, do inglês *Peripheral Blood mononuclear Cell*

PBS: Tampão fosfato de Sódio

PGE2: Prostaglandina E2

PKA: Proteína quinase A

PKC: Proteína quinase C

PRR: Receptor de reconhecimento padrão

RENISUS: Relação nacional de plantas medicinais de interesse ao SUS

SDF-1: Fator derivado da célula estromal, do inglês *Stromal cell-derived factor 1*

SSC: *Side Scatter*

SUS: Serviço único de saúde

TAN: Neutrófilos associados ao tumor

TCLE: Termo de consentimento livre e esclarecido

Th17: Célula T help 17

TLR: Receptor do tipo *Toll*

TNF- α : fator de necrose tumoral alfa, do inglês *tumor necrosis factor alpha*

VLA-1: Antígeno muito tardio-1, do inglês *Very Late Antigen-1*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Etapas do desenvolvimento e maturação dos neutrófilos.	4
Figura 2 Processo de migração dos neutrófilos da circulação para o tecido.	6
Figura 3 Receptores de reconhecimento padrão presente na membrana de neutrófilos.	7
Figura 4 Vias envolvidas no mecanismo de degranulação de neutrófilos.	10
Figura 5 Formação e ativação do complexo enzimático NADPH oxidase. ..	11
Figura 6 Esquema de diferenciação de Netose suicida e vital.	13
Figura 7 Mapa de distribuição de <i>Dysphania ambrosioides</i> pelo Brasil e exemplar da espécie	18
Figura 8 Docagem molecular entre os flavonoides quercetina ou kaempferol e a proteína kinase C delta.	31
Figura 9 Toxicidade do extrato hidroalcoólico de <i>Dysphania ambrosioides</i> em neutrófilos humanos.	32
Figura 10 Fagocitose de <i>Candida albicans</i> por neutrófilos tratados com EHDa.	33
Figura 11 Liberação dos grânulos primários de neutrófilos após tratamento com EHDa.	34
Figura 12 Liberação dos grânulos secundários de neutrófilos após tratamento com EHDa.	35
Figura 13 Liberação das vesículas secretoras de neutrófilos após tratamento com EHDa.	36
Figura 14 <i>Burst</i> oxidativo em neutrófilos humanos tratados com EHDa.	37
Figura 15 <i>Burst</i> oxidativo em neutrófilos humanos tratados com EHDa e estímulos com PMA.	38
Figura 16 Liberação das Armadilhas Extracelulares de Neutrófilos (NETs) após tratamento com EHDa.	39
Figura 17 Liberação de NETs de neutrófilos humanos tratados por uma hora com EHDa.	40
Figura 18 Avaliação microbiológica do EHDa.	61
Figura 19 Estratégia de aquisição e análise de fagocitose por citometria de fluxo.	62
Figura 20 Controle do ensaio de degranulação.	63
Figura 21 Cinética do <i>burst</i> oxidativo de neutrófilos tratados com EHDa.	64
Figura 23 Toxicidade do extrato hidroalcoólico de <i>Dysphania ambrosioides</i> em PBMC humanas.	65

RESUMO

Os neutrófilos dispõem de mecanismos rápidos de resposta imune a patógenos como a fagocitose e a liberação de potentes mediadores inflamatórios pré-formados ou não. No entanto, a ativação exacerbada dessas células está relacionada com a piora de algumas doenças inflamatórias e com os efeitos danosos nas infecções crônicas. A busca de novas fontes de moléculas que auxiliem na regulação desses mecanismos faz-se necessária. Nesse contexto, os produtos naturais são uma possibilidade interessante, e a espécie vegetal *Dysphania ambrosioides* (mastruz) apresenta diferentes atividades biológicas demonstradas em modelos experimentais. Neste trabalho, foi avaliado o efeito *in vitro* do extrato bruto hidroalcoólico de *Dysphania ambrosioides* (EHDA) em neutrófilos humanos. Para tal, neutrófilos do sangue periférico de doadores saudáveis foram tratados com EHDA nas concentrações de 5, 50 ou 125 µg/mL. Para o ensaio de fagocitose as células foram tratadas por uma ou quatro horas e incubadas com leveduras de *Candida albicans*-GFP (*Green Fluorescent Protein*) na proporção de 1:2 (célula: levedura), por 30 minutos, e analisada por citometria de fluxo. O EHDA não interferiu na atividade fagocítica dos neutrófilos, independente das concentrações e tempo de tratamento. Para avaliação da degranulação, os neutrófilos foram tratados por uma ou duas horas e marcados com anticorpos Anti-CD63 (grânulos primários), Anti-CD66b e Anti-CD15 (grânulos secundários) e Anti-CD14 (vesícula secretora). O EHDA estimulou a migração da vesícula secretora e grânulos secundários de maneira dose dependente, nos dois tempos avaliados. Já para os grânulos primários, no tempo de uma hora, apenas a maior concentração (125 µg/mL) induziu a exocitose desses, e em duas horas, esse efeito foi observado nas duas maiores concentrações (50 e 125 µg/mL). Quanto ao *burst* oxidativo, os neutrófilos tratados com EHDA por uma ou quatro horas, foram posteriormente estimulados ou não com acetato miristado de forbol (PMA); a produção dos reativos foi quantificada via quimioluminescência dependente de luminol e lucigenina. Como resultado, o tratamento induziu o *burst* oxidativo de forma semelhante nos dois tempos. E quando os neutrófilos receberam o estímulo posterior com PMA, nos grupos tratados com o extrato houve uma redução na produção desse reativos, e na maior concentração (125 µg/mL) essa redução foi mais expressiva. Já a liberação das NETs (Neutrophils Extracellular Traps) foi avaliada de forma quantitativa (emissão de fluorescência pelo método de Sytox® Orange) e qualitativa (por microscopia de fluorescência). O tratamento mostrou uma tendência de estimular NETs, porém, não foi significativo. E quando os neutrófilos foram tratados com EHDA e estimulados com PMA, o tratamento mostrou potencial de regular esse mecanismo de neutrófilos, semelhante ao resultado do *burst* oxidativo. O tratamento com o extrato hidroalcoólico de *Dysphania ambrosioides* estimulou os principais mecanismos efetores de neutrófilos humanos, sem manter essa ativação em níveis potencialmente deletérios para o organismo, além de modular a resposta num contexto de “super-ativação” na presença do PMA. Esses resultados reforçam a perspectiva de uso do mastruz como terapia, podendo ser aplicado em patologias infecciosas e/ou inflamatórias.

Palavras-chave: Neutrófilos, mastruz, inflamação, *burst* oxidativo, degranulação.

ABSTRACT

Neutrophils present rapid mechanisms of immune response against pathogens phagocytosis, as and release of potent preformed or not inflammatory mediators. However, exacerbated activation of these cells has been related to worsening of some inflammatory diseases and harmful effects in chronic infections. In this context, regulation of these mechanisms is necessary. Natural products are an interesting possibility, and the plant *Dysphania ambrosioides* (mastruz) already has several biological activities demonstrated, for example immunomodulation. In this work, we evaluated *in vitro* effect of crude hydroalcoholic extract of *Dysphania ambrosioides* (HEDa) on human neutrophils. Peripheral blood neutrophils from healthy donors were treated with HEDa at 5, 50 or 125 $\mu\text{g} / \text{mL}$ for one, two or four hours. After treatment by one or four, cells were incubated with *Candida albicans*-GFP (Green Fluorescent Protein) yeasts at a ratio of 1: 2 (cells: yeast) for 30 minutes, and phagocytosis was analyzed by flow cytometry. The HEDa did not interfere in phagocytic activity of neutrophils, regardless of the concentrations and time of treatment. For degranulation assay, neutrophils were treated for one to two hours and labeled with Anti-CD63 (primary granules), Anti-CD66b and Anti-CD15 (secondary granules) and Anti-CD14 (secretory vesicle) antibodies. HEDa stimulated migration of secretory vesicle and secondary granules in a dose dependent manner, in both evaluated times. However, in the one-hour period, only the highest concentration (125 $\mu\text{g} / \text{mL}$) induced exocytosis, and in two hours, this effect was observed in 50 and 125 $\mu\text{g} / \text{mL}$. For oxidative burst, neutrophils treated with HEDa were subsequently stimulated or not with phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA); production of reactive oxygen species (ROS) was quantified by luminol-dependent chemiluminescence and lucigenina assay. As a result, the treatment stimulated oxidative burst in a similar way in both times. When neutrophils received a posterior stimulus with PMA, cells treated with HEDa had a reduction in ROS generation, and at 125 $\mu\text{g} / \text{mL}$ this reduction was more expressive. Neutrophil Extracellular Traps (NETs) release was evaluated quantitatively (Sytox® Orange fluorescence assay) and qualitative (fluorescence microscopy). HEDa treatment showed a tendency to stimulate NETs, however, it was not significant. When neutrophils were treated with HEDa and stimulated by PMA, the treatment showed potential to regulate this mechanism, similar to oxidative burst results. Treatment with hydroalcoholic extract of *D. ambrosioides* stimulated the main effector mechanisms of human neutrophils without maintaining this activation at potential deleterious levels to the organism, and presented a modulatory effect in a PMA over-stimulated cells. These results reinforce the perspective of use of mastruz as a therapy, applied in infectious and / or inflammatory diseases.

Key words: Neutrophils, mastruz, inflammation, oxidative burst, degranulation

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é detentor de uma das maiores biodiversidades do mundo. Isso, aliado às várias influências culturais, vem definindo a medicina popular e o conhecimento específico sobre o uso de plantas. Em alguns casos, a aplicação como tratamento terapêutico de espécies vegetais com potencial medicinal apresenta efeito benéfico comparável aos medicamentos convencionais.

Com objetivo de estimular os pesquisadores a validar as propriedades farmacológicas das espécies vegetais, em 2009 o governo brasileiro criou a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS – RENISUS, que lista 71 espécies de plantas usadas na medicina popular brasileira. Uma das espécies presentes na RENISUS é *Dysphania ambrosioides*, usualmente conhecida como mastruz. É utilizada principalmente como anti-helmíntico, no tratamento de ulcerações, torções e como anti-inflamatório, sendo essencialmente empregada na forma de emplastos ou infusão das folhas.

Antes mesmo da RENISUS, o grupo de pesquisa do Laboratório de Imunofisiologia – UFMA já demonstrava resultados promissores para esta espécie vegetal, trazendo resultados promissores, como efeitos importantes no reparo ósseo (PINHEIRO NETO et al., 2005), ação antitumoral (NASCIMENTO et al., 2006) e potencial antileishmania (PATRICIO et al., 2008). Trabalhos mais recentes do grupo, demonstraram ação do mastruz como modulador na inflamação, por exemplo, apresentou efeito cicatrizante, em modelo de cistite (SOUSA, 2014, DA SILVA et al., 2015), analgésico, e levou a redução da área do joelho dos animais com osteoartrite (CALADO et al., 2016), redução de citocinas inflamatórias em modelo de sepse polimicrobiana (RIOS et al., 2017), redução de citocinas inflamatórias também foi observada na artrite, bem como potencial para inibir o desenvolvimento da doença (PEREIRA et al., 2018).

Considerando a ação do extrato de *D. ambrosioides* na resposta imune é relevante investigar de forma mais refinada o efeito dessa espécie sobre os leucócitos. Nesse sentido, os neutrófilos podem ser um alvo pertinente, pois são células de extrema importância na resposta imunológica. Essa importância fica evidente quando se tem falhas na produção ou na função dessas células (GARRAFFO et al., 2017). E apesar de sua incontestável importância, a ativação desregulada dos neutrófilos ou sua manutenção durante a inflamação, está relacionada com desenvolvimento ou piora de doenças inflamatórias (PINEGIN et al., 2015).

Todas essas possibilidades são consequências da capacidade funcional robusta apresentada pelos neutrófilos, pois além da sua importância na eliminação de patógenos através dos seus mecanismos microbicidas, produzindo espécies reativas de Oxigênio (EROs), liberando enzimas proteolíticas dos grânulos citosólicos e as chamadas redes extracelulares de neutrófilos (NETs), podem também direcionar a resposta imune, já que apresentam competência para liberação não apenas de componentes pré-formados, mas também para síntese de citocinas e quimiocinas. Dessa forma, agem no recrutamento de outros leucócitos, atuando na regulação da inflamação (NAUSEEF et al., 2014, LELIEFELD et al., 2017).

A função dos neutrófilos na resposta imunológica faz com que estes representem um bom alvo para investigação dos efeitos moduladores do mastruz. De fato, a atividade imunomoduladora dessa espécie vegetal, já demonstrada em vários modelos animais, pode estar relacionada com seu efeito sobre os neutrófilos, principalmente no contexto das inflamações. Dessa forma, considerando a ausência de trabalhos que avalie o efeito do mastruz na função dos neutrófilos, neste trabalho buscou-se avaliar o efeito do tratamento *in vitro* com extrato de *Dysphania ambrosioides* sobre neutrófilos humanos, e também quando foram ativados de forma demasiada.

Esta pesquisa trouxe uma nova perspectiva da ação do mastruz sobre o sistema imunológico, avançando no entendimento dos seus efeitos regulatórios e iniciando experimentos diretamente em células humanas. Com isso, renovamos o panorama de estudo dos produtos naturais em nosso grupo de pesquisa e as possibilidades de modelos de avaliação *in vitro* e *in silico*.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Ontogenia e desenvolvimento dos neutrófilos

Os neutrófilos juntamente com os outros leucócitos polimorfonucleares (eosinófilos e basófilos) foram primeiramente descritos pelo médico suíço Paul Ehrlich, pela identificação do núcleo lobulado e a presença dos grânulos citosólicos característicos desse tipo celular (BORREGAARD; COWLAND, 1997; KAY, 2016).

Estudos iniciais mostraram uma grande habilidade dos neutrófilos em eliminar microrganismos, sendo esta por muito tempo considerada sua principal função, ao ponto que foram caracterizados de forma limitada com papel importante apenas na imunidade inata, durante a inflamação aguda e no combate a agentes patogênicos (UNDERHILL et al., 2016).

Os neutrófilos são produzidos e maturados na medula óssea a partir de células estaminais hematopoiéticas em um processo denominado de "granulopoiese". Esta contempla três etapas, com fases de diferenciação distintas (Figura 1): Etapa A – o conjunto de células-tronco, composto por células-tronco hematopoiéticas e progenitoras pluripotentes; Etapa B – o conjunto mitótico com alta proliferação agregando as fases de mieloblasto, promielócitos e mielócitos; Etapa C – o conjunto pós-mitótico, composto de metamielócitos, bastonetes e neutrófilos maduros (KRUGER et al., 2015); em média, pode levar duas semanas para completar todas as etapas.

A partir da fase promielocítica inicia-se a formação dos grânulos. Os primeiros são os azurófilos ou primários, que são ricos em hidrogenases, mieloperoxidases e proteases. Na fase seguinte, mielocítica, formam-se os grânulos específicos ou secundários, os quais têm na sua composição lisozima, colagenase e elastase. Já os grânulos terciários, compostos de colagenase, catepsinas e glicoproteínas, são formados na fase final da maturação. Por último, são formadas vesículas secretoras de origem endocítica, composta apenas por proteínas plasmáticas que formam a sua matriz (BORREGAARD et al., 2007; COWLAND; BORREGAARD, 2016). Os neutrófilos ao atingirem a fase final da maturação, estão prontos para serem liberados na circulação, de onde podem migrar para os tecidos e realizar suas funções efetoras.

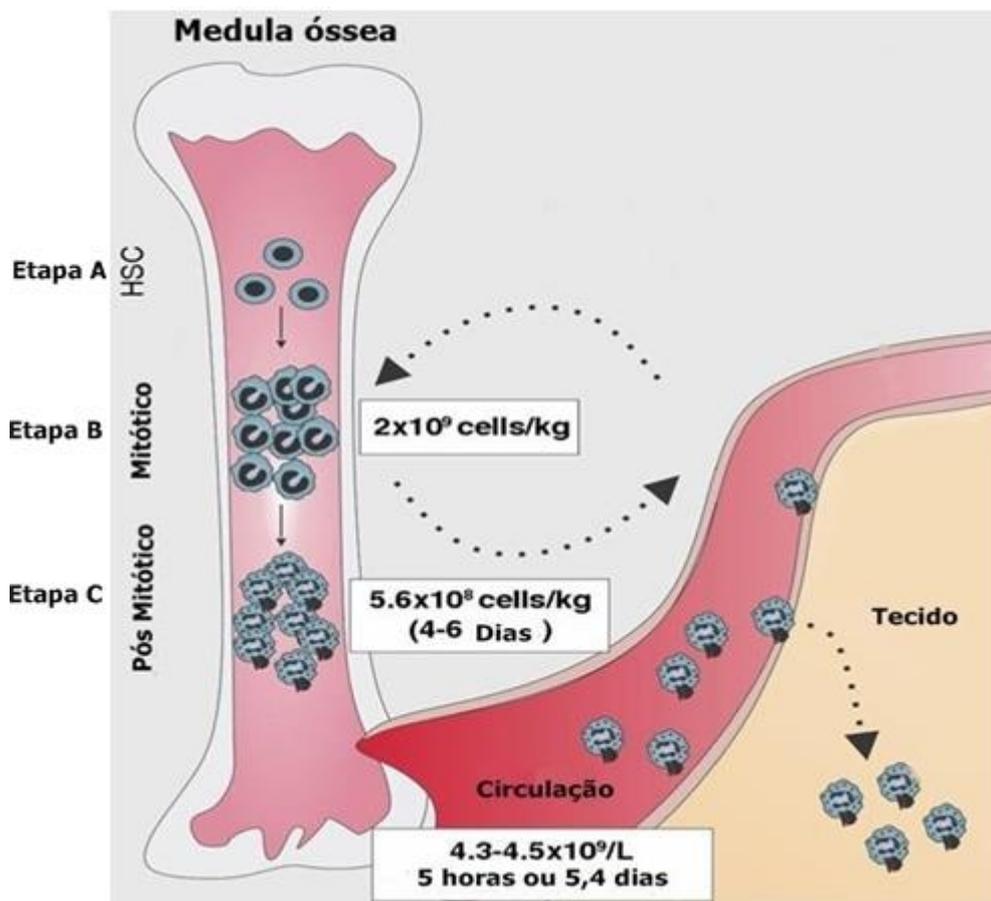


Figura 1 Etapas do desenvolvimento e maturação dos neutrófilos. Fonte: adaptado de Silvestre-Roig et al., (2016).

A manutenção da homeostase dos neutrófilos é condicionada pela produção, maturação e liberação regulada. A apoptose de neutrófilos senescentes e o G-CSF (*Granulocyte Colony-Stimulating Factor*) são os principais fatores relacionados com essa regulação (CAIN et al., 2011). Em condições fisiológicas, a fagocitose de neutrófilos apoptóticos ou necróticos por macrófagos teciduais (eferocitose) reduz a produção da interleucina-23 (IL-23). Essa redução reprime a liberação da Interleucina-17 (IL-17) por linfócitos Th17, regulando negativamente a produção de G-CSF (STARK et al., 2005; VON VIETINGHOFF; LEY, 2009) e, consequentemente, a maturação dos neutrófilos. É importante que esse processo seja rigorosamente regulado para assegurar uma proteção adequada ao indivíduo com mínimos danos ao organismo.

A liberação dos neutrófilos para o sangue requer a ação coordenada de algumas citocinas e seus receptores. Por exemplo, a expressão de receptores de quimiocina, como CXCR2 e CXCR4, é essencial para liberação e retenção, respectivamente, dos neutrófilos (AMULIC et al., 2012). O CXCR4 é receptor do fator derivado das células do estroma (SDF-1 α), ou

CXCL12, que é expresso constitutivamente em níveis elevados na medula, e os níveis de expressão de CXCR4 vão reduzindo ao passo que a célula amadurece. Ainda, tem sido notado um aumento na expressão de CXCR4 em neutrófilos envelhecidos na circulação, de modo a direcionar seu retorno a medula onde serão eliminados (MARTIN et al., 2003).

Uma vez na circulação, os neutrófilos são os primeiros a serem recrutados para o sítio de resposta, seja em um contexto de inflamação estéril ou em um processo infeccioso. E, devido aos mecanismos eficientes no controle de patógenos, são considerados a primeira linha de resposta celular (KOLACZKOWSKA; KRULES, 2013). Tal função fica bem evidente quando se considera os casos de anomalias congênitas, ou adquiridas, relacionadas com falhas quantitativas ou funcionais de neutrófilos, levando a susceptibilidade, persistência e recidivas de infecções (FREITAS et al., 2009; VAN DEN BERG et al., 2011).

O processo de migração da circulação para o tecido, conhecido como diapedese ou transmigração, requer regulação de vias de sinalização intracelulares que permitem aos neutrófilos detectarem substâncias quimioatraentes e migrarem em direção a estes estímulos (quimiotaxia). Essas substâncias podem ser produzidas pelo próprio organismo ou pelo patógeno invasor. Além disso, esse processo envolve uma complexa interação entre o neutrófilo e o endotélio vascular adjacente (DIMASI et al., 2013).

Na circulação, devido ao seu estado de maturação, os neutrófilos respondem rápido aos estímulos de perigo, como o Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α) e a interleucina-1 (IL-1) (LIU et al., 2004). Estas moléculas estimulam o epitélio vascular, a expressar receptores importantes para a migração dos neutrófilos do lúmen vascular para o tecido.

Essa migração é guiada por ligações específicas dependentes das moléculas de adesão da família das selectinas e integrinas. As moléculas E e P-selectinas vão “frear” os neutrófilos por uma ligação de baixa afinidade promovendo assim o rolamento dessas células (SUNDD et al., 2011). O rolamento aumenta a exposição dos neutrófilos às citocinas, induzindo a ativação das integrinas, como VLA-1 (antígeno muito tardio-1), MAC-1 (antígeno de macrófagos 1) e LFA-1 (Antígeno associado a função linfocitária 1) (MCDONALDS et al., 2010). Essas moléculas medeiam uma forte ligação com as células endoteliais, proporcionando alterações conformacionais mediadas por remodelação dos filamentos de actina, induzindo as células a “rastejarem” até completarem a transmigração para o tecido (SULLIVAN; MULLER, 2014) (Figura 2).

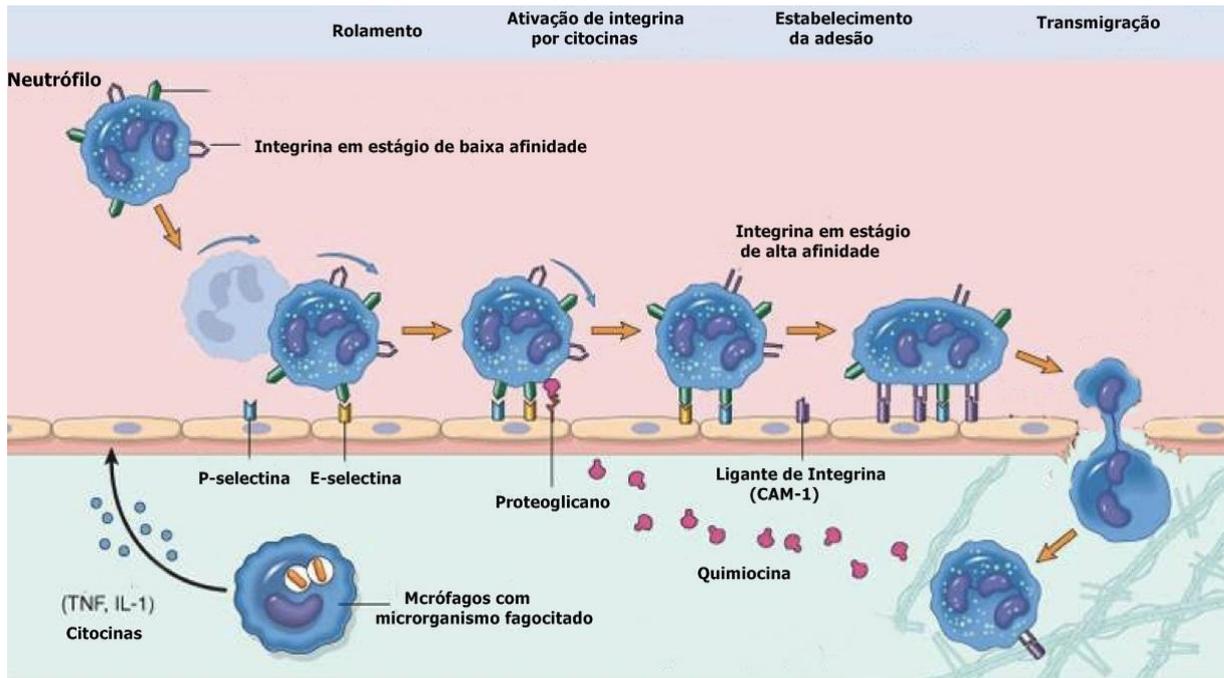


Figura 2 Processo de migração dos neutrófilos da circulação para o tecido. Fonte: adaptado de Kumar et al., *Pathologic Basis of Disease*, ed 9. 2017.

2.2 Reconhecimento e Fagocitose

No tecido, os neutrófilos são importantes na proteção do organismo contra agentes infecciosos, pois são capazes de reconhecer e eliminar esses microrganismos. Esse reconhecimento se dá através dos Receptores de Reconhecimento de Padrões (PRR) (Figura 3), que identificam os Padrões Moleculares Associados ao Patógeno (PAMPs) (LEE et al., 2003), como os peptídeos N-formil. O reconhecimento desses peptídeos se dá via receptor do peptídeo formil (FPR1) que se liga ao tripeptídeo bacteriano f-Met-Leu-Phe, o qual também identifica danos teciduais (MAYADAS et al., 2014).

Os neutrófilos expressam uma série de outros PRRs, como a integrina MAC-1 (CD11/CD18), a maioria dos receptores da família TLR (*Toll Like Receptors*), com exceção do TLR3 (MAYADAS et al., 2014) e os CLR (C-type lectin Family of receptors) que compõem uma família diversificada de proteínas que possuem um ou mais domínios de lectina do tipo C que vão reconhecer porções de carboidratos, dentre eles tem a Dectina-1 (LI et al., 2011; LEE et al., 2012).

Além dos receptores de membrana, existem receptores semelhantes a NOD 1 (*nucleotide binding oligomerization domain protein 1*), que são PRRs localizados no citoplasma. Essas proteínas servem para detectar componentes microbianos intracelulares de

forma semelhante a outras PRRs, induzindo cascatas de sinalização envolvidas na mediação de resposta inflamatória e função neutrofílica (RIGBY et al., 2012).

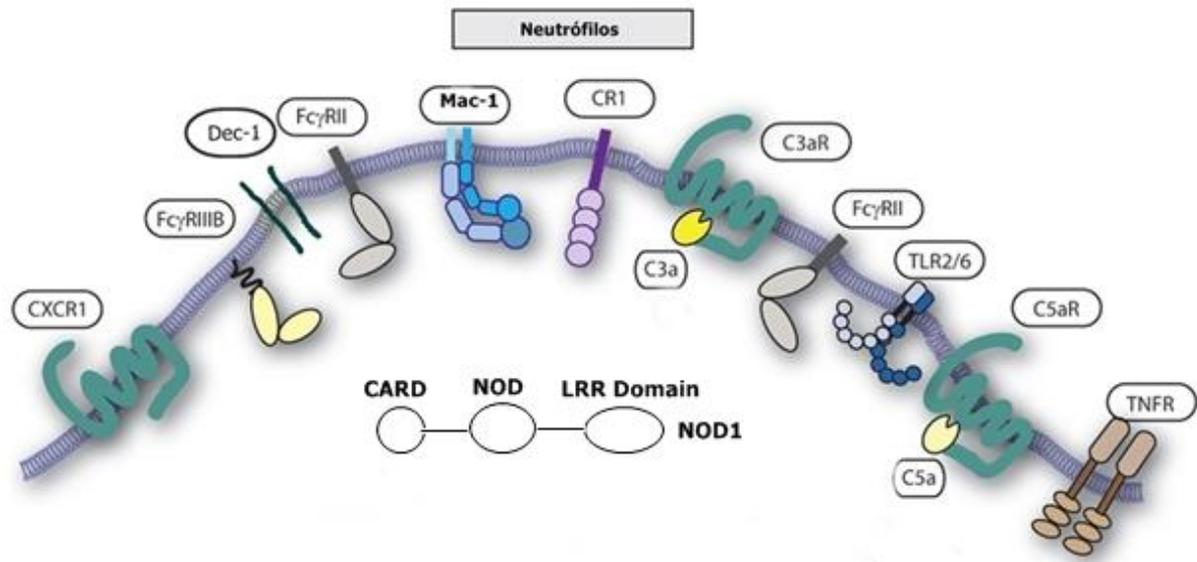


Figura 3 Receptores de reconhecimento padrão presente na membrana de neutrófilos CXCR1, receptores Fc, Dec-1, Mac-1, CR1, C3aR, receptores TLR, receptores TNF, NOD. Fonte: adaptado de Van Kessel et al., 2014.

O contato inicial célula-microrganismo leva a sinais intracelulares diversos, gerando alterações no citoesqueleto que antecede o processo de fagocitose. Este pode ser dividido em algumas fases, como: 1. Reconhecimento e fixação, através dos receptores de membrana, como citados anteriormente; 2. Mudanças morfológicas, como a extensão de pseudópodes em torno do alvo já fixado; 3. Absorção, tendo como resultado a formação do fagossoma. Mesmo depois que um fagossoma é formado, sua composição inicial não é antimicrobiana, fazendo-se necessário a maturação do mesmo. A maturação do fagossoma (mobilização e fusão de vesículas e grânulos) e a ativação do sistema NADPH oxidase (produção das espécies reativas de oxigênio) é essencial para eliminar o agente infeccioso (LEE et al., 2003)

Além do reconhecimento de patógenos e danos teciduais, sinais de células linfóides, citocinas e quimiocinas, também irão ativar as funções efetoras de neutrófilos via reconhecimento de PRRs (MANTOVANI et al., 2011), agindo no recrutamento e ativação de várias funções dessas células, como por exemplo, a degranulação e a produção de reativos de oxigênio (LI et al., 2011; LEE et al., 2012).

2.3 Grânulos e degranulação

Os neutrófilos são detentores de um conjunto de substâncias com potencial microbicida que estão envolvidos em grânulos distribuídos pelo citoplasma da célula, e no momento que essas células são ativadas os grânulos migram para a membrana, seja do fagossoma ou membrana plasmática (LACY; 2006). Além da atividade microbicida, a degranulação pode ter importância nas fases iniciais da ativação dos neutrófilos, como adesão, reconhecimento e produção de reativos de oxigênio.

Os grânulos de neutrófilos podem ser divididos em quatro tipos: primários ou azurófilos, secundários ou específicos, terciários ou de gelatinase e as vesículas secretoras, e são formados nessa ordem durante a granulopoiese (COWLAND; BORREGAARD, 2016). Todos os subconjuntos de grânulos compartilham características estruturais comuns, uma membrana de bicamada fosfolipídica e uma matriz intragranular que contém proteínas destinadas a exocitose. Porém, cada tipo apresenta sua particularidade em termos de composição (FAURSCHOU; BORREGAARD, 2003).

Os grânulos primários são definidos também como grânulos peroxidase positivos, tem como proteína determinante a hemeproteína mieloperoxidase (MPO), além da elastase, catepsinas, e defensinas. Apresenta potencial para ativação de células endoteliais, epiteliais e outros leucócitos como os macrófagos e linfócitos, além de potente ação antimicrobiana. Os marcadores lisossomais clássicos, como LAMP III (CD63), e a maioria dos receptores de glicoproteína estão presentes nos grânulos primários (COWLAND; BORREGAARD, 2016).

Os grânulos secundários e terciários são caracterizados como peroxidase negativos. Os grânulos específicos como também são chamados os grânulos secundários, são maiores e participam principalmente da atividade antimicrobiana no fagossoma ou no exterior da célula. A lactoferrina, componente majoritário nos grânulos secundários tem uma atividade antimicrobiana sobre um amplo espectro de bactérias Gram positivas e negativas. Essa proteína limita o crescimento bacteriano via sequestro de ferro e pode ligar-se à membrana dos patógenos, causando danos irreversíveis como a lise celular (ORSI et al., 2004). Já os grânulos terciários são mais facilmente excitados, caracterizados como reservatório de enzimas degradantes da matriz, como a gelatinase, o que reforça sua importância na transmigração (COWLAND; BORREGAARD, 1997).

Além dos grânulos de gelatinase, as vesículas secretoras têm papel fundamental na migração para o tecido. São supostamente formadas via endocitose, pois apresentam proteínas

plasmáticas na sua constituição. A membrana é rica em receptores, como as integrinas CD11b / CD18 (Mac-1, CR3); o receptor de complemento 1 (CR1); os receptores para os peptídeos formilados bacterianos (formil metionil-leucil-fenilalanina (fMLP) -receptores); o receptor para LPS / receptor de ácido lipoteicoico CD14; e o receptor FcγIII (CD16). Essas moléculas são incorporados à membrana da célula após exocitose. A mobilização de vesículas secretoras é acompanhada da liberação de L-selectina da superfície do neutrófilo (FAURSCHOU; BORREGAARD, 2003). E essas alterações de superfície favorecem uma maior adesão ao endotélio ativado, preparando a célula para migração. As características funcionais dos diferentes grânulos suportam a ideia da hierarquia de mobilização e exocitose da vesícula secretora, seguida dos grânulos de gelatinase, específicos e, por fim, os azurófilos.

Vários estímulos levam a degranulação, a qual ocorre pela ativação de quinases Src (Figura 4). Essas proteínas quinases ativam outras vias, uma delas é a liberação de Ca^{2+} intracelular que vai induzir a exocitose gradual (vesícula secretora, grânulos terciários, secundários e primários). Além do aumento de cálcio, a hidrólise de ATP e GTP são fundamentais para que ocorra a degranulação (LACY, 2006).

A exocitose dos grânulos obedece a uma sequência. Primeiramente, ocorre o recrutamento dos grânulos para a membrana alvo, que pode ser do fagossoma ou membrana celular, de forma dependente da remodelação do citoesqueleto de actina e da montagem dos microtubulos. Isso é seguido pela ancoragem, levando ao contato da superfície exterior da membrana que envolve o grânulo com a superfície interna da membrana alvo, decorrendo na fusão completa do grânulo com a membrana para liberar o seu conteúdo (LACY et al., 2006). Inicialmente, as proteínas Rab ligam as vesículas às membranas alvo, depois as proteínas SNARE catalisam a fusão completa do grânulo com a membrana alvo para liberar o conteúdo granular (SHESHACHALAM et al., 2014).

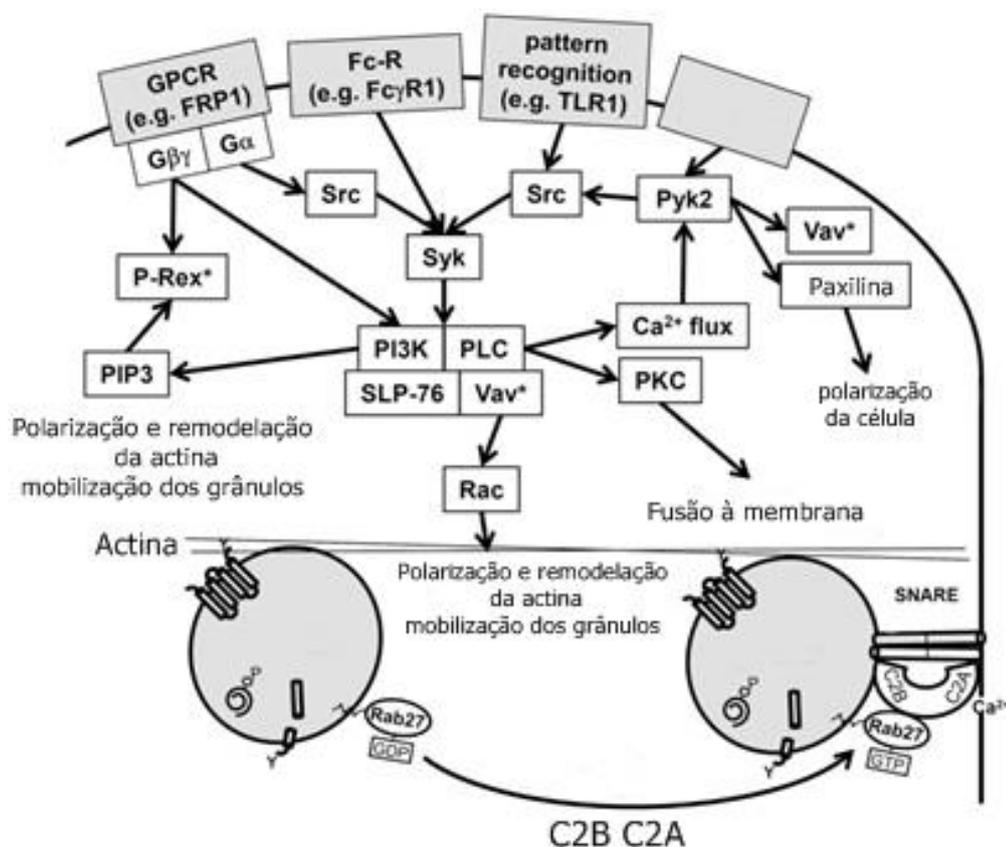


Figura 4 Vias envolvidas no mecanismo de degranulação de neutrófilos. Fonte: adaptado de Sheshachalam et al., (2014).

É notória a importância da degranulação dos neutrófilos para a proteção do organismo, mas esse mecanismo precisa ser bem regulado. De forma excessiva, a liberação dos grânulos pode causar danos teciduais graves, sendo comum em muitas doenças inflamatórias, como na asma grave e doença pulmonar obstrutiva crônica (WARK et al., 2002; WRIGHT et al., 2010).

2.4 Burst Oxidativo

Os grânulos que são peroxidase negativos apresentam nas suas membranas o citocromo *b*₅₅₈, que é transferido para a superfície ou para a membrana fagossômica quando o neutrófilo é ativado (FAURSCHOU; BORREGAARD, 2003). O citocromo *b*₅₅₈ é formado por duas proteínas, a p22phox e a gp91phox que formam as subunidades transmembranares do complexo enzimático NADPH oxidase (Figura 5), juntamente com outras três proteínas citosólicas (p47phox, p67phox e a p40phox) e uma proteína G (rac-2). A NADPH oxidase é responsável

Pela explosão respiratória ou *burst* oxidativo que se caracteriza pela geração de espécies reativas de Oxigênio (EROs), como o ânion superóxido (O_2^-), peróxido de Hidrogênio (H_2O_2) e ácido hipocloroso (HClO) (LAMBETH et al., 2014; WINTERBOURN et al., 2016), um dos mecanismos microbicidas e inflamatórios mais conhecido.

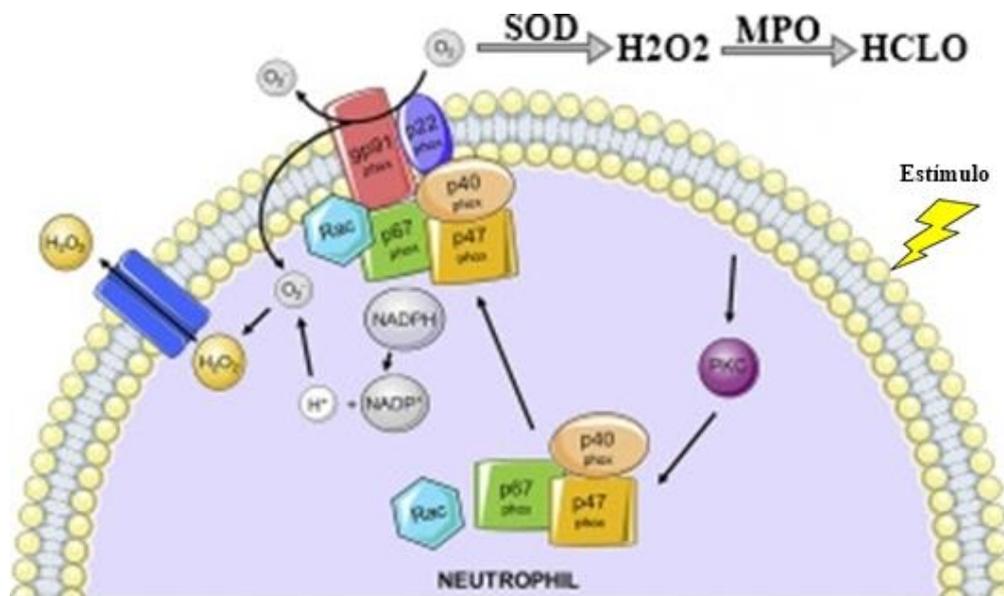


Figura 5 Formação e ativação do complexo enzimático NADPH oxidase. Fonte: Paloschi et al., (2018).

No momento em que a célula é ativada, os componentes citosólicos são fosforilados e migram para a membrana, onde se associam ao citocromo b_{558} . Concomitantemente, a proteína Rac-GDP se associa a uma molécula de ATP e migra para a membrana. O citocromo é, então, ativado pela p67phox e Rac, iniciando o funcionamento do sistema. Inicialmente, é produzido o ânion superóxido (O_2^-), que é convertido em peróxido de hidrogênio na presença de prótons de hidrogênio (H^+) pela superóxido dismutase (SOD) e posteriormente a mieloperoxidase (MPO) usa o H_2O_2 para produzir ácido hipocloroso (HClO) (LAMBERT et al., 2014).

A importância desse sistema fica bem clara nos estudos envolvendo os pacientes com doença granulomatosa crônica (DGC), nos quais a produção do O_2^- é ausente ou reduzida. Nesses indivíduos, nota-se uma susceptibilidade a infecções, o que também reforça a importância dos EROs como mecanismo de eliminação de patógenos (TSUJI et al., 2014).

Além de serem importantes na eliminação de patógenos, os EROs participam da sinalização intracelular fisiológica regulando o crescimento e adesão celular, diferenciação, senescência e apoptose (MITTAL et al., 2014). No entanto, a produção exacerbada desses reativos pode levar a reações com as moléculas do hospedeiro, oxidando os constituintes celulares, causando lesões teciduais e danos no DNA. Ainda, as EROs atuam na ativação de

outros mecanismos de neutrófilos como os relacionados com a liberação de material genético na forma de armadilhas, as Armadilhas Extracelulares de Neutrófilos- NETs (DELGADO-RIZO et al., 2017).

2.5 *Neutrophil extracellular traps* – NETs ou Armadilhas Extracelulares de Neutrófilos

Na segunda metade da década de 90, foi descrita uma nova forma de morte celular diferente da apoptose e necrose. Primeiramente, foram referidas algumas etapas: a fusão do núcleo multilobulado; redução e descompactação da cromatina; rompimento do envelope nuclear, mas com a manutenção das organelas citoplasmáticas íntegras; e, após 3 horas, rompimento da membrana extracelular em um mecanismo dependente de EROs (TAKEI et al., 1996).

Atualmente, tal mecanismo é descrito como NETose, processo em que estruturas de DNA são liberadas devido a descondensação da cromatina. Essas estruturas são conjugadas a diferentes componentes dos grânulos, como a elastase, mieloperoxidase, lactoferrina, pentraxina, com elevado potencial microbicida (PAPAYANNOPOULOS et al., 2010).

Na sequência, foram descritos três modelos de NETose. A NETose “suicida” (Figura 6), que atualmente é o modelo mais bem descrito e é dependente de EROs. Após ativação e formação do complexo NADPH oxidase, ocorre o influxo de íons Cálcio no citoplasma, atuando como um cofator da enzima peptídeo arginase desaminase 4 (PAD 4) que age na desaminação das histonas, permitindo a descondensação da cromatina (AL-KHAFIJI et al., 2016; DELGADO-RIZO et al., 2017). As EROs atuam na separação e perda da membrana nuclear, permitindo que a cromatina se espalhe pelo citoplasma onde se unirá às proteínas citoplasmáticas e componentes dos grânulos (DELGADO-RIZO et al., 2017).

Na NETose vital, os neutrófilos não tem sua vida útil afetada pela perda do DNA e é uma via independente de EROs. Esse tipo de NETose pode ser induzida via TLR por produtos microbianos, DAMPs (Padrões Moleculares Associado à Patógenos) ou plaquetas ativadas, e segue três etapas: expansão do envelope nuclear; liberação das vesículas seguida da descondensação e ruptura do envelope nuclear no final. Diferente da NETose suicida, a membrana plasmática não é rompida porque as NETs são transportadas e liberadas por vesículas, e no final os neutrófilos permanecem vivos e aptos a desempenhar algumas funções, como por exemplo a fagocitose (JORCH; KUBES, 2017). Ainda há um segundo tipo de

NETose vital, em que não há liberação do DNA nuclear, mas sim, do DNA mitocondrial (YIPP; KUBES, 2013).

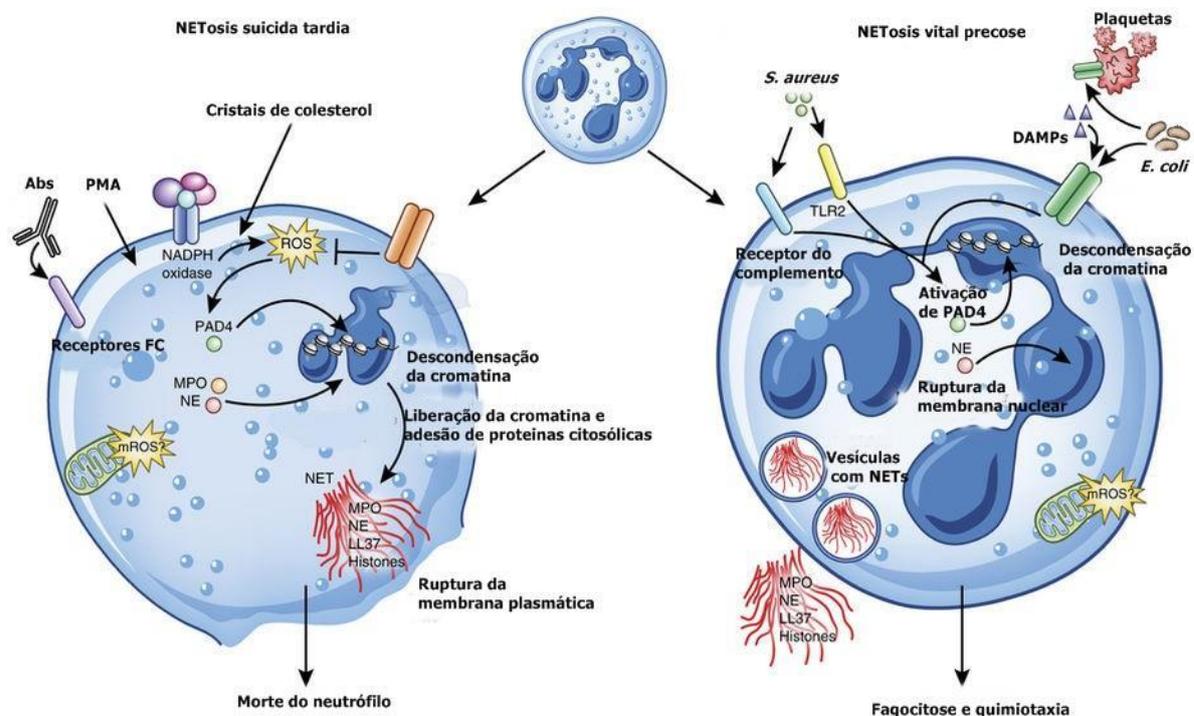


Figura 6 Esquema de diferenciação de Netose suicida e vital. Fonte: adaptado de JORCH; KUBES, 2017.

As NETs desempenham um papel crucial na homeostase do organismo, atuando na resposta contra as mais variadas infecções, porém, também estão relacionadas a processos patológicos. Durante a NETose, as proteínas intracelulares ficam expostas, o que eleva a exposição de autoantígenos e DAMPs ao sistema imune, amplificando a resposta inflamatória (JORCH; KUBES, 2017). Essa relação pode explicar o envolvimento das NETs no desencadeamento em doenças autoimunes como lúpus eritematoso sistêmico, em que os pacientes apresentam altos níveis de anticorpos anti-ribonucleoproteína e DNA no soro, os quais podem ser induzidos pela NETose (GUPTA; KAPLAN, 2016). Na artrite reumatoide os pacientes produzem mais NETs e maiores quantidades de EROs do que aqueles em indivíduos não afetados, além de apresentarem maiores níveis de MPO no soro (JORCH; KUBES, 2017). A participação das NETs no processo inflamatório as tornam um fator de estudo para o diagnóstico ou terapêutica dessas patologias.

2.6 Neutrófilos: uma nova visão

Todos esses mecanismos reforçam a ideia do neutrófilo como uma célula diversificada, com importância além da imunidade inata. Novos estudos colocam o neutrófilo agindo ativamente em fases da resposta imune em que se pensava ser desempenhada somente por outros leucócitos. As citocinas liberadas por neutrófilos podem direcionar vias de sinalização, além de mediar as interações com as outras células do sistema imune como macrófagos, células dendríticas, células *natural killer* e linfócitos, modulando sua resposta (RAVICHANDRAN, 2011, KOLACZKOWSKA; KUBES, 2013).

No contexto da inflamação, os neutrófilos podem ser encontrados em órgãos linfóides periféricos, como linfonodos e baço. Essa migração pode ser via vasos sanguíneos através da vênulas endoteliais altas ou vasos linfáticos aferentes, dependente de integrinas como MAC-1 e LFA1 e do receptor CXCR4 (LELIEFELD et al., 2015). Além de chegarem até os órgãos linfóides, os neutrófilos podem ativar os linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ via apresentação de antígenos através da expressão de moléculas de MCH II e I e moléculas co-estimulatórias (CD80/CD86), induzindo assim, a proliferação desses linfócitos (HUFFORD et al., 2012, TAKASHIMA et al., 2015).

Outro ponto importante que vai contrastar com a ideia finalista dos neutrófilos é que estas células podem apresentar variação no fenótipo influenciado pelo microambiente tumoral. Os neutrófilos constituem uma parte significativa do infiltrado inflamatório em diferentes modelos de câncer. Essas células são atraídas para os tumores sob a influência de citocinas e moléculas de adesão produzidas nesse microambiente, adquirindo fenótipos e funções, que os caracterizam como neutrófilos associados ao tumor (TANs) (HAGERLING; WERB, 2016).

Os TANs, por sua vez, podem influenciar o nicho do tumor através da liberação de citocinas (por exemplo, TNF- α , IL-1 β , IL-12), quimiocinas, EROs e fatores de crescimento (LOPEZ-LAGO et al., 2013). De acordo com o fenótipo apresentado, essas células são caracterizadas como N1 ou N2. Na presença de TGF- β , os TANs residentes podem adquirir um fenótipo pró-tumor, N2. No entanto, se o TGF- β for bloqueado pela administração de anticorpos monoclonais, os neutrófilos adquirem um fenótipo anti-tumoral, N1 (SHAUL et al., 2016). Os neutrófilos N1 podem ser identificados por núcleos hiper-segmentados, aumento da expressão de ICAM, produção de TNF- α e capacidade de ativar os linfócitos T CD8⁺. Já os neutrófilos N2 são caracterizados por alta expressão de quimiocinas CCL2 e CCL5 e capacidade de inibir funções de células T efetoras (SHAUL et al., 2016). Esses fenótipos N1 e N2 dos neutrófilos

seguem os perfis de polarização de macrófagos inflamatórios, M1 e reguladores, M2, já bem estabelecidos.

Outra visão bem habitual é que os neutrófilos são considerados menos importantes ou até mesmo inibidores do processo de cicatrização. No entanto, foi demonstrado que a depleção de neutrófilos prejudica a reconstituição tecidual, como em um modelo de cicatrização de pele em camundongos idosos (NISHIO et al., 2008). Porém não é um efeito restrito a idade, pois um resultado semelhante foi mostrado por Paris et al., (2016) no qual foi observado que camundongos neutropênicos apresentaram dificuldade para reparar o epitélio pulmonar.

Um ponto importante que foi refutado é a característica de vida curta dos neutrófilos. Estudos demonstram que o neutrófilo pode ter em torno de 5,4 dias de vida na circulação/ tecido (PILLAY et al., 2010). E o próprio microambiente inflamatório pode prolongar a sobrevivência dessas células, fatores como citocinas, DAMPs e PAMPs, são responsáveis por inibir a apoptose e mantê-los por mais tempo (GEERING et al., 2013; SUNDQVIST et al., 2013).

2.7 Neutrófilos como alvo terapêutico

Uma vez que o promotor do processo inflamatório é eliminado, faz-se necessário modular essa inflamação para assim retornar a homeostase do organismo. No entanto, quando esse mecanismo falha, pode levar ao dano tecidual e isso contribui para a cronicidade de algumas doenças inflamatórias e autoimunes (NATHAN; DING, 2010).

Um passo inicial para essa regulação é o cumprimento da morte celular programada, que funciona como mecanismo de eliminação dos neutrófilos que já desempenharam sua função. Com isso, geram-se sinais que levam à redução do recrutamento de neutrófilos e aumento de macrófagos, associado à alteração do seu perfil celular de um pró inflamatório M1 para um regulador M2 (ORTEGA-GÓMEZ et al., 2013). A falha nesse processo leva a persistência de granulócitos ativados, gerando danos aos tecidos pela liberação de proteases ou de compostos/moléculas que promovam a inflamação (WRIGHT et al., 2014).

A produção desses reativos pelos neutrófilos também está relacionada com doenças inflamatórias nas articulações. Pacientes com artrite reumatóide (AR) apresentam na circulação neutrófilos “primados” para a produção de EROs (WRIGHT et al., 2014). Esses reativos de oxigênio são cruciais para a liberação das NETs. O processo de NETose por neutrófilos da circulação, como do líquido sinovial de pacientes com AR, é maior que em neutrófilos de pessoas saudáveis (KHANDPUR, et al., 2013). Já se sabe que as NETs apresentam grande

quantidade de autoantígenos e material dos grânulos citosólicos, como proteases que também estão relacionadas com lesões teciduais provenientes do processo inflamatório.

Fenômeno semelhante ao que acontece na AR também foi observado no lúpus eritematoso sistêmico (LES). Nesse caso, foi caracterizada uma subpopulação de neutrófilos denominados de neutrófilos de baixa densidade que revelou um fenótipo pró-inflamatório e ativado com produção exacerbada de interferons do tipo I e capacidade fagocítica reduzida (DENNY et al., 2010). Em humanos, esses neutrófilos mostraram um excesso de liberação das NETs mesmo na ausência de estímulo, sendo responsável pela toxicidade de células endoteliais (VILLANUEVA et al., 2011), o que leva a acreditar que a produção de anticorpos anti-ribonucleoproteínas desenvolvidos em pacientes com LES foi induzida pela liberação das NETs (LANDE et al., 2011).

Nesse contexto em que os neutrófilos aparecem com papel importante nas doenças inflamatórias, principalmente devido a falhas nos mecanismos de regulação, é relevante a busca por moduladores que possam regular sem depletar as atividades essenciais dos neutrófilos, uma vez que são indispensáveis na proteção do organismo contra agentes patogênicos.

Novas estratégias terapêuticas que visam a minimizar ou neutralizar mediadores do processo inflamatório tem despertado o interesse dos pesquisadores. Uma das estratégias é reduzir a migração das células ou eliminá-las do foco de resposta. O acúmulo de neutrófilos no foco inflamatório é um dos pontos de piora no processo. Essa concentração não é apenas regulada pelo recrutamento, mas também pela sua morte e eliminação. O tratamento com tanshionona IIA, derivado de uma erva medicinal chinesa reduziu os efeitos da inflamação através da indução da apoptose e por promover a migração reversa de neutrófilos em um modelo de lesão em zebrafish (ROBERTSON et al., 2014).

Um outro mecanismo efetor de neutrófilos relacionado com a piora de algumas doenças inflamatórias, são as NETs. O bloqueio destas se tornou alvo de estudo com o objetivo de melhorar o prognóstico de pacientes. Por exemplo, o bloqueio da NETose através da inibição de PAD4, levou a redução dos danos renais e vasculares em modelo de lúpus (KNIGHT et al., 2015), assim como a gravidade da lesão no modelo de artrite (WILLIS et al., 2011).

Na clínica já são aplicadas terapias que atuam nos neutrófilos e/ou nos seus mecanismos efetores, como por exemplo, o uso de anticorpo monoclonal anti-TNF- α (WITTKOWSKI, et al., 2007) e alguns anti-inflamatórios, que previnem a ativação de neutrófilos nas articulações de pacientes com artrite reumatóide (WITTKOWSKI et al., 2007). Paradoxalmente, enquanto

alguns anti-inflamatórios inibem algumas funções dos neutrófilos, mas por outro lado retardam a apoptose (HEASMAN et al., 2003).

Logo, é possível notar que bloquear qualquer um dos mecanismos de defesa dos neutrófilos, acarretará em um efeito indesejado. Assim, bloquear NETs e *burst*, pode melhorar a sintomatologia local, mas leva a maior susceptibilidade a infecções, pois são mecanismos que protegem de patógenos de difícil fagocitose (BRANZK et al., 2014). A ausência das vias oxidativas está relacionada com o aumento da inflamação, como mostrado na DGC, possivelmente pela tentativa constante de eliminar os focos de infecções persistentes (ROOS, 2016).

Considerando a importância dos neutrófilos para manutenção da homeostase, a depleção total de qualquer função dessa célula acarretará sérias consequências ao organismo. Nesse sentido, é importante regular a resposta dessa célula de forma a controlar uma possível hiperativação, observada em algumas condições patológicas, mantendo a célula responsiva. Assim, o uso de produtos naturais é uma possibilidade interessante, principalmente os de origem vegetal, que possuem metabólitos secundários relacionadas a diversas propriedades biológicas.

2.8 *Dysphania ambrosioides* e seu potencial sobre o sistema imune

Das diversas espécies com ação no sistema imune, destaca-se *Dysphania ambrosioides*. Uma angiosperma da Ordem *Caryophyllales*, Família *Amaranthaceae*, Gênero *Dysphania*, e com nomenclatura binomial *Dysphania ambrosioides* (Mosyakin & Clemants), com sinonímia de *Chenopodium ambrosioides*. É uma planta anual ou perene com aroma forte e pode crescer até 1 m de altura. É nativa da América Central e do Sul, com fácil adaptação a diversas condições. No Brasil é conhecida como “Erva-de-Santa Maria”, “mastrução” ou “mastruz” (LORENZI; MATOS, 2002). E segundo a Flora do Brasil, está distribuída em todo o território brasileiro (SENA et al., 2010) (Figura 7).

É uma espécie muito utilizada na medicina popular como cicatrizante, anti-inflamatório e também em quadros de torções e fraturas (LORENZI; MATOS, 2002; KUMAR et al., 2007). Seu uso extenso na terapia culminou na sua inserção na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse do Sistema Único de Saúde-RENISUS, apresentando potencial para avançar nas etapas de desenvolvimento de produtos que possam ser usados no SUS (BRASIL, 2009), assim

como encorajar pesquisadores brasileiros a validar as propriedades farmacológicas dessa planta, incluindo sua eficácia e segurança (BRASIL, 2008).

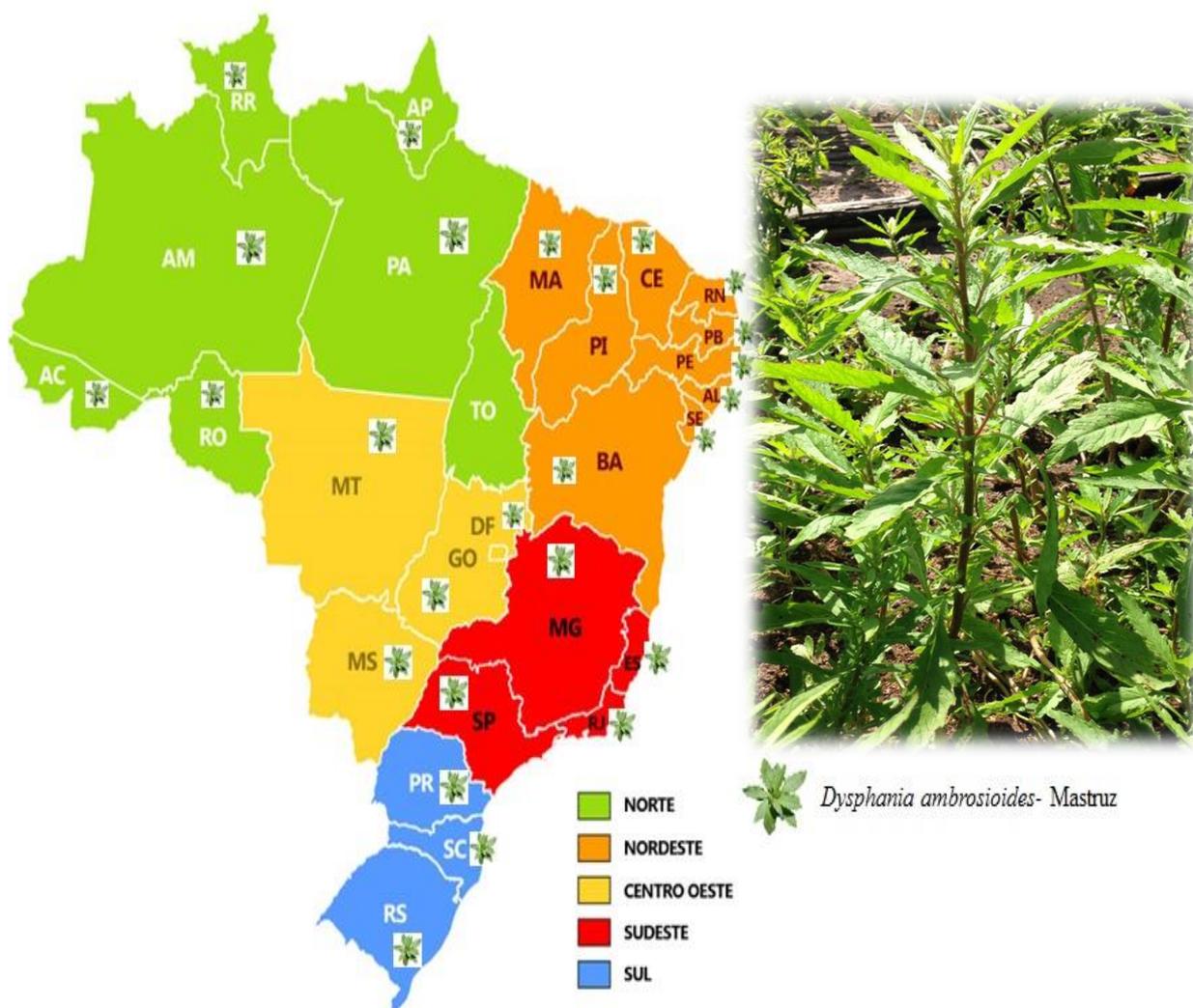


Figura 7 Mapa de distribuição de *Dysphania mabrosioides* pelo Brasil e exemplar da espécie.

No Brasil, segundo dados etnofarmacológicos, a planta é usada na forma de chás, batida com leite ou infusões das folhas no tratamento de gripes, também como emplastros para tratamento de fraturas (DE MORAES et al., 2005). Ainda, os dados experimentais descrevem para essa espécie ação anti-helmíntica (QUINLAN et al., 2002), antioxidante (KUMAR et al., 2007), analgésica (IBIRONKE; AJIBOYE, 2007) e anti-inflamatória. Neste último, Trivellato Grassi, et al. (2013) confirmaram esse efeito em modelos de inflamação, cicatrização e analgesia em que o extrato apresentou efeito positivo sobre estes três parâmetros analisados, onde foi possível identificar a inibição de mediadores como óxido nítrico (NO), prostaglandina E₂ (PGE₂), TNF- α , e enzimas como MPO (envolvida nos processos inflamatórios e dolorosos).

Além disso, acelerou o processo de cicatrização. Na inflamação aguda induzida pela aplicação de carragenina, o tratamento com *D. ambrosioides* reduziu a formação de edema. Nesse mesmo trabalho, em modelo de inflamação crônica, o tratamento reduziu a formação do granuloma (IBIRONKE; AJIBOYE, 2007), ratificando o efeito tanto para inflamações crônicas como agudas.

O Laboratório de Imunofisiologia da Universidade Federal do Maranhão - UFMA, vem estudando essa espécie em vários modelos. Onde o extrato hidroalcoólico de *Dysphania ambrosioides* apresentou potencial para estimular o recrutamento de macrófagos e ativar estas células, aumentando a atividade fagocítica e produção de NO (CRUZ et al., 2007). Na infecção por *Leishmania amazonensis* o tratamento intralesional com mastruz apresentou atividade sobre o sistema imune para inibir a disseminação de *L. amazonensis*, bem como efeito direto no parasito (PATRICIO et al., 2008). Já em modelos de inflamação e cicatrização, como na cicatrização óssea, em modelo animal usando coelhos, o tratamento com extrato de mastruz na forma de emplastro mostrou efeito indutor da osteogênese e cicatrização óssea precoce, podendo servir como estimulador da regeneração óssea (PINHEIRO NETO et al., 2005). O uso do extrato de mastruz como enxerto ósseo também mostrou um efeito promissor, reduzindo o tempo para formação do calo ósseo, acelerando a regeneração. Além disso, o teste de resistência à tração sugere que essa formação precoce é madura e resistente (NETO et al., 2017).

Já na osteoartrite o extrato das folhas de *D. ambrosioides* reduziu a área do joelho, possivelmente pela redução do infiltrado celular, além disso, apresentou um efeito analgésico importante (CALADO et al., 2015). Mastruz também foi eficaz em inibir o desenvolvimento da artrite e na redução de citocinas inflamatórias como TNF- α , IL-6, IFN- γ (PEREIRA et al., 2018). O efeito anti-inflamatório foi retificado em modelo de cistite hemorrágica, reduzindo o infiltrado celular e edema na bexiga, o que foi comprovado pelo histológico deste órgão. Além desses parâmetros, foi observado a inibição de algumas vias de sinalização, como NF- κ B e COX-2 (GONÇALVES FILHO, 2013), que já são alvos de terapias usando fármacos anti-inflamatórios. O efeito anti-inflamatório sistêmico foi demonstrado por Rios et al., (2017), em que o tratamento com extrato de *D. ambrosioides* reduziu os efeitos da inflamação na sepse pela redução da produção de citocinas inflamatórias como IL-6, TNF- α . MCP-1.

Alguns produtos vegetais podem apresentar toxicidade sistêmica após tratamento crônico, o uso do extrato hidroalcoólico de mastruz por 15 dias, não foi letal e não induziu alterações nos camundongos, sugerindo que é seguro o uso terapêutico dessa espécie na dose adequada (PEREIRA et al., 2010). A capacidade terapêutica demonstrada para *D. ambrosioides*, assim como de outras espécies vegetais, provavelmente está relacionada com seus metabólitos secundários. A espécie apresenta na sua composição química terpenos (KIUCHI et al., 2002), compostos fenólicos, saponinas, taninos, flavonoides, entre outros (NEIVA et al., 2011). Dos compostos hidrofílicos, mais de trinta e cinco compostos fenólicos já foram identificados, como derivados de ácido fenólico e ácido p-cumárico. A quercetina é a substância predominante entre os compostos lipofílicos. Os ácidos graxos poli-insaturados se sobrepõem sobre os ácidos graxos saturados; quanto aos tocoferóis, há uma predominância do alfa-tocoferol (BARROS et al., 2013).

Considerando a importância dos neutrófilos na defesa do organismo e também no desenvolvimento e piora de algumas doenças inflamatórias, somado ao potencial de *D. ambrosioides* na regulação da resposta imune e ausência de informações sobre o efeito do mastruz na atividade da célula em questão, buscou-se neste trabalho avaliar o efeito de *Dysphania ambrosioides* (EHDA) sobre um dos principais componentes celulares da resposta inflamatória, os neutrófilos.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral:

Avaliar o efeito *in vitro* do extrato bruto hidroalcoólico das folhas de *Dysphania ambrosioides* (EHDa) em neutrófilos humanos.

3.2 Objetivos Específicos:

- Avaliar a ação do EHDa sobre os mecanismos efetores oxidativo ou não de neutrófilos;
- Avaliar o potencial do EHDa em regular a capacidade inflamatória de neutrófilos;
- Sugerir possíveis mecanismos moleculares de neutrófilos em resposta ao tratamento com EHDa.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Extrato hidroalcoólico de *Dysphania ambrosioides* (EHDA)

4.1.1 Coleta do material vegetal

A coleta das folhas de *D. ambrosioides* foi efetuada na cidade de Raposa-MA, bairro do Alto do Farol (2° 27' 34,6'' S / 44° 08' 47,5'' W), adquiridas de produtores locais. A identificação botânica foi realizada no herbário do Maranhão-MAR, da Universidade Federal do Maranhão, com o voucher de N° 9349 (Anexo A). A coleta do material vegetal ocorreu no mês de abril de 2017, por volta das 8 horas, de modo a conservar, qualitativa e quantitativamente os metabólitos secundários da planta.

4.1.2 Preparo do extrato

Para o preparo do extrato, seguiu-se o protocolo adaptado de Neiva et al. (2011), em que as folhas foram mantidas em estufa a 37°C para secagem, seguido de trituração em moinho de facas para obtenção do pó, com um resultado de 250g da matéria prima. O pó foi então intumescido por 2 horas em 1L de solução hidroalcoólica a 70% de etanol. Em seguida, foi submetido a um processo de extração exaustiva por 17 dias, usando a mesma solução do intumescimento. Esta extração exaustiva consiste em percolar a amostra até o momento que a solução apresenta coloração mais clara e estável. Ao final do processo, o extrato foi concentrado em rotaevaporador para retirada do solvente volátil e, em seguida, foi seco. Obteve-se 5,7 % de rendimento em relação às folhas secas trituradas.

4.1.3 Preparo para avaliação de contaminação

Uma amostra do extrato foi usada para avaliação de possíveis contaminações microbianas. O ensaio microbiológico foi realizado segundo metodologia proposta pela Farmacopéia (2010), com algumas adaptações. Para a diluição, uma amostra de 10 mg/mL do extrato foi preparada em Solução Tamponada com Fosfato (PBS; pH 6,8) estéril. Após homogeneização manual, foram realizadas diluições seriadas (1:10, 1:100 e 1:000). Alíquotas de 100 µL de cada diluição de extrato foram semeadas em placas de Petri com meio Ágar Sabourad (MERK) e Ágar BHI (*Brain Heart Infusion*, MERK). As placas permaneceram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por cinco dias. Durante o período de incubação, as

semeaduras foram observadas diariamente para análise da presença de colônias de fungos ou bactérias, nos respectivos meios de cultura (APÊNDICE A).

4.2 Caracterização química do EHDa

Para a análise da composição química do EHDa, uma amostra foi encaminhada para Laboratório de Produtos Naturais/ Campus do Litoral Paulista – Unesp - São Vicente por intermédio da professora Claudia Rocha. A amostra passou por FIA-ESI-IT-MSn (Espectrometria de Massas por infusão direta com fonte eletronspray e analisador ion trap), na qual foram dissolvidos 10 mg do extrato hidroalcoólico bruto em 1 mL de MeOH:H₂O (1:1, v/v) depois de se utilizar um banho de ultrassom durante 5 minutos. As amostras foram então filtradas através de um filtro PTFE de 0,22 µm, e alíquotas de 20 µL foram injetadas diretamente no sistema FIA-ESI-IT-MSn.

A infusão do fluxo direto das amostras foi realizada em um analisador do tipo *ion trap* linear Thermo Scientific LTQ XL equipado com uma fonte de ionização por eletronspray (ESI), em modo negativo (Thermo, San Jose, CA, EUA). Utilizou-se um tubo capilar de aço inoxidável a 280 °C, uma voltagem do spray de 5,00 kV, tensão capilar de -90 V, lentes de tubo de -100 V e um fluxo de 5 µL/min. A análise completa da varredura foi registrada na faixa de m/z de 100-1000. As fragmentações em estádios múltiplos (ESI-MSn) foram realizadas utilizando o método de dissociação induzida por colisão (CID) contra hélio para ativação de íons.

O primeiro evento de varredura foi um espectro de massa completo para adquirir dados sobre íons nessa faixa de m/z. O segundo evento de varredura foi uma experiência MS/MS realizada utilizando dados dependentes nas moléculas [M-H] dos compostos de interesse com energia de colisão de 30% e tempo de ativação de 30 ms. Os íons produzidos foram então submetidos a uma maior fragmentação nas mesmas condições, até não serem observados mais fragmentos. A identificação dos diferentes compostos no perfil cromatográfico do extrato hidroalcoólico foi feita comparando seus tempos de retenção e espectros UV com dados da literatura (SALDANHA et al., 2013).

4.3 Análise *in silico* da ligação de flavonoides à proteína kinase C

Para esta análise os flavonoides quercetina e kaempferol, os compostos majoritários na composição do extrato, tiveram suas estruturas desenhadas no programa Mcule. A sequência

estrutural da PKC utilizada para teste de *docking* molecular encontra-se no PDB (*Protein Data Bank*, <http://www.rcsb.org>) do NCBI (*National Center for Biotechnology Information* - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), com código UNIPROT Q05655. Todos os parâmetros para PKC foram calculados com a aplicação dos programas disponíveis no servidor do ExPasy Molecular Biology (<http://www.expasy.org/>). A definição do sítio de ancoragem/ligação flavonoides na PKC foi determinada em três programas distintos: SwissDock (Swiss Institute of Bioinformatics, Molecular Modelling Group); 1-click-docking (Mcule); e CLC Bio Protein Workbench (CLC Bio, Kobe, Japão). Primeiramente, foram determinados os dados estruturais físico-químicos dos resíduos responsáveis pela ancoragem dos flavonoides à proteína. Em seguida, foram observadas quais as características que se mantiveram constantes ou próximas na ligação dos dois flavonoides. A energia relativa de conservação calculada pelo na plataforma CLC Bio e calibrada para selecionar os resíduos que continham energia maior ou igual a 15 kcal, juntamente com um potencial eletrostático de superfície maior ou igual a 19 kcal. Estes parâmetros foram aplicados para selecionar os resíduos que estivessem a uma distância física de não mais que 5 Å (angstroms) entre os resíduos das proteínas selecionadas e os flavonoides, determinando os resíduos que interagem com o ligante. Os 3 softwares de docagem molecular geraram arquivos para estrutura tridimensional ilustrativa da ligação, entre as quais foi escolhida a estrutura de maior *score* dentro dos parâmetros definidos. A imagem foi capturada em pipeline entre os programas PyMol (Schrödinger, www.pymol.org) e Mcule.

4.4 Obtenção dos leucócitos do sangue periférico

Os neutrófilos foram obtidos de um volume de 40 mL de sangue periférico doado por 10 voluntários sadios – sem doenças infectocontagiosas ou congênitas comprovadas até o momento da coleta e que não estavam fazendo uso de medicamentos que pudessem interferir nos experimentos – após assinatura do termo de consentimento livre esclarecido TCLE. O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Maranhão (CEP-UFMA), sob o protocolo de número CAAE 66829617.6.0000.5087 (Anexo B).

Para o isolamento dos neutrófilos, foi adicionada à amostra de sangue uma solução de Dextran 6% (SIGMA-ALDRICH) na proporção de 1:1 e mantida por 30 minutos a 37°C, para separação das hemácias. Em seguida, o sobrenadante foi adicionado cuidadosamente sobre uma solução de Ficoll-Hypaque (HISTOPAQUE 1,077g/mL GE Healthcare). A amostra foi então

centrifugada (900 x g, 20 minutos, 20°C). Ao final da centrifugação a fase com as células mononucleares foi retirada e adicionado PBS (Solução Tamponada com Fosfato – pH 7,2) sem Ca²⁺ e Mg²⁺, para lavagem, centrifugação (600 x g, 10 minutos). O sobrenadante foi descartado e ao *pellet* foi adicionado 1 mL de meio RPMI 1640 (SIGMA-ALDRICH) suplementado com soro fetal bovino (SIGMA) a 10%, 2 mM de L-glutamina (SIGMA-ALDRICH), 1% de estreptomicina (100 µg/mL, MERCK) e penicilina G (100 U/mL, SIGMA-ALDRICH).

As hemácias restantes foram eliminadas através de uma lise hipotônica com água destilada estéril. A seguir, a amostra foi centrifugada, ressuspensa em 1 mL de meio RPMI sem vermelho de fenol ou PBS suplementado com glicose 1%. Ao final do processo de separação as células foram contadas em microscópio óptico de luz comum, em câmara de Neubauer, usando a técnica de exclusão com azul de tripan 0,04% (SIGMA-ALDRICH). As concentrações de células foram ajustadas de acordo com os ensaios realizados e a viabilidade acima de 95% considerada adequadas para os experimentos.

4.5 Tratamento com EHDa

Após o isolamento e ajuste para a concentração desejada, os neutrófilos foram transferidos para placas de cultura de 24 ou 96 poços de fundo chato, pelo menos em triplicata. Para os testes três concentrações foram usadas, 5, 50 e 125 µg/mL. Estas foram previamente definidas pela concordância do uso em trabalhos anteriores do nosso grupo de pesquisa, testes piloto e exclusão de concentrações tóxicas. As células foram mantidas sob esta estimulação por uma ou quatro horas, em ambiente saturado contendo 5% de CO₂, a 37°C. Após este período, as células foram, quando necessário, estimuladas com PMA (Acetato miristato de forbol, 50 nM, SIGMA-ALDRICH).

4.6 Avaliação da citotoxicidade do EHDa

A citotoxicidade do EHDa para neutrófilos e PBMC foi avaliada pelo ensaio colorimétrico com Vermelho Neutro (SIGMA-ALDRICH). Que baseia-se no acúmulo do corante vermelho neutro nos lisossomos das células viáveis e não lesionadas (REPETTO et al., 2008). Para tal, as células (1x10⁶/mL) foram distribuídas em placas de 96 poços de fundo “U” e incubadas com o extrato nas concentrações de 5, 50, e 125 µg/mL, por uma ou quatro horas, a 37 °C, em atmosfera contendo 5% de CO₂. As células em meio de cultura sem extrato

constituem o controle negativo (C-) e com metanol 30% o controle positivo (C+). Passado o tempo de incubação, a placa foi centrifugada e o sobrenadante retirado, para a então adição de 200 µL da solução de vermelho neutro (40µg/mL) e a placa foi novamente incubada a 37°C por 3 horas. Em seguida, a placa foi novamente centrifugada e descartado o sobrenadante para a adição de uma solução de formaldeído a 0,5% V/V em CaCl₂ por 5 minutos, seguido de centrifugação e descarte do sobrenadante. Por último, foram adicionados 100 µL de uma solução de álcool ácido. A absorbância foi lida a 540 nm em espectrofotômetro de microplaca (Molecular Devices, SpectraMax® Plus 384). A fórmula utilizada para calcular a percentagem de viabilidade celular foi:

$$\% \text{ Citotoxicidade} = 100 - \left(\frac{\text{Absorbância do tratamento}}{\text{Absorbância do controle negativo}} \right) \times 100$$

4.7 Avaliação da fagocitose

A fagocitose foi avaliada semi-quantitativamente por citometria de fluxo. Para tal foi utilizada leveduras de *C. albicans* que expressam a proteína fluorescente GFP (*Green fluorescent protein*), sendo estas gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Antonio Condino Neto, coordenador do Laboratório de Imunologia Humana da USP. As células foram tratadas (item 4.5) e incubadas com as leveduras na proporção de duas leveduras para cada célula, por 30 min a 37 °C. Após o período de incubação, a placa foi centrifugada e o precipitado foi lavado com solução de Azul de Tripán 0,04% (SIGMA-ALDRICH) para anular a fluorescência das leveduras não internalizadas. As células foram lavadas e ressuspensas em PBS. Para análise em citômetro de fluxo Attune (TermoFisher Scientific), 5000 eventos foram adquiridos levando-se em consideração os parâmetros de tamanho (*Forward Scatter*, FSC) e complexidade celular (*Side Scatter*, SSC) para estabelecimento da região de aquisição (APÊNDICE B). Posteriormente, os dados foram analisados no software Flow

4.8 Avaliação da degranulação

A degranulação foi avaliada por citometria de fluxo. As células, após serem tratadas (item 4.5) foram incubadas com marcadores de superfície usados para caracterizar os subtipos de grânulos de neutrófilos (NAEGELEN et al., 2015). Então, após o tempo de tratamento com EHDa os neutrófilos foram ressuspensos em 100 µL de PBS e transferidos para uma placa de

fundo “U”, e incubados com os anticorpos específicos para os grânulos primários Anti-CD63-PerCP (BD Biosciences), Anti-CD66b-PerCP (BD Biosciences) e Anti-CD15-FITC (BD Biosciences) para grânulos secundários, e ainda, Anti-CD14-FITC (BD Biosciences) para vesícula secretora (BD Biosciences). A placa foi mantida à 4 °C por 15 minutos, em ambiente protegido da luz. As amostras foram avaliadas em citômetro de fluxo FACSCalibur (BD Biosciences). Para análise, 5000 eventos foram adquiridos levando em consideração os parâmetros de tamanho (*Forward Scatter*, FSC) e complexidade celular (*Side Scatter*, SSC) para estabelecimento da região de aquisição. Após esta determinação do *gate* principal, as células foram avaliadas segundo os canais de fluorescência utilizados, e os dados analisados com o programa FlowJo v 10.0 gerando os dados de percentual de células expressando os marcadores e média da intensidade de fluorescência (MFI). Para o controle do ensaio neutrófilos estimulados com PMA foram avaliados para o marcador CD63 (APÊNDICE C).

4.9 Avaliação do *burst* oxidativo

A produção de Espécies Reativas de Oxigênio foi quantificada através de ensaio de quimioluminescência, que se baseia na reação desses compostos com os substratos luminol e lucigenina, sendo estes últimos quimioluminescentes quando oxidados. A oxidação do luminol ocorre por reação com todas as EROs formadas no *burst* oxidativo. Já a lucigenina tem sido usada para identificação específica do ânion superóxido (FREITAS et al., 2014).

As células na concentração de 1×10^6 /mL foram distribuídas em placa de 96 poços (estéril, branca, de fundo chato) em um volume final de 200 μ L de RPMI. O extrato foi adicionado às células, em seguida foram acrescentados luminol (100 μ M) ou lucigenina (100 μ M) para leitura em luminômetro por 1 e 4 horas, sendo 0,4 segundos por poço. Para avaliar o efeito do extrato no *priming* dos neutrófilos, estes foram primeiramente mantidos em contato com o EHDA por 20 minutos, sendo incubados com PMA (50nM), e os substratos luminol (100 μ M) ou lucigenina (100 μ M), seguida da leitura em luminômetro por 1 e 4 horas. As análises foram feitas usando o programa MicroWin. (HATANAKA et al., 2006).

4.10 Quantificação das *Neutrophil extracellular traps* (NETs)

4.10.1 Avaliação das NETs por microscopia

Para ativação celular e geração das NETs, os neutrófilos ($8 \times 10^5/\text{mL}$) foram incubados por uma hora para as células decantarem sobre lamínulas de vidro (13 mm), que encontravam-se em placas de 24 poços em meio RPMI sem vermelho de fenol. Após a sedimentação dos neutrófilos, os mesmos foram tratados por uma ou quatro horas com o extrato (item 4.5) seguido ou não de ativação com PMA (50 nM) por três horas adicionais. Então, as amostras foram fixadas com paraformaldeído (4%) para posterior marcação. Para a marcação e identificação das NETs, as lamínulas foram cuidadosamente lavadas com PBS (3 vezes por cinco minutos). Em seguida, as células foram permeabilizadas com Triton X-100 (0,5%, por um minuto) e novamente lavadas com PBS. Posteriormente, as lamínulas foram incubadas com tampão de bloqueio (1% BSA, 0,005 % Tween 20, 5% SFB e PBS), por 30 minutos, a 37°C em estufa de CO₂. Seguindo, as amostras foram marcadas com anticorpos primários anti-elastase de neutrófilos (α -NE) (Invitrogen™) e anti-histonas (α -HE) (Invitrogen™), procedendo-se nova lavagem após a incubação por uma hora. As amostras foram, então, marcadas com anticorpos secundários com os fluorocromos Alexa Flúor 488 e Alexa Fluor 546 (Invitrogen™), respectivamente para α -NE e α -HE, a 37 °C, por uma hora. Após esta incubação, as lamínulas foram lavadas com PBS e marcadas com Hoechst 33342 (Invitrogen™) para identificação do DNA. Após as marcações, foi feita a montagem das lamínulas sobre lâminas com Mowiol® (SIGMA-ALDRICH), que seguiram para secagem, *overnight* protegidas da luz. A análise das NETs ou do processo de NETose foi realizada em microscópio invertido de fluorescência (Eclipse Ti-S NIKON), em aumento de 200X. (BRINKMANN, ZYCHLINSKY, 2012).

4.10.2 Quantificação das NETs por fluorimetria

Os neutrófilos ($1 \times 10^6/\text{mL}$) foram dispostos em placa de 96 poços (preta, estéril, e fundo chato e transparente) e tratados com o EHDa por uma ou quatro horas, sendo em seguida ativados ou não com PMA (50 nM). Após o tratamento e ativação, as amostras foram lavadas (600 x g, por 10 minutos) e marcadas com SYTOX Orange® (5 μ M) (TermoFisher Scientific) e incubadas a temperatura ambiente por 10 minutos. A fluorescência foi determinada em leitor de fluorescência (SpectraMax®) em comprimentos de onda de excitação e captação de 547/570

(LIPPOLIS et al., 2006). A avaliação deu-se pelo cálculo da liberação relativa de NETs, subtraindo a média do grupo não estimulado dos grupos que receberam tratamento.

4.11 Análise estatística

O teste Shapiro-Wilk foi utilizado para determinação da distribuição dos dados. Para os dados com distribuição normal foi usado o teste paramétrico One-way-ANOVA, com pós-teste de Turkey. Caso não apresentassem distribuição normal, foi aplicado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, com pós-teste de Dunn's. Ainda, para alguns ensaios, foi realizado o Teste *t* de Student para amostras com distribuição normal ou Mann-Whitney para amostras sem distribuição normal, comparando os grupos em pares. Foi estabelecido nível de significância de 5%. Os dados encontram-se expressos em média \pm desvio ou erro padrão. As análises foram realizadas no programa Prism versão 5.0 (GraphPad).

5. RESULTADOS

5.1 Caracterização química do Extrato hidroalcoólico de *Dysphania ambrosioides* - EHDa

A caracterização química revelou a presença de dezesseis compostos, tendo como majoritários aqueles derivados da Quercetina e Kaempferol (Tabela 1).

Tabela 1: Composição química do extrato hidroalcoólico de *Dysphania ambrosioides*.

	(M-H) ⁻	MS ⁿ	Compostos
1	191	173; 127;85;	Ácido quínico
2	193	135	ácido glucorônico
3	285	257;	Kaempferol
4	295	163	Acido <i>p</i> -coumaroil-xilose
5	301	285; 267; 241; 173	Hesperetina
6	431	285	Kaempferol-3- <i>O</i> -alfa-L-raminosideo
7	463	301	Quercetina-3- <i>O</i> -glicosideo
8	563	431;285; 151	Kaempferol- <i>O</i> -ramosideo-pentosídeo
9	579	447; 285	Qurecetina <i>O</i> -raminosideo-pentosideo
10	579	447; 301	Naringin
11	593	285	Kaempferol-3-Glucoside-3 " - Rhamnoside
12	595	301; 151	Quercetina-3- <i>O</i> -arabinoglucosideo
13	609	463; 301	Quercetina-3- <i>O</i> -rutinosideo
14	623	447; 301	Isoramnetina-3- <i>O</i> -rutinosideo
15	739	593; 285	Kaempferol-3-Glicosideo-2 " - Rhamnosideo-7-Rhamnoside
16	725	285	Kaempferol- <i>O</i> -pentosideo-ramnosideo-hexosideo

Análise realizada por espectrometria de massas. M-H (massa do composto menos um H) e MSⁿ (Íon filho)

5.2 Ensaio *in silico* sugere interação do Kaempferol e Quercetina com a PKC

O Resultado do ensaio *in silico* sugere que a quercetina se liga à um sítio de regulação da PKC (Figura 8A). Para o kaempferol a sugestão é de ligação em uma região estrutural desta proteína (Figura 8B).

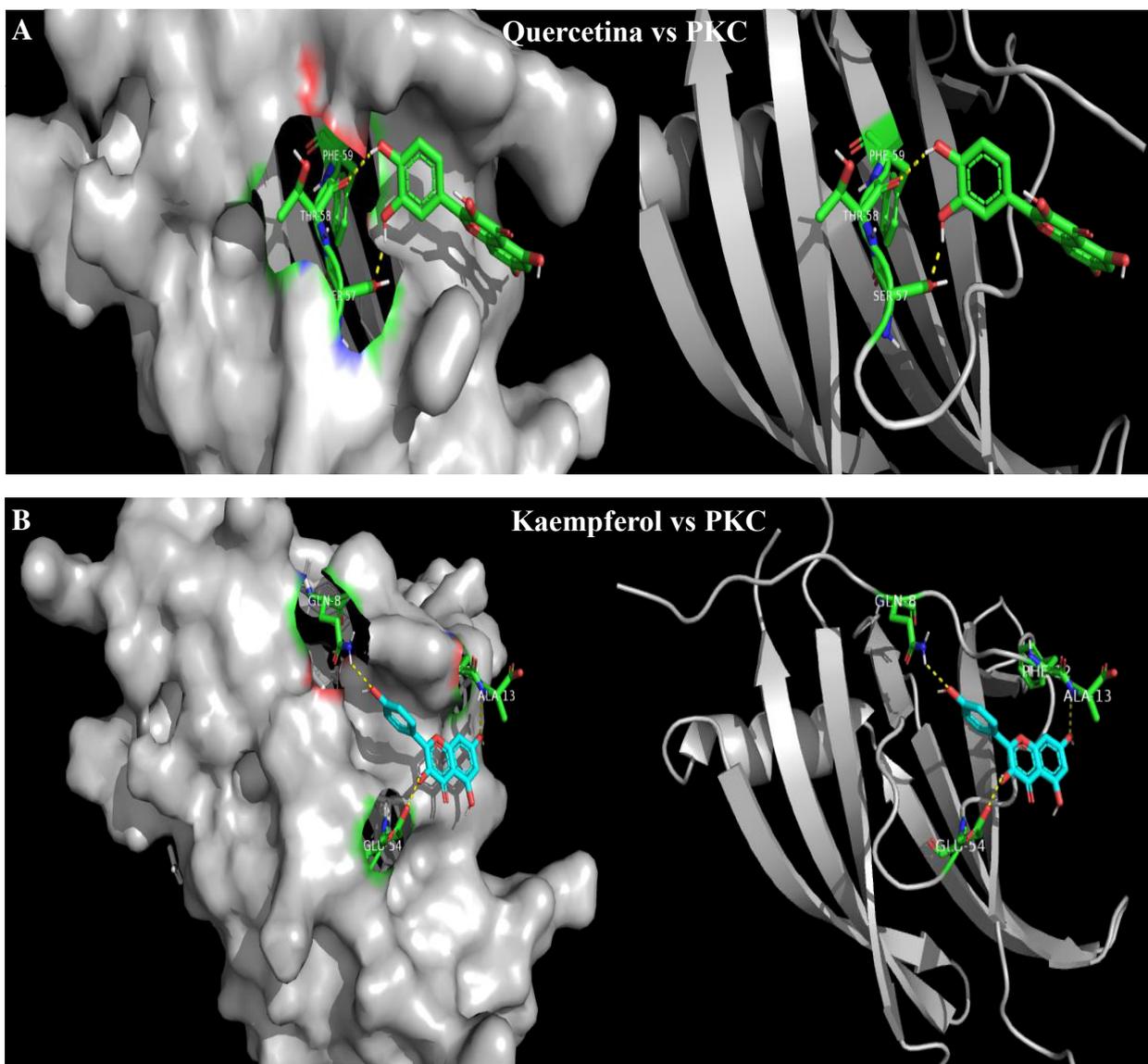


Figura 8 Docagem molecular entre os flavonoides quercetina ou kaempferol e a proteína kinase C delta. Modelagem 3D da PKC e o ponto de ancoragem da quercetina e kaempferol. Após seleção e validação da estrutura 3D da proteína, foram identificados os pontos onde se localiza o sítio de ligação aos flavonoides. Os pontos de ligação mostravam-se acessíveis nos modelos estudados. A quercetina apresentou ligação em sítio da subunidade reguladora da ativação da PKC (posições 1-329). O kaempferol apresentou ligação em posição diferente da subunidade reguladora ou catalítica, mas de importância estrutural.

5.3 EHDa não demonstrou citotoxicidade elevada sobre neutrófilos

Em uma hora (Figura 9A) de tratamento o EHDa apresentou uma toxicidade de 10% na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ e aproximadamente 20% na concentração de 125 $\mu\text{g/mL}$. Em 4 horas (Figura 9B) de tratamento, observamos cerca de 25% de toxicidade na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ e cerca de 40% na concentração de 125 $\mu\text{g/mL}$. Já a concentração de 5 $\mu\text{g/mL}$ não apresentou citotoxicidade nos dois tempos de estudo.

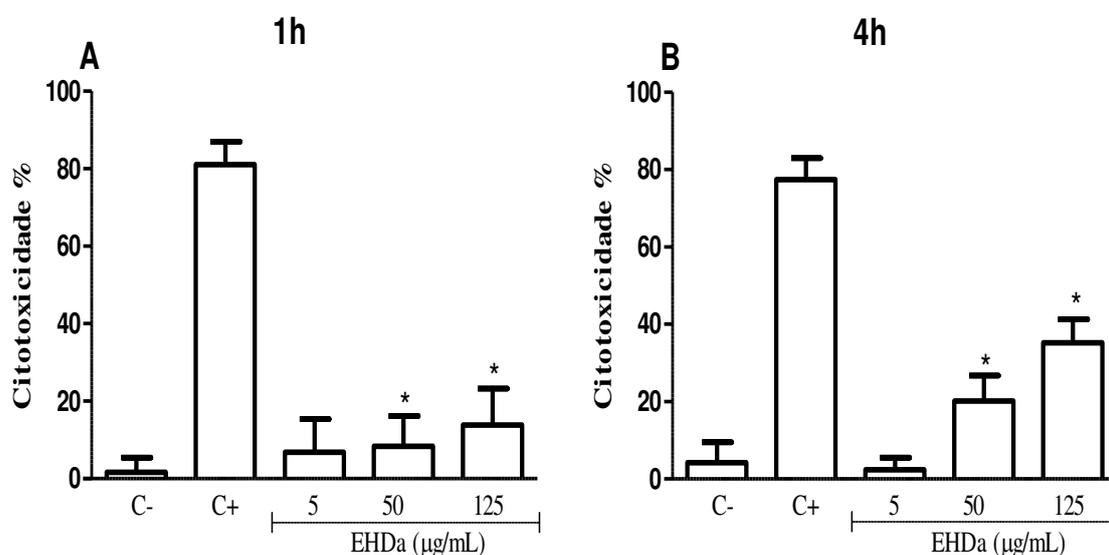


Figura 9 Citotoxicidade do extrato hidroalcoólico de *Dysphania ambrosioides* em neutrófilos humanos. As células (1×10^6 /mL) foram tratadas com EHDa (5, 50 e 125 $\mu\text{g/mL}$) por uma (A) ou quatro (B) horas, e incubadas em estufa de CO_2 (5%) à 37°C . A avaliação da citotoxicidade foi realizada por incubação com vermelho neutro (40 $\mu\text{g/mL}$), por 3 horas, a 37°C , seguida de fixação (formaldeído 0,5% em CaCl_2 , 1%), e revelação em solução de álcool ácido e leitura da absorbância a 540 nm. Os dados estão expressos em média \pm desvio padrão do percentual de citotoxicidade para três indivíduos, em quadruplicata; * $p < 0,05$, para o teste *Mann-Whitney*, comparado ao controle negativo.

5.4 O tratamento com EHDA não interfere na fagocitose de fungos por neutrófilos humanos.

É possível observar que o tratamento com o extrato não interferiu na capacidade dos neutrófilos em fagocitar leveduras de *C. albicans*, independente da concentração e tempo de tratamento. Em uma hora não houve diferença no percentual de células que fagocitaram (Figura 10A), nem no MFI (Figura 10B). O mesmo foi observado no tempo de quatro horas, para o percentual (Figura 10C), e para o MFI (Figura 10D).

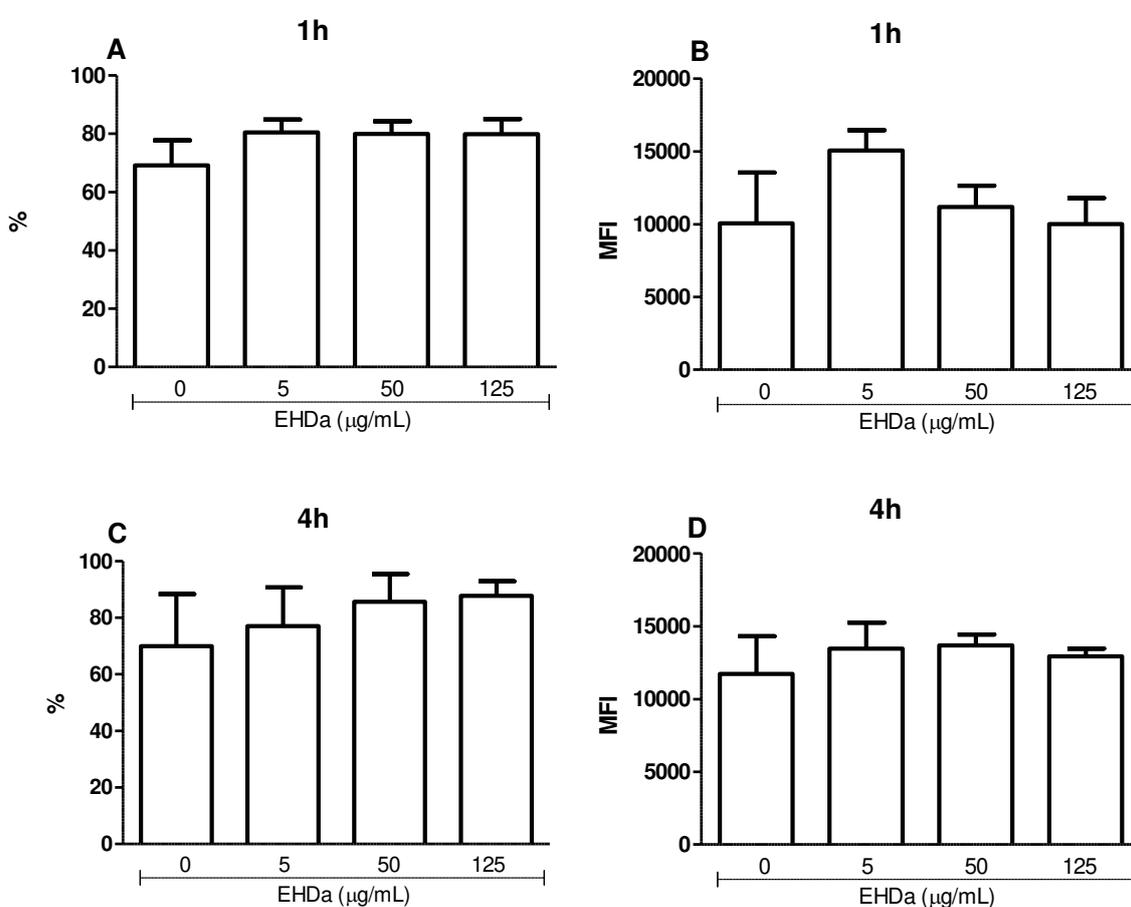


Figura 10 Fagocitose de *Candida albicans* por neutrófilos tratados com EHDA. As células (1×10^6 /mL) foram tratadas com EHDA (5, 50 e 125 µg/mL) por uma (A, B) ou duas (C, D) horas, em seguida foram incubadas com leveduras de *C. albicans* (1:2), que expressam GFP (*green fluorescent protein*) por 30 min. Em seguida, foi feita leitura em citômetro de fluxo e análise no software FlowJo v 10.0. Os dados estão expressos em média \pm desvio padrão do percentual de células que fagocitaram e pelo MFI para seis indivíduos em duplicata.

5.5 O EHDA estimula a exocitose dos grânulos citosólicos de neutrófilos humanos

Os resultados mostraram que o tratamento com EHDA induz a liberação de grânulos primários de neutrófilos em uma hora de tratamento de maneira dependente da concentração, sendo significativa para de 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figura 11A). No tempo de duas horas (Figura 11B), a concentração de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ também apresentou esse efeito de forma significativa.

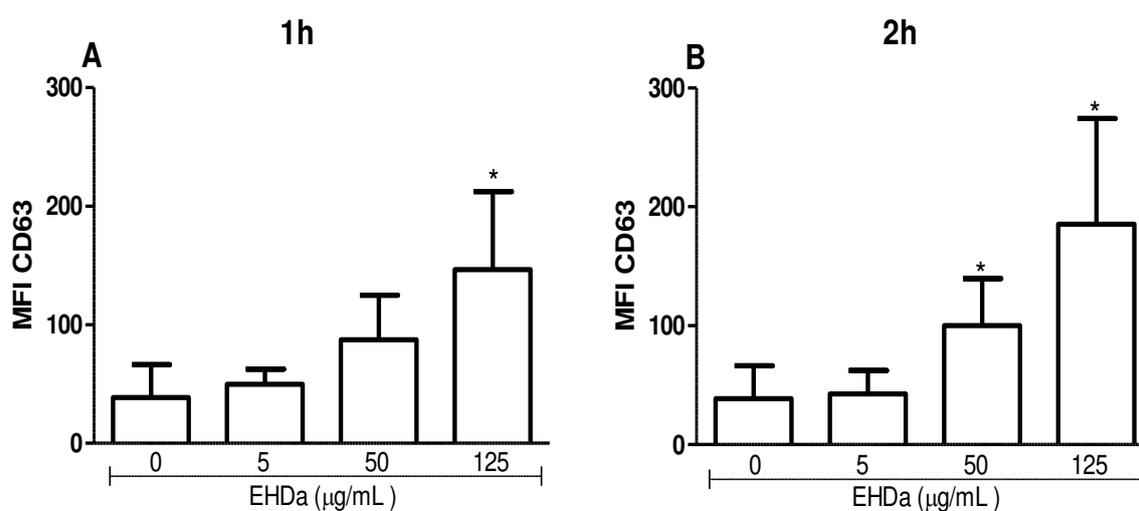


Figura 11 Liberação dos grânulos primários de neutrófilos após tratamento com EHDA. As células (1×10^6 /mL) foram tratadas com EHDA (5, 50 e 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por uma (A) ou duas (B) horas e, em seguida, marcadas com anticorpos Anti-CD63 (grânulos primários). A aquisição dos dados foi realizada em citômetro de fluxo. Os dados foram analisados no software FlowJo v10.0 e estão expressos em média \pm desvio padrão; * $p < 0,05$, de quatro indivíduos em duplicatas, para o teste ou *Mann-Whitney*, comparado ao controle não tratado.

Para os grânulos secundários, o EHDa aumentou a expressão de CD66b em todas as concentrações testadas (5, 50 e 125 $\mu\text{g/mL}$), em uma (Figuras 12C) e duas horas (Figura 11B). As duas maiores concentrações, 50 e 125 $\mu\text{g/mL}$, também induziram o aumento de CD15, em uma (Figura 12C) e duas (Figura 12B).

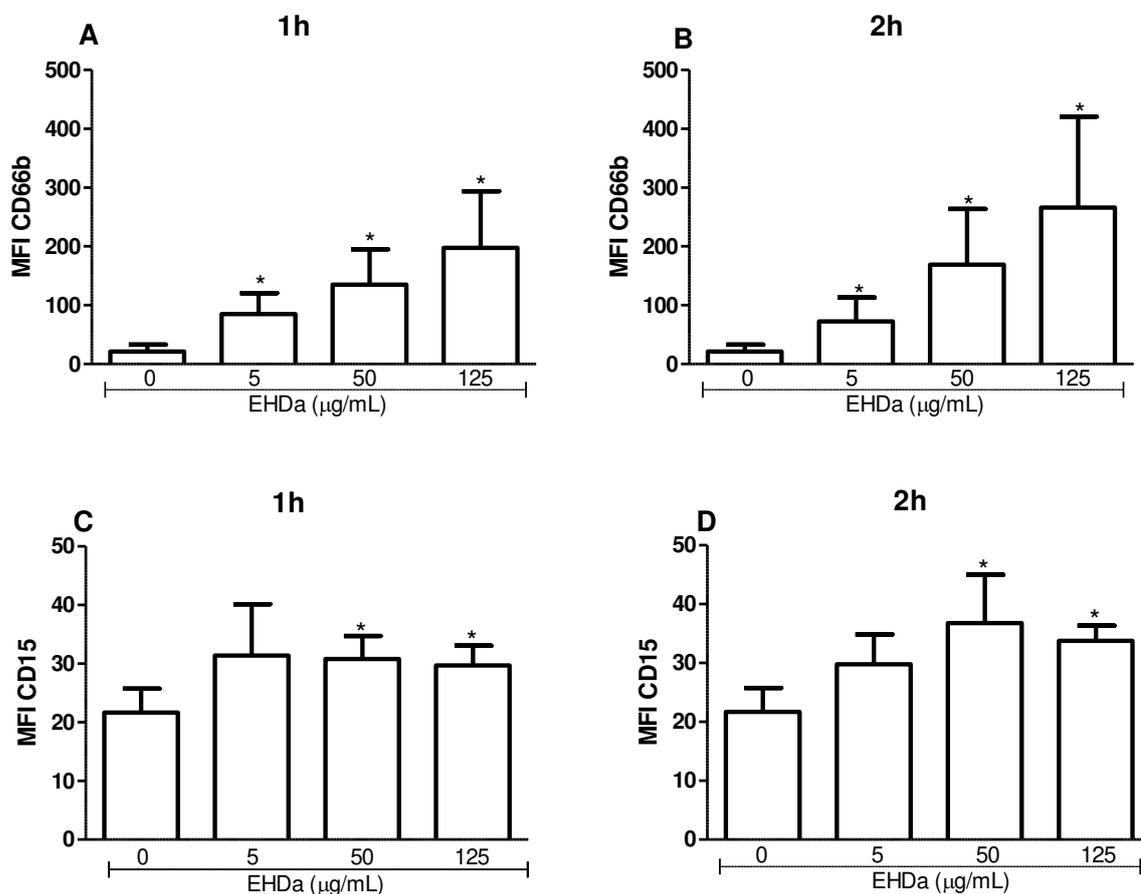


Figura 12 Liberação dos grânulos secundários de neutrófilos após tratamento com EHDa. As células (1×10^6 /mL) foram tratadas com EHDa (5, 50 e 125 $\mu\text{g/mL}$) por uma (A, C) ou duas (B, D) horas e, em seguida, marcadas com anticorpos anti-CD66b e anti-CD15 (grânulos secundários). A aquisição dos dados foi realizada em citômetro de fluxo. Os dados foram analisados no software FlowJo v10.0 e estão expressos em média \pm desvio padrão; * $p < 0,05$, de quatro indivíduos em duplicatas, para o teste *Mann-Whitney*, comparado ao controle não tratado.

As vesículas secretoras foram avaliadas através do marcador CD14. Os tratamentos, por uma (Figura 13A) e duas horas (Figura 13B), levaram ao aumento da expressão do CD14 em todas as concentrações avaliadas.

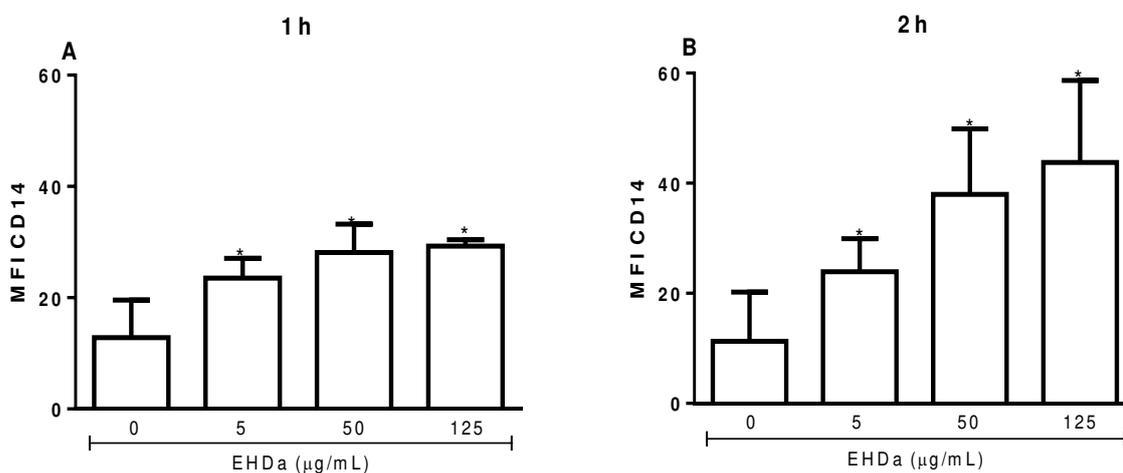


Figura 13 Liberação das vesículas secretoras de neutrófilos após tratamento com EHDa. As células (1×10^6 /mL) foram tratadas com EHDa (5, 50 e 125 µg/mL) por uma (Figura A) ou duas (Figura B) horas e, em seguida, foram marcadas com anticorpo anti-CD14 (grânulos terciários). A aquisição dos dados foi realizada em citômetro de fluxo. Os dados foram analisados no software FlowJo v10.0 e estão expressos em média \pm desvio padrão; * $p < 0,05$, de quatro indivíduos em duplicatas, para o teste *Mann-Whitney*, comparado ao controle não tratado.

5.6 O EHDa modula o *burst* oxidativo em neutrófilos humanos

O EHDa estimulou a produção de espécies reativas de oxigênio. O tratamento com EHDa por uma hora, nas maiores concentrações (50 e 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$), estimulou a liberação do ânion superóxido (Figuras 14A) de forma semelhante ao observado no tempo de quatro horas (Figura 14B). Em uma hora, todas as concentrações do extrato estimularam a produção de EROs totais (Figura 14C). Já em quatro horas, as EROs foram aumentadas pelos tratamentos nas concentrações de 5 e 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figura 14D).

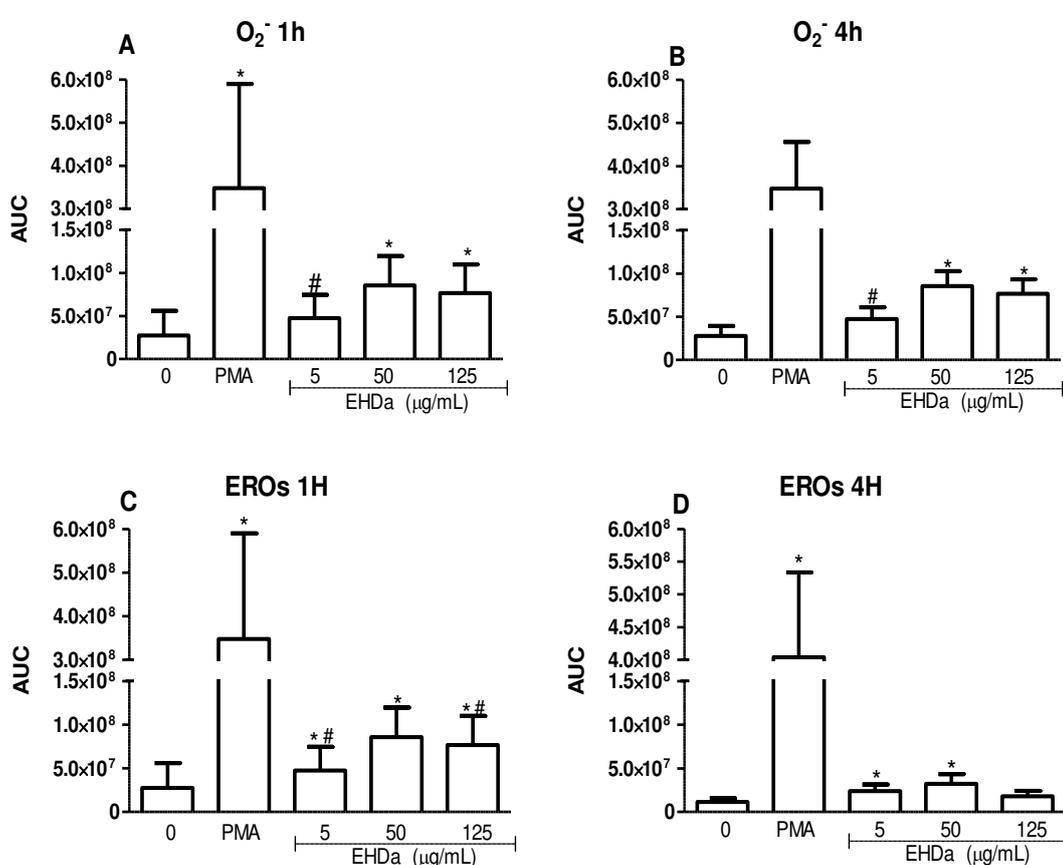


Figura 14 *Burst* oxidativo em neutrófilos humanos tratados com EHDa. Foi adicionado às células (1×10^6 células/mL) o extrato nas concentrações de 5, 50 e 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$. A avaliação foi realizada pela reação com luminol ($100 \mu\text{M}$) ou lucigenina ($100 \mu\text{M}$), seguido da leitura em luminômetro por uma ou quatro horas, para a quantificar a produção do ânion superóxido (A, C) e EROs (B, D). Os dados estão expressos em média \pm erro padrão da média para seis indivíduos, em duplicata, sendo * $p < 0,05$ comparado com o controle não estimulado e # $p < 0,05$ para o teste de Mann-Whitney, comparado com PMA.

Quando os neutrófilos foram tratados com extrato e posteriormente estimulados com PMA, percebeu-se uma redução do potencial indutor do éster de forma dependente da concentração do EHDa. Esse efeito é significativo na concentração de 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para o ânion superóxido (Figura 15A), e o mesmo efeito é observado no tempo de quatro horas (Figura 15B). Já para as EROs em uma hora (Figura 15C), só se observa um efeito redutor a partir da concentração de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, sendo significativo apenas na de 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$, semelhante ao que foi observado no tempo de quatro horas (Figura 15D).

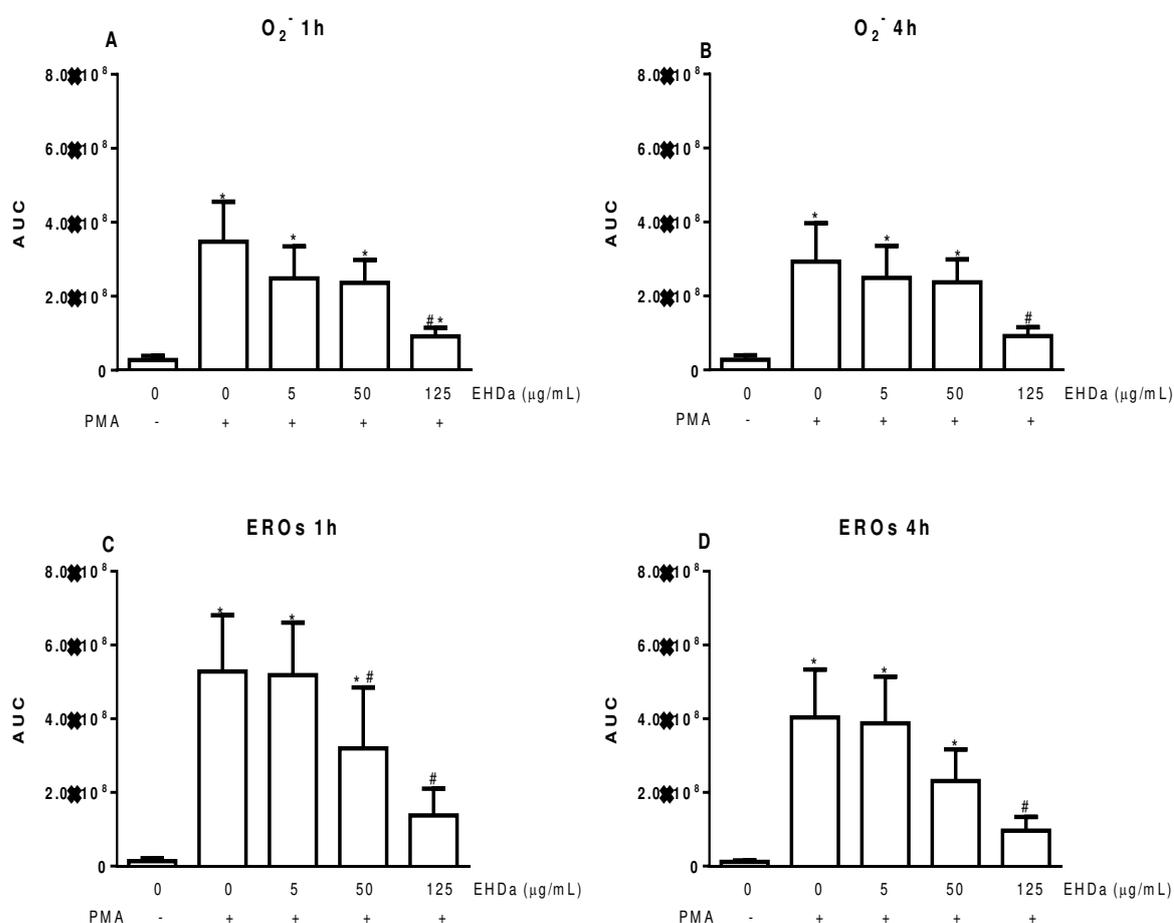


Figura 15 *Burst* oxidativo em neutrófilos humanos tratados com EHDa e estímulos com PMA. As células (1×10^6 células/mL) foram tratadas com o extrato nas concentrações de 5, 50 e 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ por 20 minutos. Em seguida, foram estimuladas com PMA (50 nM) e a avaliação foi realizada pela reação com luminol (100 μM) ou lucigenina (100 μM), seguido da leitura em luminômetro por uma ou quatro horas, para a quantificar a produção de ânion superóxido (A, C) e EROs (B, D). Os dados estão expressos em média \pm erro padrão da média da AUC, para seis indivíduos em duplicata, sendo * $p < 0,05$ comparado com o controle não estimulado e # $p < 0,05$ para o teste de Mann-Whitney, comparado com PMA.

5.7 O EHDa reduz a liberação das redes extracelulares de neutrófilos humanos.

O EHDa em uma hora (Figura 16A e 17) não interferiu de forma expressiva na liberação das NETs. Quando os neutrófilos receberam um segundo estímulo (PMA), é possível observar uma redução na NETose nos grupos tratados com EHDa comparado com o controle estimulado somente com PMA. Nos grupos tratados por quatro horas (Figura 16B e 18) observa-se um padrão semelhante ao de uma hora, onde não houve um efeito significativo. O mesmo efeito de redução da NETose em neutrófilos tratados com o extrato e estimulados com o PMA foi observado no intervalo de quatro horas (Figura 16B e 18).

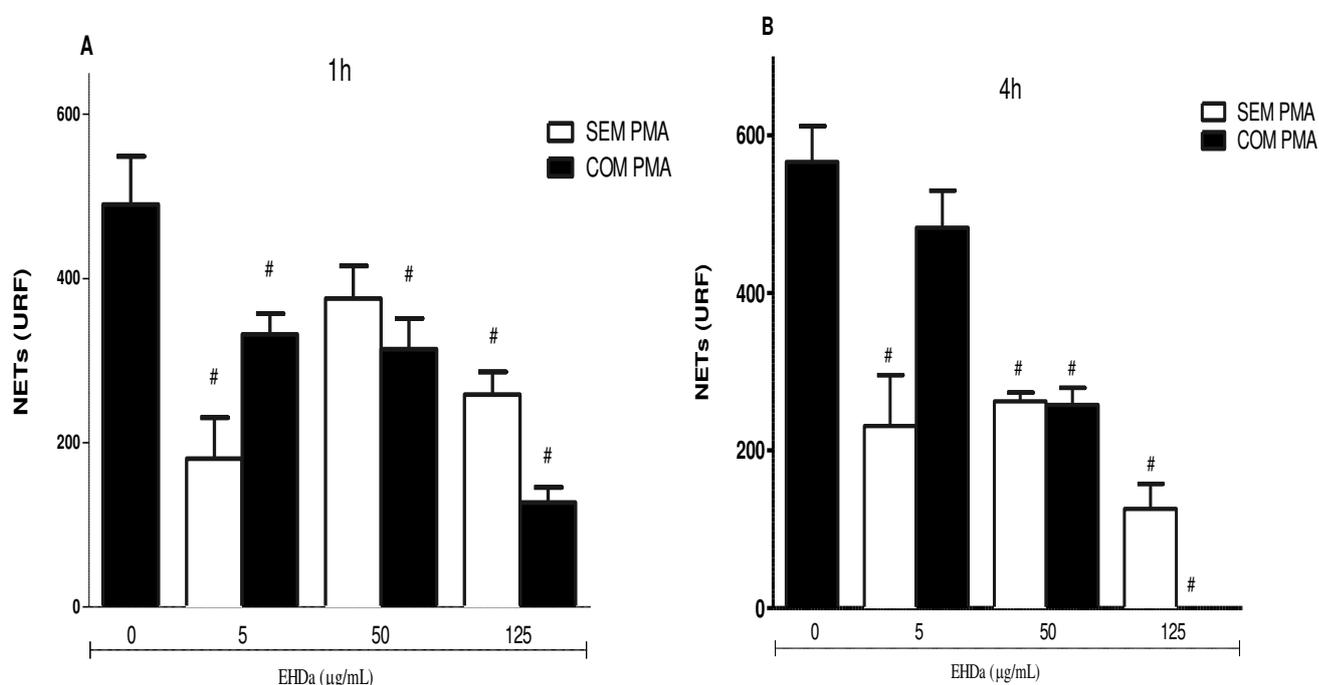


Figura 16 Liberação das Armadilhas Extracelulares de Neutrófilos (NETs) após tratamento com EHDa. Neutrófilos ($1 \times 10^6/\text{mL}$) foram tratados com EHDa (5, 50 e 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por uma (Figura A) ou quatro horas (B), seguido ou não de um estímulo de 3 horas com PMA (50 nM). Após o tempo de estímulo, as células foram incubadas por 10 minutos com Sytox® Orange e para leitura de fluorescência a 547/570. Os dados estão expostos em média \pm erro padrão de URF; para quatro indivíduos # $p < 0,05$, teste one-way ANOVA, comparado com PMA.

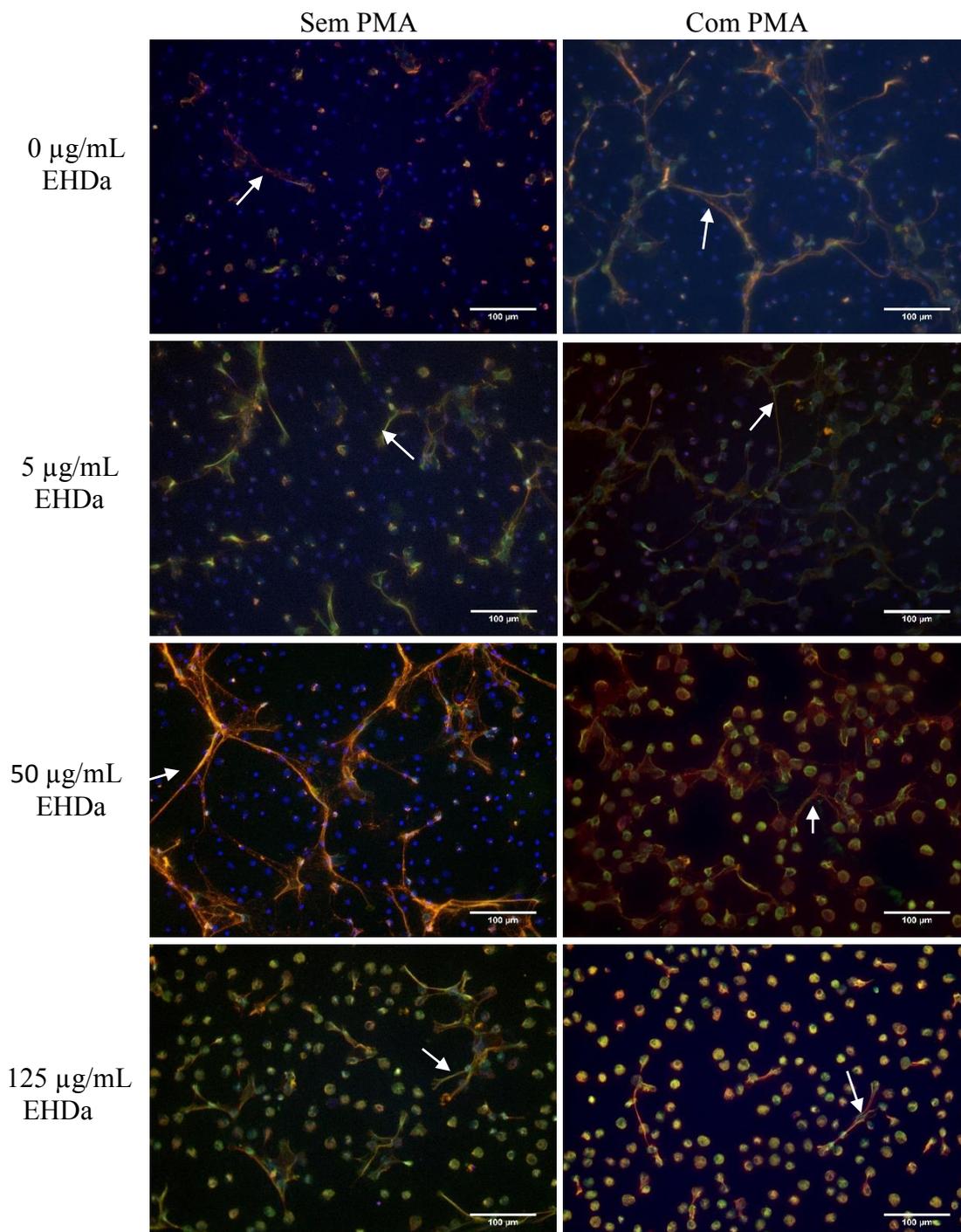


Figura 17 Liberação de NETs de neutrófilos humanos tratados por uma hora com EHDA. Após o tratamento, as células foram ou não estimuladas com PMA (50nM) por três horas. E na sequência permeabilizadas com Triton X-100 (0,5) incubadas com tampão de bloqueio (30 minutos) e marcadas para identificação de elastase (α -NE) e histonas (α -H3), e marcados com Hoechst 33342 para identificação do DNA. Então, foi feita a montagem das lâminas com Mowiol®. A análise das NETs ou do processo de NETose foi realizada em microscópio invertido de fluorescência em um aumento de 200X.

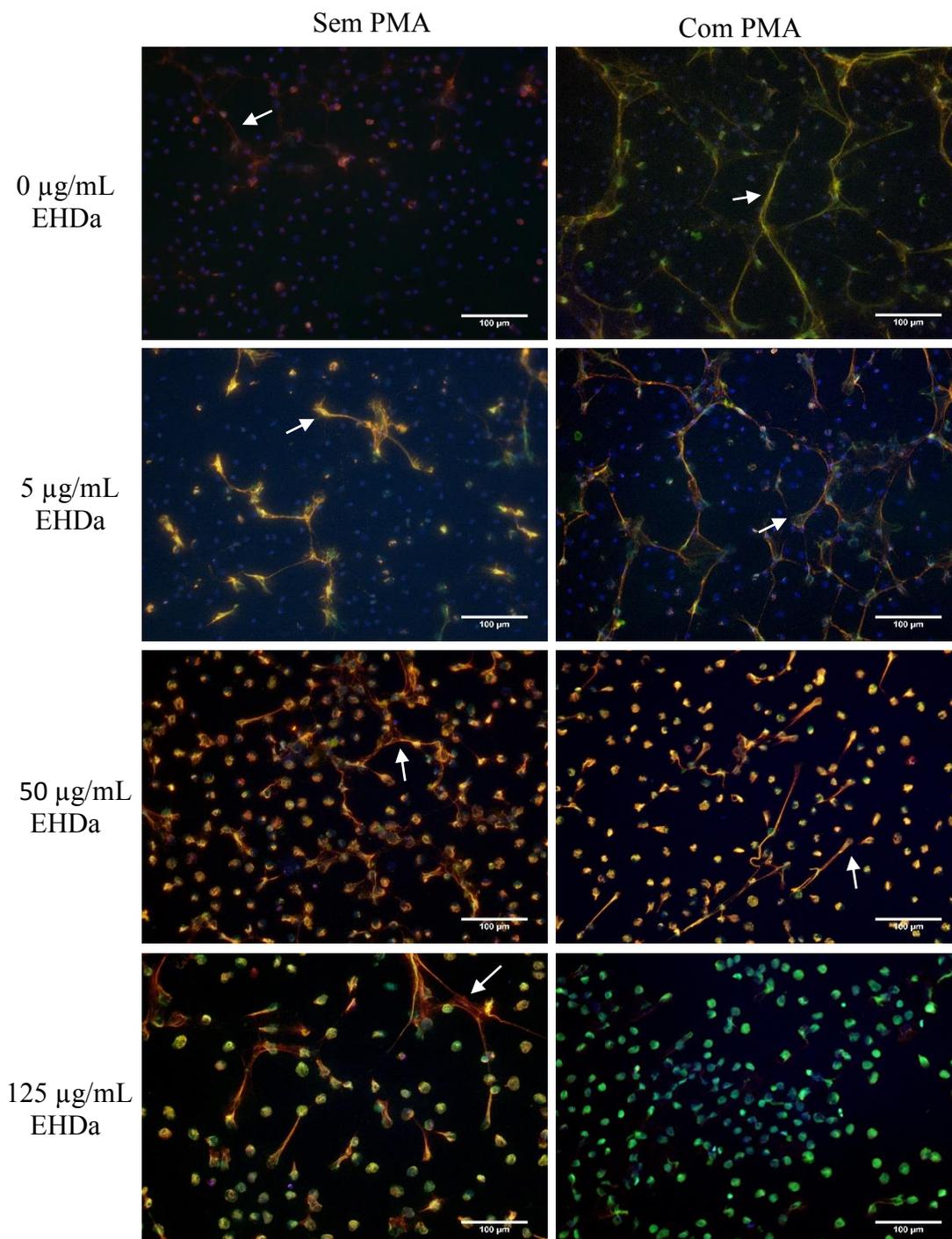


Figura 18 Liberação de NETs de neutrófilos humanos tratados por quatro horas com EHDA. Após o tratamento, as células foram ou não estimuladas com PMA (50nM) por três horas. E na sequência permeabilizadas com Triton X-100 (0,5) incubadas com tampão de bloqueio (30 minutos) e marcadas para identificação de elastase (α -NE) e histonas (α -H3), e marcados com Hoechst 33342 para identificação do DNA. Então, foi feita a montagem das lâminas com Mowiol®. A análise das NETs ou do processo de NETose foi realizada em microscópio invertido de fluorescência em um aumento de 200X.

6. DISCUSSÃO

Durante este trabalho, foram avaliados os efeitos *in vitro* do tratamento com o extrato bruto hidroalcoólico das folhas de *Dysphania ambrosioides* (EHDa) em neutrófilos humanos. Nesse sentido, buscou-se entender quais mecanismos funcionais dessas células o tratamento poderia influenciar. Além disso, os resultados podem direcionar estudos futuros sobre essa espécie vegetal, assim como trazem uma perspectiva para uma melhor indicação terapêutica do seu uso.

Quando se analisa os efeitos de algum composto, seja natural ou sintético, faz-se necessário garantir a qualidade dessa substância. Um dos testes essenciais é a verificação de possíveis contaminações por microrganismos. Dessa forma, foi realizado o ensaio de controle microbiológico do extrato para crescimento de bactérias e fungos, e constatou-se que as amostras de EHDa usadas neste trabalho não apresentavam contaminações por nenhum dos grupos de microrganismos avaliados (APÊNDICE A). O resultado do teste microbiológico assegura uma boa qualidade inicial do extrato, visto que esse tipo de contaminação pode levar a alterações químicas e físicas (FARMACOPEIA, 2010). Além de ser um possível viés nos resultados.

A ausência dessas possíveis interferências é importante, uma vez que o tratamento estimulou algumas funções efetoras de neutrófilos, como a degranulação, que é um mecanismo relevante na proteção do organismo contra agentes patogênicos e na modulação da inflamação (SHESHACHALAM et al., 2014). O EHDa no tempo de uma hora (Figura 13A), estimulou exocitose das vesículas secretoras de maneira dose dependente, semelhante ao observado no tempo de duas horas (Figura 13B).

Dos quatro tipos de grânulos, a vesícula secretora é a mais facilmente liberada (FAURSCHEU; BORREGAARD, 2003), sendo importante no processo inicial da ativação, pois apresenta uma quantidade significativa de proteínas relacionadas com a migração celular, como β_2 integrina CD11b/CD18 (MAC-1) (BORREGAARD, 2010; STROKA et al., 2013). Em modelo animal de sepse, o extrato de mastroz mostrou potencial para recrutar neutrófilos, compatível ao efeito mostrado na liberação desse tipo de grânulo cujas propriedades são importantes na migração dos neutrófilos (RIOS et al., 2017).

Além das vesículas secretoras, observa-se que o EHDa também interferiu na migração dos grânulos secundários, pois nota-se um aumento na expressão do CD66b e CD15 de maneira concentração-dependente, e de forma semelhante nos dois tempos, uma (Figura 12A e 12C) e

duas (Figura 12B e 12D) horas. Os grânulos secundários participam de forma mais efetiva na atividade antimicrobiana devido a sua composição, contendo lactoferrina, lisosima, elastase, hCAP-18 (proteína antimicrobiana catiônica humana) (FAURSCHOU; BORREGAARD, 2003).

Além dos grânulos secundários, os primários constituem um importante reservatório de compostos antimicrobianos. O EHDa também foi efetivo em estimular a migração desses grânulos, demonstrado pelo aumento na expressão de CD63. No tratamento por uma hora (Figura 11A), apenas a concentração 125 µg/mL induziu a liberação dos grânulos primários. Quando os neutrófilos foram mantidos sob o estímulo do EHDa por mais tempo, duas horas (Figura 11B), observa-se que, além da concentração de 125, a de 50 µg/mL também aumentou a expressão de CD63.

Os grânulos primários, na sequência de degranulação, são os últimos a serem liberados, pois sofrem exocitose limitada de acordo com o potencial de indução e concentração do estímulo (FAURSCHOU et al., 2002). No caso do EHDa, percebe-se a necessidade de um tempo maior ou maiores concentrações para induzir a migração dos grânulos primários, mostrando assim que o tratamento estimula de maneira equilibrada a liberação desses grânulos. Os grânulos primários contêm grandes quantidades de proteínas microbicidas, como catepsinas, defensinas, mieloperoxidase, que também são danosas ao tecido. Por isso, existe a necessidade de uma liberação desses grânulos de forma bem regulada, evitando efeitos deletérios sobre o tecido (SELDERS et al., 2017).

Possivelmente, o EHDa estimulou as proteínas quinases a ativarem vias adjacentes, culminando na alteração do fluxo de cálcio, um sinal secundário crucial para exocitose granular em neutrófilos (SHESHACHALAM et al., 2014). Porém, essas vias ativadas por proteínas quinases se interligam, o que dificulta uma especulação mais pontual, sendo necessária uma investigação mais detalhada do possível mecanismo do EHDa na degranulação. Além disso, estudos recentes demonstram que o mecanismo de degranulação que leva ao dano tecidual do hospedeiro durante a inflamação mediada por neutrófilos envolve processos oxidativo mediados pela NADPH oxidase (POTERA et al., 2017).

O complexo NADPH é formado por componentes membranares e citoplasmáticos, dentre eles o citocromo *b*₅₅₈ (FAURSCHOU; BORREGAARD, 2003), o qual está presente na membrana dos grânulos específicos em uma concentração expressiva (WARD et al., 2000). Logo, a migração do citocromo *b*₅₅₈ para membrana é relevante também para os mecanismos

oxidativos de neutrófilos. Isso está de acordo com os dados aqui observados na degranulação, em que o EHDa estimula a migração dos grânulos específicos e da vesícula secretora para a membrana, e também, com os dados do *burst* oxidativo.

A produção desses reativos foi avaliada em tempo real por quimioluminescência, usando como substrato o luminol e a lucigenina. O luminol é capaz de ser oxidado por todas as espécies reativas de oxigênio, além de ser uma molécula que não sofre a seletividade da membrana celular e funciona como sonda que amplifica proporcionalmente a produção total de EROs, de forma intra e extracelular. A lucigenina, por sua vez, é oxidada apenas pelo ânion superóxido, atuando assim, na quantificação específica deste radical e avaliação da atividade da NADPH oxidase (HATANAKA et al., 2006; FREITAS et al., 2014). Os resultados mostram que o tratamento em uma hora e quatro horas (Figura 14) estimularam a produção do ânion superóxido (Figura 14A e B), assim como das demais EROs (Figura 4C e D). Os neutrófilos respondem com um padrão semelhante quando são mantidos por quatro horas de tratamento com o EHDa (Figura 14B e 14D).

Em modelo experimental, células do lavado peritoneal de animais tratados com o extrato de mastruz, sendo a maioria neutrófilos, apresentaram uma produção de peróxido de hidrogênio mais expressiva quando comparadas ao grupo não tratado (RIOS et al., 2017). O peróxido de hidrogênio, como as demais EROs, é imprescindível para atividade microbida intra e extracelular, sendo que a ausência ou defeito na sua produção acarreta na susceptibilidade a várias infecções (TSUJI et al., 2014). No entanto, a superestimulação dos neutrófilos e produção exacerbada de metabólitos oxidativos podem levar a efeitos deletérios e danos teciduais importantes (LELIEFIELD et al., 2016), uma vez que esses reativos não são seletivos e podem lesar as células do próprio organismo. Muitas doenças inflamatórias crônicas estão relacionadas com a presença exacerbada desses compostos no local da inflamação (CEDERGREN et al., 2007).

Nesse sentido, a ativação “controlada” dos neutrófilos, regulando alguns mecanismos com potencial deletério, surge como forma de atenuar os efeitos da inflamação e já é sugerida como estratégia terapêutica viável para o tratamento de algumas doenças inflamatórias. Dessa forma, foi investigado como essas células responderiam ao tratamento com o extrato de mastruz em um contexto de ativação em demasia. Para tal, foi utilizado o éster PMA, como controle positivo, estímulo padrão para os modelos *in vitro* de ativação de leucócitos. Este composto apresenta mecanismo independente de receptores de membrana, diretamente via proteína

quinase C, que fosforila e aciona uma série de outras moléculas, inclusive componentes do sistema NADPH oxidase (REPINE et al., 1974).

Os neutrófilos tratados com o extrato de mastruz por 20 min, um tempo suficiente para observar o efeito nessa célula (Apêndice D), foram submetidos a um “superestímulo” com o PMA. Notou-se que os grupos tratados com o EHDA reduzem a produção de EROs induzida por PMA, sendo que a maior concentração do extrato teve uma redução significativa, tanto para os reativos totais como para o ânion superóxido (Figura 15E). Logo, o EHDA demonstra potencial para modular a resposta de neutrófilos, estimulando atividades importantes para manter a homeostase do organismo, como o *burst* oxidativo e a degranulação, porém de forma moderada em um contexto de ativação em demasia, como observado em algumas respostas imunes (WRIGHT et al., 2014). Portanto, mesmo que de forma precoce, pode-se sugerir que a ação anti-inflamatória do extrato de mastruz, observada *in vivo* em modelos experimentais (CALADO et al., 2016; TRIVELLATOGRASSI et al., 2013), possa em parte ser explicada por esse controle da resposta deletéria de neutrófilos.

Os efeitos biológicos dos tratamentos envolvendo espécies vegetais estão diretamente relacionados com a composição química. O mastruz, assim como outras espécies vegetais, tem uma constituição bem variada. Jesus et al. (2017) observaram a presença da quercetina e crisina na composição do mastruz. A presença acentuada da crisina foi relacionada com ação antioxidante e anti-inflamatória de *Mitrella kentiem* em leucócitos humanos (SAADAWI et al., 2012), e a quercetina apresentou efeito inibidor do estímulo do PMA, ao reduzir a produção de EROs (LANDI-LIBRANDI et al., 2012).

Um possível mecanismo para ação anti-inflamatória dos flavonoides foi descrito por Ferriola et al. (1989), que mostraram a regulação na proteína quinase C, alvo de ativação pelo PMA, e uma importante proteína sinalizadora dos processos de ativação celular. Zholobenko et al. (2016) mostraram que a estrutura química do flavonoide quercetina pode facilitar a interação com proteína quinase C, modulando a sinalização desta ou inibindo a sua migração para membrana, sendo um possível meio para esses compostos regularem a atividade da NADPH oxidase.

O EHDA tem na sua composição diferentes flavonóides (Tabela 1), como já bem caracterizado para a espécie (JARDIM et al., 2010; KUMAR et al., 2013), e como compostos majoritários, os derivados de Kaempferol e Quercetina. A presença da quercetina e a interação desses compostos com as PKC podem estar regulando o efeito do PMA, como aqui observado.

Esta proposição foi reforçada pelo ensaio *in silico*, onde a quercetina apresentou afinidade e ligação a uma região reguladora da PKC (Figura 8A), visto que esse composto está interagindo com uma região reguladora e não um sítio ativo. A proteína continua a exercer suas atividades, porém de forma moderada, pois as regiões reguladoras da PKC são o alvo de ligação do PMA, o que reforça o efeito regulador do tratamento EHDa quando a célula é estimulada por esse éster.

Além da quercetina, o kaempferol também apresenta variados mecanismos com potencial regulador da resposta inflamatória através da interação com vias como MAPK, ERK, PI3K e também com a PKC (DEVI et al., 2015). A análise computacional para o kaempferol também mostrou uma interação com a PKC, entretanto, diferente da quercetina, esta ligação é em uma região estrutural (Figura 8B), também podendo regular a atividade da PKC, levando aos efeitos aqui observados. Além disso, compostos que interagem com proteína quinase C inibem a produção de superóxido, mas não agem sobre a exocitose dos grânulos (DEWALD et al., 1989), o que justifica os resultados mostrados anteriormente com a degranulação e estímulo na produção das espécies reativas de oxigênio.

De fato, a produção das EROs é importante, e o equilíbrio redox desempenha um papel fundamental em eventos fisiológicos e patológicos, pois além de potencial microbicida como citado, têm sido descritas a capacidade de ativar ou desativar uma variedade de receptores, proteínas, íons e outras moléculas sinalizadoras (SCHIEBER; NAVDEEP, 2014). Quando o equilíbrio redox é perturbado devido à excessiva produção ou depleção de EROs, muitas vias de sinalização são influenciadas, o que confere disfunção celular e, subsequentemente, levando a condições autoimunes e inflamatórias (HOFFMANN et al., 2018). Isto reforça a importância do efeito aqui observado, o qual EHDa apresenta potencial para estimular a produção de EROs de maneira controlada e não persistente.

Dentre as diversas vias em que as EROs estão envolvidas, uma delas é a NETose (FUCH et al., 2007). Considerando que o EHDa mostrou potencial para estimular e modular a produção das EROs, foi investigado se o extrato teria o mesmo efeito na liberação das NETs. Estas consistem em um importante mecanismo de defesa inata, estando também relacionadas ao desencadeamento e intensificação de processos inflamatórias (DELGADO-RIZO et al., 2017).

O tratamento com EHDa no tempo de uma hora (Figura 16A) estimulou o processo de NETose, porém em níveis bem inferiores ao induzido pelo PMA. O mesmo padrão foi observado no tempo de quatro horas (Figura 16B). Ainda, o tratamento prévio com EHDa

reduziu a formação e liberação de NETs induzida por PMA, nos dois tempos de tratamento, ratificando seu potencial regulador. Uma das vias que relaciona a produção de EROs e geração de NETs é ativação da PKC (GRAY et al., 2013). A correlação desses mecanismos e a via da quinase em questão fortalece a sugestão de que EHDA regula a via, reduzindo o estímulo do PMA para os dois parâmetros aqui analisados.

A presença de EROs e ativação da mieloperoxidase (MPO) são necessárias para a liberação das NETs, que tem na sua constituição a própria MPO, elastase de neutrófilos e histonas, sendo assim um mecanismo importante no controle de infecções (PAPAYANNOPOULOS; ZYCHLINSKY, 2009). Os componentes das NETs estão relacionados com a modulação de citocinas inflamatórias, ativação e diferenciação de linfócitos Th17, os quais aumentam o recrutamento de células para o foco inflamatório. A ativação em demasia dos neutrófilos e emissão das NETs tem mostrado relação direta com o desenvolvimento de aterosclerose, por exemplo (CHISTIAKOV et al., 2015), seja pelo potencial tóxico dos seus componentes ou pela via indireta de amplificar a inflamação.

Além disso, os componentes presentes nas NETs foram relatados como principais moléculas relacionadas a danos em células epiteliais e endoteliais no curso da inflamação (KOLACZKOWSKA; KUBES, 2013). Bloqueadores da NETose induziram melhora no prognóstico de algumas doenças inflamatórias (KESHARI et al., 2012). Apesar de o EHDA mostrar eficiência na indução da NETose, esta ocorreu de forma controlada quando comparada com o estímulo do PMA. Ainda, reduziu os efeitos deste éster, logo o tratamento com EHDA mostra um potencial de minimizar os efeitos deletérios da inflamação.

Apesar da NETose ser um mecanismo de morte dos neutrófilos, o conteúdo que é liberado mantém o estímulo na inflamação, como citado anteriormente. Mas essas células dispõem de mecanismos intrínsecos para limitar a ativação exacerbada, dentre esses, a apoptose, que é um mecanismo de morte no qual os conteúdos intracelulares não são expostos ao meio extracelular. Os neutrófilos são caracterizados como células de vida curta e sua apoptose é um mecanismo regulador da inflamação (FOX et al., 2010). A falha ou retardo desse mecanismo está relacionado com o agravamento de algumas doenças inflamatórias, como aterosclerose e doença periodontal crônica (WRIGHT et al., 2014). Nessas condições, a manutenção de neutrófilos ativados é tida como um fator de mau prognóstico (RAZAR et al., 2006).

Nesse contexto, é interessante verificar o efeito dos compostos na viabilidade dessas células, visto que mostrou potencial para estimular alguns de seus mecanismos inflamatórios. Foi possível observar que os neutrófilos tratados por uma (Figura 9A) e quatro horas (Figura 9B), nas concentrações de 50 e 125 µg/mL do EHDa, apresentaram diminuição em sua viabilidade. Ainda, vale ressaltar que o efeito aqui constatado para os neutrófilos, não foi observado para os demais leucócitos, monócitos e linfócitos (Apêndice E), ao se aplicar o mesmo teste de toxicidade, no qual não se observou diferença na viabilidade. Assim, o EHDa mantém o equilíbrio do sistema apoptótico dos neutrófilos sem que inviabilize atividades importantes dessas células, dado que ainda foi possível observar a influência do tratamento nos mecanismos efetores dessa célula, como a degranulação e o *burst* oxidativo.

Apesar de o EHDa ter estimulado esses mecanismos que são importantes na atividade microbicida dos neutrófilos, não houve alteração na fagocitose de leveduras de *C. albicans* após o tratamento por uma (Figura 10A) ou quatro horas (Figura 10 B). Logo, considera-se que o extrato não interfere na fagocitose desses fungos. Este é um resultado interessante, dada a importância dos neutrófilos na resposta a infecções por *C. albicans* de forma direta eliminando o patógeno, como também na modulação do sistema imune para o controle da infecção (NETEA et al., 2015).

Porém, vale considerar que em relação a outro microrganismo a resposta poderia ser diferenciada, visto que conjuntos de receptores distintos são empregados para o reconhecimento e resposta a grupos distintos de patógenos (THOMAS et al., 2013). Ainda, pode-se inferir que o tratamento mantém o potencial dos neutrófilos para o controle do crescimento do microrganismo, visto que o EHDa estimulou mecanismos microbicidas importantes na resposta a essas infecções. A ausência do efeito do EHDa sobre a atividade fagocítica é também um indicativo de que o extrato não interfere em vias de remodelamento de actina, por exemplo (RIDLEY et al., 2001).

Os dados apresentados neste trabalho mostram que o tratamento com o extrato de *D. ambrosioides* foi eficaz em ativar neutrófilos humanos, porém, sem induzir uma resposta com efeito deletério tecidual. No entanto, é importante prosseguir nas investigações do potencial efetivo do EHDa, ao ponto de induzir atividade microbicida, e sobre outros aspectos funcionais dos neutrófilos, como a migração e os possíveis mecanismos moleculares pelos quais o extrato estimula a atividade dessas células.

7. CONCLUSÕES

O tratamento *in vitro* com o extrato hidroalcoólico de *Dysphania ambrosioides* mostrou ser eficaz em estimular funções importantes de neutrófilos humanos:

- Aumentou a exocitose de grânulos primários, secundários e vesículas secretoras
- Estimulou o *burst* oxidativo;
- Induziu a produção de NETs;

Além do que, apresentou potencial para regular as funções dos neutrófilos, em contextos de ativação demasiada:

- Regulando a liberação dos reativos de oxigênio;
- Modulando a liberação das redes extracelulares de neutrófilos –NETs.

Assim, nossos resultados apoiam a ideia preliminar de que o EHDa modula a resposta de neutrófilos humanos. Este estudo constitui um passo inicial para o desenvolvimento de pesquisas em humanos, mesmo que em modelos *in vitro*, e apresenta novas perspectivas das vias envolvidas no tratamento com o *D. ambrosioides*. Ainda, direciona novos estudos e reforça a perspectiva da aplicação de mastuz como terapia, tendo os neutrófilos como um dos alvos principais, podendo assim ser utilizado no contexto terapêutico de patologias infecciosas e inflamatórias.

8. REFERÊNCIAS

AL-KHAF AJ AB, TOHME S, YAZDANI HO, MILLER D, HUANG H, TSUNG A. Superoxide induces Neutrophil Extracellular Trap Formation in a TLR-4 and NOX-dependent mechanism. **Molecular Medicine**, 22, 621.2016.

AMULIC B, CHRISTEL C, GARRET LH, KATHLEEN DM, ARTURO Z. Neutrophil function: from mechanisms to disease. **Annual review of immunology** 30: 459-489.2012.

ANDONEGUI G, CLAUDINE SBR, FRANCIS G, SARAH CM, LORI Z, EKO R, PAUL K. Endothelium-derived Toll-like receptor-4 is the key molecule in LPS-induced neutrophil sequestration into lungs. **The Journal of clinical investigation**. 111, no. 7: 1011-1020; 2003.

ANVISA. AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Farmacopeia Brasileira**, volume 1. 5ª Ed. Brasilia, 2010.

BARROS L, PEREIRA E, CALHELHA RC, DUEÑAS M, CARVALHO AM, SANTOS-BUELGA C, FERREIRA IC. Bioactivity and chemical characterization in hydrophilic and lipophilic compounds of *Chenopodium ambrosioides* L. **Journal of Functional Foods**, 5(4), 1732-1740.2013.

BORREGAARD N. Neutrophils, from marrow to microbes. **Immunity** 33, no. 5:657-670. 2010.

BORREGAARD N, COWLAND JB. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. **Blood**, 89(10), 3503-3521. 1997.

BORREGAARD N, OLE ES, KIM TM. Neutrophil granules: a library of innate immunity proteins. **Trends in immunology** 28, no. 8 340-345. 2007.

BRANZK N, ALEKSANDRA L, SARAH EH, QIAN W, MAXIMILIANO GG, GORDON DB, VENIZELOS P. Neutrophils sense microbe size and selectively release neutrophil extracellular traps in response to large pathogens. **Nature immunology** 15, no. 11: 1017. 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. RENISUS- Relação Nacional de Plantas Mediciniais de Interesse ao SUS. 2009.

BRINKMANN V, ZYCHLINSKY A. Neutrophil extracellular traps: is immunity the second function of chromatin?. **J Cell Biol**, 198(5), 773-783. 2012.

CAIN DW, SNOWDEN PB, SEMPOWSKI GD, KELSOE G. Inflammation triggers emergency granulopoiesis through a density-dependent feedback mechanism. **PloS one**, 6(5), e19957. 2011.

CALADO GP, LOPES AJO, JUNIOR LMC, FRANCISCO CAL, SILVA LA, PEREIRA WS, AMARAL FMM, GARCIA JBSG, NASCIMENTO FR. *Chenopodium ambrosioides* L. Reduces synovial inflammation and pain in experimental Osteoarthritis. **PloS one**, 10(11), e0141886. 2015.

CEDERGREN J, FORSLUND T, SUNDQVIST T, KOGH T. Intracellular oxidative activation in synovial fluid neutrophils from patients with rheumatoid arthritis but not from other arthritis patients. **The Journal of rheumatology**, 34(11), 2162-2170. 2007.

CHISTIYAKOV DA, YURI VB, ALEXANDER NO. Neutrophil's weapons in atherosclerosis. **Experimental and molecular pathology** 99, no. 3: 663-671. 2015.

COWLAND JB, BORREGAARD N. Granulopoiesis and granules of human neutrophils. **Immunological reviews**, 273(1), 11-28. 2016.

COWLAND JB, NIELS B. Molecular characterization and pattern of tissue expression of the gene for neutrophil gelatinase-associated lipocalin from humans. **Genomics** 45, no. 1:17-23. 1997.

DA SILVA DLF, JOSÉ AFBF, ANA KARLLA DSS, THIARE F, FLAVIA MMA, LUCILENE AS, ROSANE NMG, ANTONIO GONÇALVES FILHO, WANDERSON S. PEREIRA, AND FLÁVIA RAQUEL FERNANDES NASCIMENTO. Potencial anti-inflamatório das folhas de *Chenopodium ambrosioides* l. no modelo de cistite hemorrágica em camundongos." **Revista de Ciências da Saúde** 17, no. 1: 25-32.2015.

DE MORAIS SM, DANTAS JDA P, DA SILVA ARA. MAGALHÃES EF. Plantas medicinais usadas pelos índios Tapebas do Ceará. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, 15(2), 169-177.2005.

DELGADO-RIZO V, MARCO AMG, LILIANA IG, ALEJANDRA GR, ANABELL AN, MARY FM. Neutrophil extracellular traps and its implications in inflammation: an overview. **Frontiers in immunology** 8: 81. 2017.

DENNY MF, YALAVARTHI S, ZHAO W, THACKER SG, ANDERSON M, SANDY AR, KAPLAN MJ. A distinct subset of proinflammatory neutrophils isolated from patients with systemic lupus erythematosus induces vascular damage and synthesizes type I IFNs. **The journal of immunology**, 184(6), 3284-3297. 2010.

DEVI KP, DICSON SM, SEYED FN, ANTONI S, JIANBO X, SEYED MN, MARIA D. Kaempferol and inflammation: From chemistry to medicine. **Pharmacological research** 99: 1-10. 2015.

DEWALD B, THELEN M, WYMAN MP, BAGGIOLINI M. Staurosporine inhibits the respiratory burst and induces exocytosis in human neutrophils. **Biochemical Journal**, 264(3), 879-884. 1989.

DIMASI D, WAI YS, CLAUDINE SB. Neutrophil interactions with the vascular endothelium. **International immunopharmacology** 17, no. 4: 1167-1175. 2013.

FAURSCHOU M, BORREGAARD N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. **Microbes and infection**, 5 (14), 1317-1327. 2003.

FAURSCHOU M, OLE ES, ANDERS HJ, JON A, NIELS B. Defensin-rich granules of human neutrophils: characterization of secretory properties. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research** 1591, no. 1-3:29-35. 2002.

FERRIOLA PC, CODY V, MIDDLETON E. Protein kinase C inhibition by plant flavonoids: kinetic mechanisms and structure-activity relationships. **Biochemical pharmacology**, 38(10), 1617-1624. 1989.

FOX S, ANDREW EL, RODGER D, CHRISTOPHER H, ADRIANO GR. Neutrophil apoptosis: relevance to the innate immune response and inflammatory disease. **Journal of innate immunity**, no. 3 216-227. 2010.

FREITAS M, LIMA JL, FERNANDES EO. Optical probes for detection and quantification of neutrophils' oxidative burst. A review. **Analytica chimica acta**, 649(1), 8-23. 2009.

FUCHS TA, ULRIKE A, CHRISTIAN G, ROBERT H, ILKA S, VOLKER W, YVETTE W, VOLKER B, ARTURO Z. "Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps." **The Journal of cell biology** 176, no. 2: 231-241. 2007.

GARRAFFO A, PILMIS B, TOUBIANA J, PUEL A, MAHLAOUI N, BLANCHE S, LORTHOLARY O, LANTERNIER F. Invasive fungal infection in primary immunodeficiencies other than chronic granulomatous disease. **Current Fungal Infection Reports**, 11(1), pp.25-34. 2017.

GEERING B, STOECKLE C, CONUS S, SIMON H U. Living and dying for inflammation: neutrophils, eosinophils, basophils. **Trends in immunology**, 34(8), 398-409. 2013.

GONÇALVES FILHO, A. *Efeitos do extrato de Chenopodium ambrosioides L. na cistite induzida pela ciclofosfamida*. (Doctoral dissertation, Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas). 2013.

GRAY RD CDL, ANNIE M, FENG L, KATIA H, CHRIS H, DONALD JD, ADRIANO GR. Activation of conventional protein kinase C (PKC) is critical in the generation of human neutrophil extracellular traps. **Journal of Inflammation** 10, no. 1:12. 2013.

GUPTA S, KAPLAN MJ. The role of neutrophils and NETosis in autoimmune and renal diseases. **Nature Reviews Nephrology**, 12(7), 402. 2016.

HAGERLING C, WERB Z. Neutrophils: critical components in experimental animal models of cancer. **In Seminars in immunology**. Academic Press. Vol. 28, No. 2, pp. 197-204. 2016.

HATANAKA E, LEVADA-PIRES AC, PITHON-CURI TC, CURI R. Systematic study on ROS production induced by oleic, linoleic, and γ -linolenic acids in human and rat neutrophils. **Free Radical Biology and Medicine**, 41(7), 1124-1132. 2006.

HEASMAN SJ, GILES KM, WARD C, ROSSI AG, HASLETT C, DRANSFIELD I. Glucocorticoid-mediated regulation of granulocyte apoptosis and macrophage phagocytosis of

apoptotic cells: implications for the resolution of inflammation. **Journal of Endocrinology** 178, no. 1: 29-36.2003.

HOFFMANN MH, HELEN G. The dual role of ROS in autoimmune and inflammatory diseases: evidence from preclinical models. **Free Radical Biology and Medicine**. 2018.

HUFFORD MM, GRAHAM RHZ, BALAJI M, ADOLFO GS, RICHARD IE, THOMAS JB. Influenza-infected neutrophils within the infected lungs act as antigen presenting cells for anti-viral CD8+ T cells. **PloS one** 7, no. 10: e46581. 2012

IBIRONKE GF, AJIBOYE KI. Studies on the anti-inflammatory and analgesic properties of *Chenopodium ambrosioides* leaf extract in rats. **International Journal of Pharmacology**, 3(1), 111-115. 2007.

JARDIM CM, JHAM GN, DHINGRA OD, FREIRE MM. Chemical composition and antifungal activity of the hexane extract of the Brazilian *Chenopodium ambrosioides* L. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 21(10), 1814-1818. 2010.

JESUS RS, MARIANA P, ROBSON BF, THIELE FB, CAMILLA FSA, BIANCA VB, NATÁLIA JM, RITIEL CC, ROBERTO CVS, TANISE VD, BIANCA VB, MARLIN MAC, LILLIANE FB. "In vitro antimicrobial and antimycobacterial activity and HPLC–DAD screening of phenolics from *Chenopodium ambrosioides* L. **Brazilian Journal of Microbiology**. 2017.

JORCH SK, PAUL KS. An emerging role for neutrophil extracellular traps in noninfectious disease. **Nature medicine** 23, no. 3: 279. 2017.

KAY, A. B. Paul Ehrlich and the Early History of Granulocytes. **Microbiology spectrum** 4, no. 4. 2016.

KESHARI RS, JYOTI A, DUBEY M, KOTHARI N, KOHLI M, BOGRA J, Manoj KB, DIKSHIT M. Cytokines induced neutrophil extracellular traps formation: implication for the inflammatory disease condition. **PLoS One**, 7(10), e48111. 2012.

KHANDPUR R, CARMONA-RIVERA C, VIVEKANANDAN-GIRI A, GIZINSKI A, YALAVARTHI S, KNIGHT JS, THOMPSON P, POJEN C, DAVID AF, SUBRAMANIAM P, MARIANA JK. NETs are a source of citrullinated autoantigens and stimulate inflammatory responses in rheumatoid arthritis. **Science translational medicine**,5(178), 178ra40-178ra40. 2013.

KIUCHI F, ITANO Y, UCHIYAMA N, HONDA G, TSUBOUCHI A, NAKAJIMA-SHIMADA J, AOKI T. Monoterpene hydroperoxides with trypanocidal activity from *Chenopodium ambrosioides*. **Journal of Natural Products**, 65(4), 509-512. 2002.

KNIGHT JS, SUBRAMANIAN V, O'DELL AA, YALAVARTHI S, ZHAO W, SMITH CK, HODGIN JB, THOMPSON PR, KAPLAN MJ. Peptidylarginine deiminase inhibition disrupts NET formation and protects against kidney, skin and vascular disease in lupus-prone MRL/lpr mice. **Annals of the rheumatic diseases**74, no. 12: 2199-2206. 2015.

KOLACZKOWSKA E, KUBES P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nature reviews. Immunology*, 13(3), 159. 2013.

KRUGER P, SAFFARZADEH M, WEBER AN, RIEBER N, RADSACK M, VON BERNUTH H, CHARAF B, DIRK R, JULIA S, HARTL D. Neutrophils: between host defence, immune modulation, and tissue injury. *PLoS pathogens*, 11(3), e1004651. 2015.

KUMAR, R., MISHRA, A. K., DUBEY, N. K., & TRIPATHI, Y. B. Evaluation of *Chenopodium ambrosioides* oil as a potential source of antifungal, antiaflatoxigenic and antioxidant activity. *International Journal of Food Microbiology*, 115(2), 159-164. 2007.

LACY P. Mechanisms of degranulation in neutrophils. *Allergy, Asthma & Clinical Immunology* 2, no. 3: 98. 2006.

LAMBETH JD, NEISH AS. Nox enzymes and new thinking on reactive oxygen: a double-edged sword revisited. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 9, 119-145. 2014.

LANDE R, GANGULY D, FACCHINETTI V, FRASCA L, CONRAD C, GREGORIO J, MELLER S, CHAMILOS G, SEBASIGARI R, RICCIERI V, BASSETT R, AMURO H, FUKUHARA S, ITO T, LIU YJ, GILLIET M. Neutrophils activate plasmacytoid dendritic cells by releasing self-DNA-peptide complexes in systemic lupus erythematosus. *Science translational medicine*, 3(73), 73ra19-73ra19. 2011.

LANDI-LIBRANDI AP, CALEIRO SAAE, DE OLIVEIRA CA, LUCISANO-VALIM YM. Inhibitory activity of liposomal flavonoids during oxidative metabolism of human neutrophils upon stimulation with immune complexes and phorbol ester. *Drug delivery*, 19(4), 177-187. 2012.

LEE WL, RENE EH, SERGIO G. Phagocytosis by neutrophils. *Microbes and infection* 5, no. 14: 1299-1306. 2003.

LELIEFELD PH, WESSELS CM, LEENEN LP, KOENDERMAN L, PILLAY J. The role of neutrophils in immune dysfunction during severe inflammation. *Critical Care*, 20(1), 73. 2016.

LI X, UTOMO A, CULLERE X, CHOI MM, MILNER DA, VENKATESH D, MAYADAS TN. The β -glucan receptor Dectin-1 activates the integrin Mac-1 in neutrophils via Vav protein signaling to promote *Candida albicans* clearance. *Cell host & microbe*, 10(6), 603-615. 2011.

LIPPOLIS JD, REINHARDT TA, GOFF JP, HORST RL. Neutrophil extracellular trap formation by bovine neutrophils is not inhibited by milk. *Veterinary immunology and immunopathology*, 113(1), 248-255. 2006.

LÓPEZ-LAGO MA, POSNER S, THODIMA VJ, MOLINA AM, MOTZER RJ, CHAGANTI RSK. Neutrophil chemokines secreted by tumor cells mount a lung antimetastatic response during renal cell carcinoma progression. *Oncogene*, 32(14), 1752. 2013.

LORENZI H, MATOS FJ, FRANCISCO JM. *Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas*. 2002.

MANTOVANI A, CASSATELLA MA, COSTANTINI C, JAILLON S. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. **Nature reviews Immunology**, 11(8), 519. 2011.

MARTIN C, PETER CB, GARY B, JOSE-CARLOS GR, TIMOTHY JW, SARA MR. Chemokines acting via CXCR2 and CXCR4 control the release of neutrophils from the bone marrow and their return following senescence. **Immunity** 19, no. 4: 583-593. 2003

MAYADAS TN, CULLERE X, LOWELL CA. The multifaceted functions of neutrophils. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, 9, 181-218. 2014.

MITTAL M, SIDDIQUI MR, TRAN K, REDDY SP, MALIK AB. Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury. **Antioxidants & redox signaling**, 20(7), 1126-1167. 2014.

NAEGELEN I, BEAUME N, PLANÇON S, SCHENTEN V, TSCHIRHART E.J. AND BRÉCHARD S. Regulation of neutrophil degranulation and cytokine secretion: a novel model approach based on linear fitting. **Journal of immunology research**, 2015.

NASCIMENTO FRF, GUSTAVO VBC, PAULO VSP, MÁRCIA CGM, LUCILENE AS, ANA PAULA SA, ELIZABETH SBB, ROSANE NMG. Ascitic and solid Ehrlich tumor inhibition by *Chenopodium ambrosioides* L. treatment. **Life sciences** 78, no. 22:2650-2653.2006.

NATHAN C, AIHAO D. Nonresolving inflammation." **Cell** 140, no. 6 871-882. 2010.

NAUSEEF WM, NIELS B. Neutrophils at work. **Nature immunology** 15, no. 7 602. 2014.

NEIVA VDA, RIBEIRO MNDS, CARTÁGENES MDSDS, MORAES-COUTINHO DF, NASCIMENTO FRF, REIS AS, AMARAL FMD. Estudos pré-clínicos de atividade giardicida de *Chenopodium ambrosioides* l. e a padronização dos extratos na pesquisa e desenvolvimento de fitoterápicos. **Revista de Ciências da Saúde**, 13(2).2013.

NETEA MG, LEO ABJ, JOS WMVDM, BART-JAN K, FRANK LVV. Immune defence against *Candida* fungal infections. **Nature reviews Immunology** 15, no. 10: 630. 2015.

NETO VFP, RIBEIRO RM, MORAIS CS, CAMPOS MB, VIEIRA DA, GUERRA PC, ABREU-SILVA AL, SILVA JJR, NASCIMENTO FRF, BORGES MOR, BORGES ACR. *Chenopodium ambrosioides* as a bone graft substitute in rabbits radius fracture. **BMC complementary and alternative medicine**, 17(1), 350. 2017.

NISHIO N, OKAWA Y, SAKURAI H, ISOBE KI. Neutrophil depletion delays wound repair in aged mice. **Age**, 30(1), 11-19. 2008.

ORSI N. The antimicrobial activity of lactoferrin: current status and perspectives. **Biometals**, 17(3), 189-196. 2004.

ORTEGA-GÓMEZ A, MAURO P, OLIVER S. Resolution of inflammation: an integrated view. **EMBO molecular medicine** 5, no. 5 661-674. 2013.

PAPAYANNOPOULOS V, METZLER KD, HAKKIM A, ZYCHLINSKY A. Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. **The Journal of cell biology**, 191(3), 677-691. 2010.

PARIS AJ, LIU Y, MEI J, DAI N, GUO L, SPRUCE LA, HUDOCK KM, BRENNER JS, ZACHARIAS WJ, MEI HD, SLAMOWITZ AR, BHAMIDIPATI K, BEERS MF, SEEHOLZER SH, MORRISEY EE, WORTHEN GS. Neutrophils promote alveolar epithelial regeneration by enhancing type II pneumocyte proliferation in a model of acid-induced acute lung injury. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, 311(6), L1062-L1075. 2016.

PATRÍCIO FJ, COSTA GC, PEREIRA PV, ARAGÃO-FILHO WC, SOUSA SM, FRAZÃO JB, PEREIRA WS, MACIEL MC, SILVA LA, AMARAL FM, REBÊLO M. Efficacy of the intralesional treatment with *Chenopodium ambrosioides* in the murine infection by *Leishmania amazonensis*. **Journal of Ethnopharmacology**, 115(2), pp.313-319. 2008.

PATRÍCIO FJ, COSTA GC, PEREIRA PV, ARAGÃO-FILHO WC, SOUSA SM, FRAZÃO JB, PEREIRA WS, MACIEL MC, SILVA LA, AMARAL FM, REBÊLO JM, GUERRA RN, RIBEIRO MN, NASCIMENTO FR. Efficacy of the intralesional treatment with *Chenopodium ambrosioides* in the murine infection by *Leishmania amazonensis*. **Journal of Ethnopharmacology** 115, no. 2: 313-319. 2008.

PEREIRA WS, DA SILVA GP, VIGLIANO MV, LEAL N.R, PINTO FA, FERNANDES, DC, SANTOS SV, MARTINO T. NASCIMENTO JR, DE AZEVEDO APS. AND FONSECA EM. Anti-arthritic properties of crude extract from *Chenopodium ambrosioides* L. leaves. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**.2018.

PEREIRA WS, RIBEIRO BP, SOUSA AI, SERRA I, MATTAR NS, FORTES TS, REIS AS, SILVA LA, BARROQUEIRO ES, GUERRA, R.N. AND NASCIMENTO, F.R. Evaluation of the subchronic toxicity of oral treatment with *Chenopodium ambrosioides* in mice. **Journal of ethnopharmacology**, 127(3), pp.602-605. 2010.

PILLAY J, DEN BRABER I, VRISEKOOOP N, KWAST LM, DE BOER RJ, BORGHANS JA, TESSELAAR K, KOENDERMAN L. In vivo labeling with $^2\text{H}_2\text{O}$ reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days. **Blood**, 116(4), 625-627. 2010.

PINEGIN B, NINA V, VLADIMIR P. Neutrophil extracellular traps and their role in the development of chronic inflammation and autoimmunity. **Autoimmunity reviews** 14, no. 7 633-640. 2015.

PINHEIRO NETO VF, RACHEL MR, CAMILA SM, MATHEUS BC, DENILSON AV, PORFÍRIO CG, ANA LAS, JOSÉ RS, JUNIOR F, RAQUEL FN, MARILENE OR BORGES, ANTONIO CRB. *Chenopodium ambrosioides* in the repair of fractures in rabbits. **International Journal of Pharmacology**, 11(7), 732-737. 2015.

POTERA RM, JENSEN MJ, HILKIN BM, SOUTH GK, HOOK JS, GROSS EA, MORELAND JG. Neutrophil azurophilic granule exocytosis is primed by TNF- α and partially regulated by NADPH oxidase. *Innate Immun.* Nov;22(8):635-646). 2016.

QUINLAN MB, QUINLAN RJ, NOLAN JM. Ethnophysiology and herbal treatments of intestinal worms in Dominica, West Indies. *Journal of Ethnopharmacology*, 80(1), 75-83. 2002.

RAVICHANDRAN KS. Beginnings of a good apoptotic meal: the find-me and eat-me signaling pathways. *Immunity* 35, no. 4: 445-455. 2011.

RAZA K, SCHEEL-TOELLNER D, LEE CY, PILLING D, CURNOW SJ, FALCIANI F, TREVINO V, KUMAR K, ASSI LK, LORD JM, GORDON C, BUCKLEY CD, SALMON. Synovial fluid leukocyte apoptosis is inhibited in patients with very early rheumatoid arthritis. *Arthritis research & therapy*, 8(4), R120. 2006.

REPETTO, GUILLERMO, ANA DEL PESO, AND JORGE L. ZURITA. "Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity." *Nature protocols* 3, no. 7: 1125. (2008)

REPINE JE, WHITE JG, CLAWSON CC, HOLMES BM. The influence of phorbol myristate acetate on oxygen consumption by polymorphonuclear leukocytes. *The Journal of laboratory and clinical medicine*, 83(6), 911-920. 1974.

RIDLEY A J. Rho family proteins: coordinating cell responses. *Trends in cell biology* 11, no. 12: 471-477. 2001.

RIGBY KM, DELEO FR. Neutrophils in innate host defense against *Staphylococcus aureus* infections. *In Seminars in immunopathology*. Vol. 34, No. 2, pp. 237-259. 2012.

RIOS CE, ABREU AG, BRAGA FILHO JA, NASCIMENTO JR, GUERRA RN, AMARAL FM, MACIEL MC, NASCIMENTO FR. *Chenopodium ambrosioides* L. improves phagocytic activity and decreases bacterial growth and the systemic inflammatory response in sepsis induced by cecal ligation and puncture. *Frontiers in Microbiology*, 8. 2017.

ROBERTSON AL, HOLMES GR, BOJARCZUK AN, BURGON J, LOYNES CA, CHIMEN M, SAWTELL AK, HAMZA B, WILLSON J, WALMSLEY SR, ANDERSON SR, COLES MC, FARROW SN, SOLARI R, JONES S, PRINCE LR, IRIMIA D, RAINGER GE, KADIRKAMANATHAN V, WHYTE MK, RENSHAW SA. zebrafish compound screen reveals modulation of neutrophil reverse migration as an anti-inflammatory mechanism. *Science translational medicine*, 6(225), 225ra29-225ra29. 2014.

ROOS D. Doença granulomatosa crônica. *Boletim médico britânico*, 118 (1), 50-63. 2016.

SAADAWI S, JALIL J, JASAMAI M, JANTAN I. Inhibitory effects of acetylmelodrinol, chrysin and polycarpol from *mitrella kentii* on prostaglandin E2 and thromboxane B2 production and platelet activating factor receptor binding. *Molecules*, 17(5), 4824-4835. 2012.

SALDANHA LL, WAGNER V, ANNE LD. Characterization of flavonoids and phenolic acids in *Myrcia bella* cambess. Using FIA-ESI-IT-MSn and HPLC-PAD-ESI-IT-MS combined with NMR." **Molecules** 18, no. 7 8402-8416. 2013

SCHIEBER M AND NAVDEEP SC. "ROS function in redox signaling and oxidative stress." **Current biology** 24, no. 10 R453-R462. 2014:

SCHIEBER M, NAVDEEP SC. ROS function in redox signaling and oxidative stress." **Current biology** 24, no. 10: R453-R462. 2014.

SELDERS GS, FETZ AE, RADIC MZ, BOWLIN GL. An overview of the role of neutrophils in innate immunity, inflammation and host-biomaterial integration. **Regen Biomater**. Feb; 4(1): 55–68. 2017.

SENNA L. *Chenopodium* in *Lista de Espécies da Flora do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <https://sites.google.com/site/florasbs/chenopodiaceae/erva-de-santa-maria>. Acesso em: 20 de maio de 2018. 2010.

SHAUL ME, LEVY L, SUN J, MISHALIAN I, SINGHAL S, KAPOOR V, HORNG W, FRIDLENDER G, ALBELDA SM, FRIDLENDER ZG. Tumor-associated neutrophils display a distinct N1 profile following TGF β modulation: A transcriptomics analysis of pro-vs. antitumor TANs. **Oncoimmunology**, 5(11), e1232221. 2016.

SHESHACHALAM A, SRIVASTAVA N, MITCHELL T, LACY P, EITZEN G. "Granule protein processing and regulated secretion in neutrophils. **Frontiers in immunology** 5: 448. 2014.

SOUZA JPJ. "Efeito anti-inflamatório do extrato hidroalcoólico de folhas de *Chenopodium ambrosioides* L. na bexiga de ratos submetidos à cistotomia." 2014.

STARK MA, HUO Y, BURCIN TL, MORRIS M, OLSON TS, LEY K Phagocytosis of apoptotic neutrophils regulates granulopoiesis via IL-23 and IL-17. **Immunity**, 22(3), 285-294. 2005.

SULLIVAN DP, WILLIAM AM. Neutrophil and monocyte recruitment by PECAM, CD99, and other molecules via the LBRC. **In Seminars in immunopathology**, vol. 36, no. 2, pp. 193-209. Springer Berlin Heidelberg. 2014.

SUNDD P, MARIA KP, LUTHUR SC, KONSTANTINOS K, KLAUS L. Biomechanics of leukocyte rolling. **Biorheology** 48, no. 1: 1-35. 2011.

SUNDQVIST M, WEKELL P, OSLA V, BYLUND J, CHRISTENSON K, SÄVMAN K, FOELL D, CABRAL DA, FASTH A, BERG S, BROWN KL, KARLSSON A. Increased intracellular oxygen radical production in neutrophils during febrile episodes of periodic fever, aphthous stomatitis, pharyngitis, and cervical adenitis syndrome. **Arthritis & Rheumatology**, 65(11), 2971-2983.2013.

TAKASHIMA A, YI Y. Neutrophil plasticity: acquisition of phenotype and functionality of antigen-presenting cell. **Journal of leukocyte biology** 98, no. 4: 489-496. 2015.

TAKEI H, ARAKI A, WATANABE H, ICHINOSE A, SENDO F. Rapid killing of human neutrophils by the potent activator phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) accompanied by changes different from typical apoptosis or necrosis. **J Leukoc Biol** 59:229–40. 1996.

THOMAS CJ, KATE S. Pattern recognition receptor function in neutrophils. **Trends in immunology** 34, no. 7: 317-328. 2013.

TRIVELLATOGRASSI L, MALHEIROS A, MEYRE-SILVA C, DA SILVA BZ, MONGUILHOTT ED, FRÖDE TS, DE SOUZA, M. M. From popular use to pharmacological validation: a study of the anti-inflammatory, anti-nociceptive and healing effects of *Chenopodium ambrosioides* extract. **Journal of ethnopharmacology**, 145(1), 127-138. 2013.

TSUJI S, KANEKO K. Genetic Disorders and Oxidative Stress (Especially Chronic Granulomatous Disease). Springer New York. **In Studies on Pediatric Disorders** (pp. 315-327). 2014.

UNDERHILL DM, OZINSKY A. Toll-like receptors: key mediators of microbe detection. **Current opinion in immunology**, 14(1), 103-110. 2002.

VAN DEN BERG JM, KUIJPERS TW. Educational paper. **European journal of pediatrics**, 170(11), 1369. 2011.

VILLANUEVA E, YALAVARTHI S, BERTHIER CC, HODGIN JB, KHANDPUR R, LIN AM, RUBIN CJ, ZHAO W, OLSEN SH, KLINKER M, SHEALY D, DENNY MF, PLUMAS J, CHAPEROT L, KRETZLER M, BRUCE AT, KAPLAN MJ.. Netting neutrophils induce endothelial damage, infiltrate tissues, and expose immunostimulatory molecules in systemic lupus erythematosus. **The Journal of Immunology**, 187(1), 538-552. 2011.

VON VIETINGHOFF S, LEY K. IL-17A controls IL-17F production and maintains blood neutrophil counts in mice. **J. Immunol.** 183, 865–873. 2009.

WARD RA, MICHIO N, KENNETH RM. Priming of the neutrophil respiratory burst involves p38 mitogen-activated protein kinase-dependent exocytosis of flavocytochrome b 558-containing granules. **Journal of Biological Chemistry** 275, no. 47: 36713-36719. 2000.

WARK PAB, JOHNSTON SL, MORIC I, SIMPSON JL, HENSLEY MJ, & GIBSON, P. G. Neutrophil degranulation and cell lysis is associated with clinical severity in virus-induced asthma. **European Respiratory Journal**, 19(1), 68-75. 2002.

WILLIS VC, ALISON MG, NIRMAL KB, COREY PC, BRYAN K, KRISTEN NC, YUAN LUO. "N- α -benzoyl-N5-(2-chloro-1-iminoethyl) -L-ornithine amide, a protein arginine deiminase inhibitor, reduces the severity of murine collagen-induced arthritis. **The Journal of Immunology** 186, no. 7: 4396-4404. 2011.

WINTERBOURN CC, ANTHONY JK, MARK BH. Reactive oxygen species and neutrophil function. **Annual review of biochemistry** 85: 765-792. 2016.

WITTKOWSKI H, DIRK F, ERIK AFK, LEEN DR, FILIP DK, MICHAEL F, ANN-KRISTIN U, JOHANNES R. Effects of intra-articular corticosteroids and anti-TNF therapy on neutrophil activation in rheumatoid arthritis. **Annals of the rheumatic diseases** 66, no. 8: 1020-1025. 2007.

WRIGHT HL, MOOTS RJ, EDWARDS SW. The multifactorial role of neutrophils in rheumatoid arthritis. **Nature Reviews Rheumatology**, 10(10), 593-601. 2014.

YIPP BG, KUBES P. NETosis: how vital is it? **Blood** 122:2784-94. Doi: 10.1182/blood-2013-04-457671. 2013.

ZHOLOBENKO A, MOUTHYS-MICKALAD A, MODRIANSKY M, SERTEYN D, FRANCK T. Polyphenols from *Silybum marianum* inhibit in vitro the oxidant response of equine neutrophils and myeloperoxidase activity. **Journal of veterinary pharmacology and therapeutics**, 39(6), 592-601. 2016.

APÊNDICES

APÊNDICE A

Avaliação da qualidade do extrato, relacionada à presença de microrganismos. Na avaliação microbiológica, o EHDa não apresentou contaminação, pois não foi evidenciado crescimento de bactérias ou fungos (Figura 6). Avaliação da qualidade do extrato, relacionada à presença de microrganismos.

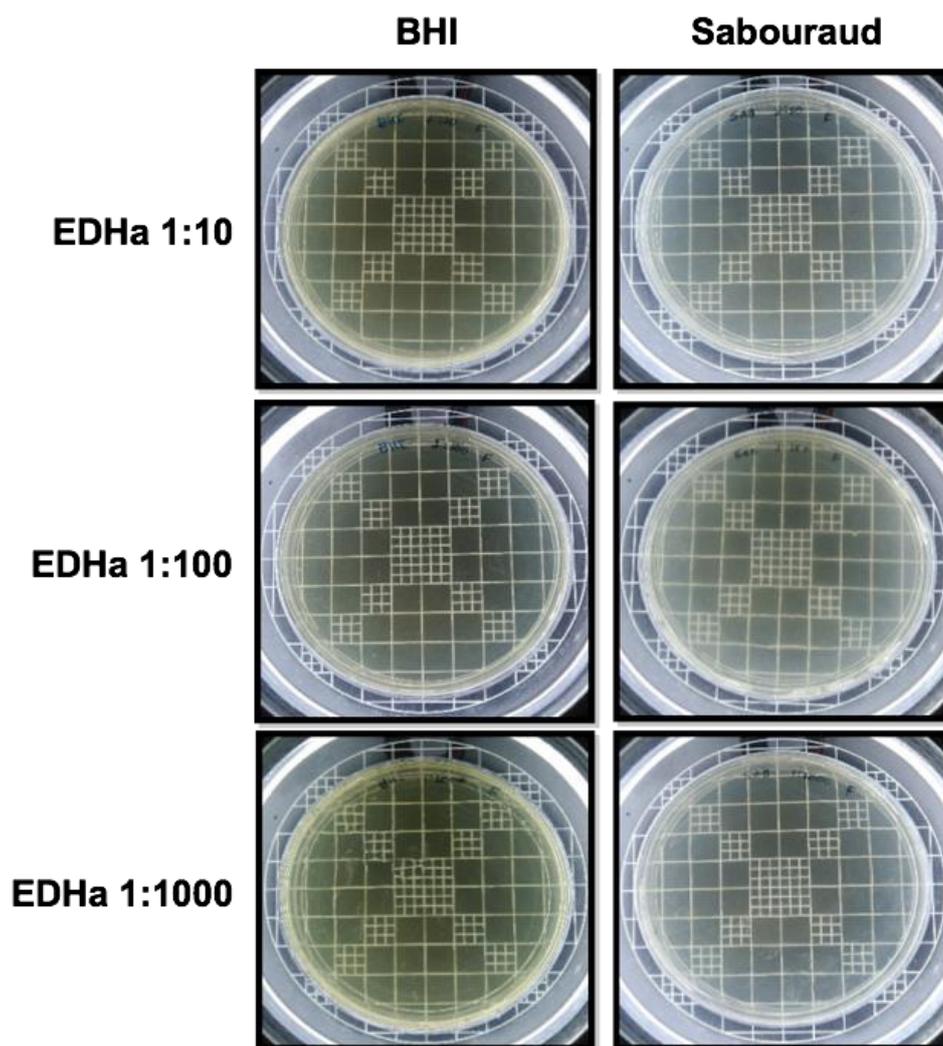


Figura 19 Avaliação microbiológica do EHDa. Amostras (100 μ l) de EHDa em três diluições 1:10, 1:100, 1:1000, foram semeadas em ágar BHI ou ágar Sabouraud, para avaliação da contaminação por bactérias ou fungos, respectivamente. As placas foram mantidas em estufa microbiológica a 37 °C e acompanhadas por sete dias, diariamente.

APÊNDICE B

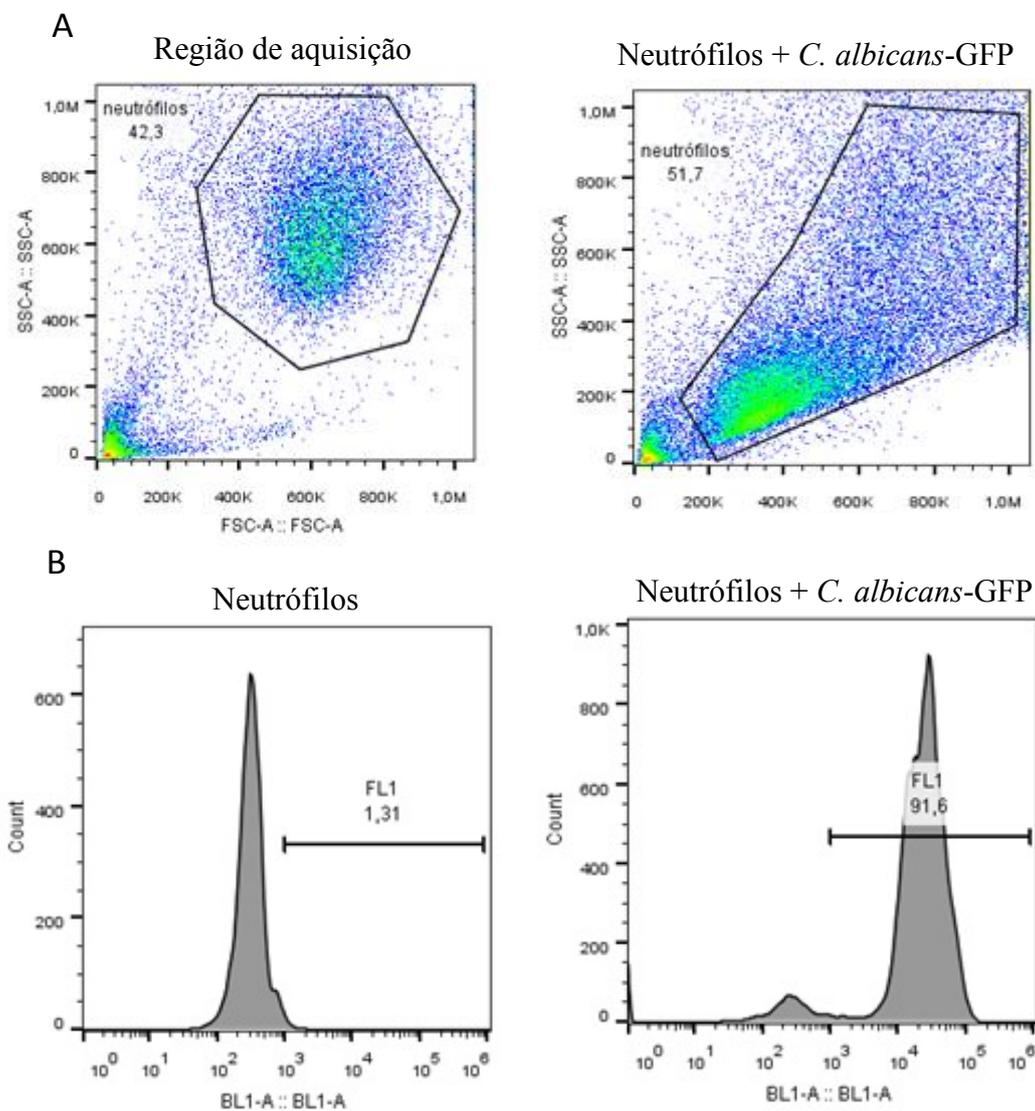


Figura 20 Estratégia de aquisição e análise de fagocitose por citometria de fluxo. Neutrófilos tratados com EHDa (5, 50 e 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por uma ou quatro horas, foram incubadas com leveduras de *C. albicans* - GFP (green fluorescent protein) por 30 min. Em seguida, foi feita leitura em citômetro de fluxo e análise no software FlowJo v 10.0. Os dados estão expressos em média \pm desvio padrão do percentual de células que fagocitaram e pelo MFI. A- Dot plot representativo da região de eventos (SSC vs FSC). B-Histogramas representativos da avaliação da atividade fagocítica baseada no MFI.

APÊNDICE C

O PMA estimula a migração dos grânulos primários (expressão do CD63).

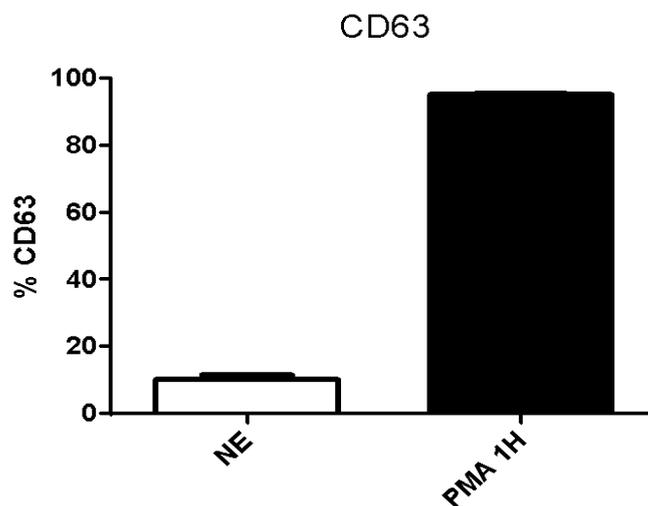


Figura 21 Controle do ensaio de degranulação. Os neutrófilos foram ou não estimulados com PMA (150nM) por uma hora, seguido da marcação com anticorpo anti-CD63 e leitura em citômetro de fluxo. Para análise, 5000 eventos foram adquiridos levando-se em consideração os parâmetros de tamanho (Forward Scatter, FSC) e complexidade celular (Side Scatter, SSC) para estabelecimento da região de aquisição. Posteriormente, os dados foram analisados no software FlowJo v 10.0.

APÊNDICE D

Produção de reativos de oxigênio por neutrófilos durante o estímulo com EHDa e PMA por uma hora.

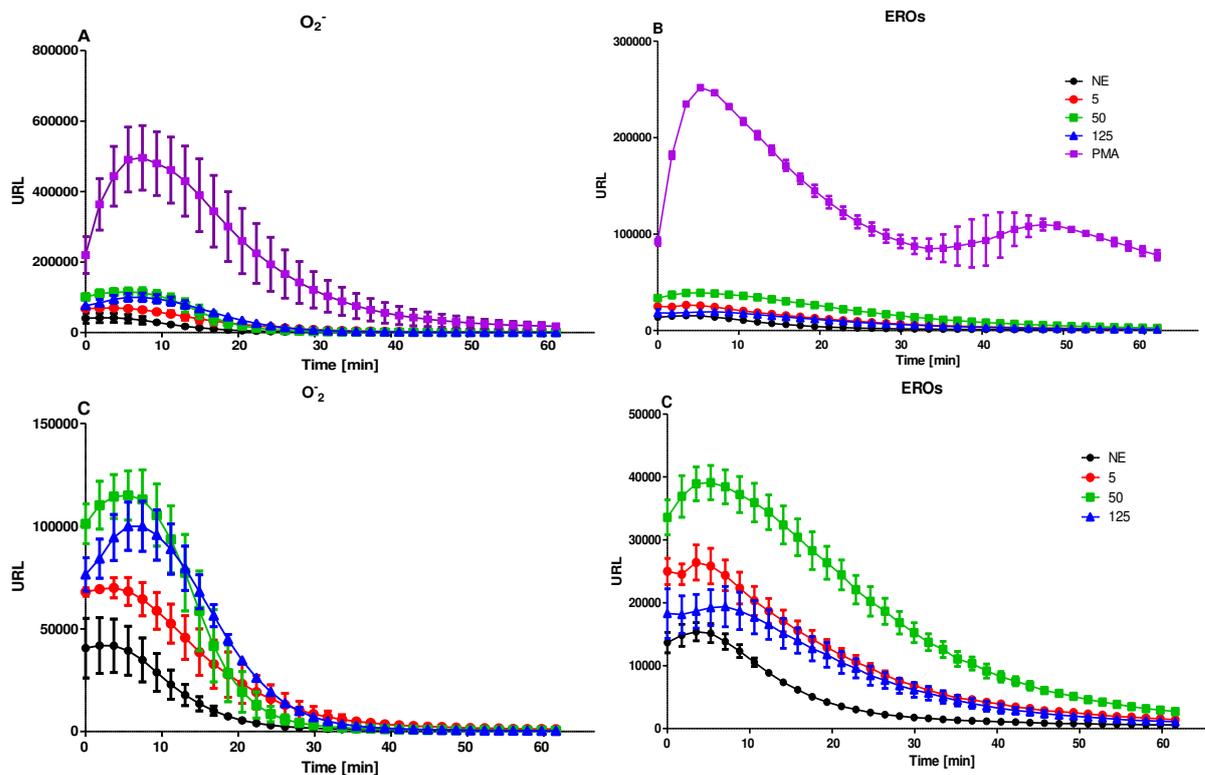


Figura 22 Cinética do *burst* oxidativo de neutrófilos tratados com EHDa. Às células (1×10^6 células/mL) foi adicionado EHDa nas concentrações de 5, 50 e 125 $\mu\text{g/mL}$ ou PMA (50 nM). Em seguida, foram adicionados os substratos luminol (100 μM) ou lucigenina (100 μM) para leitura em luminômetro por uma hora.

APÊNDICE E

O EHDa não apresentou toxicidade significativa para as PBMC em nenhuma das concentrações testadas, para os tempos de uma e quatro horas.

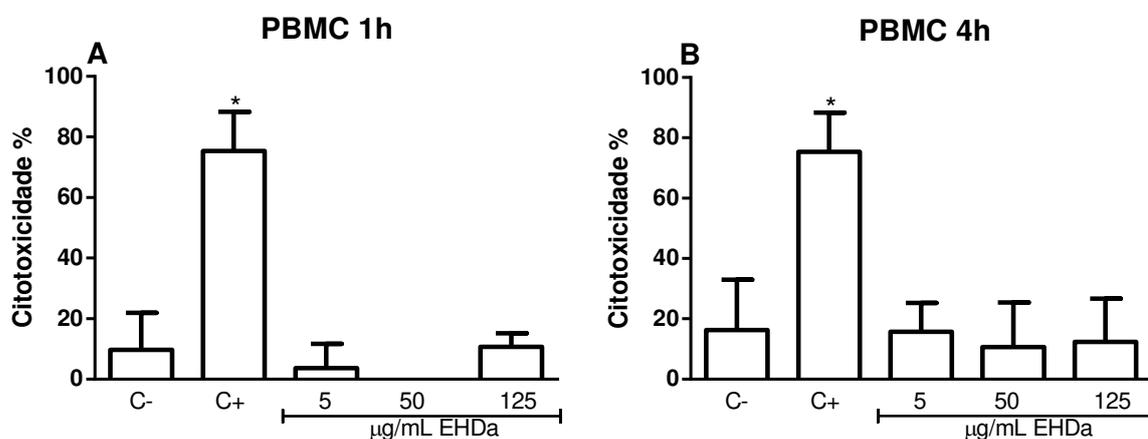


Figura 23 Toxicidade do extrato hidroalcoólico de *Dysphania ambrosioides* em PBMC humanas. As células (1×10^6 /mL) foram tratadas com EHDa por uma e quatro horas, seguida da incubação com solução de vermelho neutro (40 µg/mL) por três horas, fixação em formaldeído 0,5% em CaCl₂ (1%) por 5 min, e revelação em solução de álcool ácido. A absorbância foi lida a 540 nm em leitor de microplaca para cálculo da viabilidade e citotoxicidade.

ANEXOS

ANEXO A

Voucher de identificação da espécie *Dysphania ambrosioides*.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO

Fundação Instituída nos termos da Lei nº 8.152, de 21/03/1966 - São Luís - Maranhão.



DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA - CCBS
HERBÁRIO DO MARANHÃO - MAR

São Luís, 10 de Julho de 2017.

CONFIRMAÇÃO DE IDENTIFICAÇÃO

Segue abaixo a confirmação da identificação realizada. Desde já agradecemos o envio do material e informamos que o mesmo estará, em breve, devidamente catalogado no acervo do Herbário MAR.

Nº tombo MAR	Coletor (número)	Família	Espécie
9.349	GOMES, L. N. e E.B. Almeida Jr. (01)	Amaranthaceae	<i>Dysphania ambrosioides</i> (L.) Mosyakin & Clemants

Atenciosamente,

Prof. Dr. Eduardo B. de Almeida Jr.
Curador do Herbário MAR

ANEXO B

Parecer do comitê de ética.

UFMA - UNIVERSIDADE
FEDERAL DO MARANHÃO**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: Avaliação da ativação de leucócitos humanos e sua ação fungicida, induzida por tratamento com *Chenopodium ambrosioides*

Pesquisador: Paulo Vitor Soeiro Pereira

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 68829617.6.0000.5087

Instituição Proponente: FUNDACAO UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHAO

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.639.667

Apresentação do Projeto:

As infecções causadas por fungos, principalmente por espécies do gênero *Candida*, tem aumentado nas últimas décadas, em decorrência do crescente número de indivíduos imunocomprometidos, e pelo desenvolvimento de resistência a alguns antifúngicos. Dessa forma, observamos a necessidade de se buscar novas terapias, que venham a auxiliar os tratamentos comumente mais utilizados. Nesse contexto, tem-se observado um aumento no uso de produtos naturais para a terapia de diferentes enfermidades. Dentre espécies vegetais mais utilizadas, damos ênfase ao *Chenopodium ambrosioides* (mastruz), que é uma planta com ampla distribuição pelo Brasil e com propriedades biológicas já demonstradas, como atividade antitumoral, leishmanicida, antibacteriana, e imunomoduladora. Levando em consideração sua ação potencial em ativar o sistema imune, e uma vez que esses resultados são provenientes de modelos animais, temos como objetivo avaliar a ação *in vitro* do extrato hidroalcoólico de *Chenopodium ambrosioides* em leucócitos humanos de sangue periférico e seu potencial fungicida. Para tal faremos análises de perfil de ativação celular, produção de citocinas, burst oxidativo, fagocitose e atividade microbicida. Esperamos então que o tratamento com *C. ambrosioides* seja capaz de modular a resposta dos leucócitos humanos (monócitos e linfócitos), aumentando sua atividade microbicida contra *Candida albicans*.

Continuação do Parecer: 2.639.667

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Todas as pendências foram acatadas e corrigidas pelo pesquisador e estão de acordo com a resolução 486/12 do CNS.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_797571.pdf	18/04/2018 11:14:37		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Paulo_VS_Pereira_18_de_abril_2018.doc	18/04/2018 11:14:20	Paulo Vitor Soeiro Pereira	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Paulo_VS_Pereira_18_de_abril_2018.pdf	18/04/2018 11:14:03	Paulo Vitor Soeiro Pereira	Aceito
Outros	Carta_resposta_CEP_Projeto_Mastruz_e_Leucocitos_18_de_abril_2018.pdf	18/04/2018 11:13:19	Paulo Vitor Soeiro Pereira	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Mastruz_e_Leucocitos_CEP_Paulo_VS_Pereira.doc	12/04/2018 14:11:39	Paulo Vitor Soeiro Pereira	Aceito
Outros	Carta_resposta_CEP_Projeto_Mastruz_e_Leucocitos.pdf	12/04/2018 14:11:18	Paulo Vitor Soeiro Pereira	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Mastruz_e_Leucocitos_CEP_Paulo_VS_Pereira.pdf	12/04/2018 14:08:03	Paulo Vitor Soeiro Pereira	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto_Projeto_IDP_MA.pdf	24/08/2017 09:08:57	Paulo Vitor Soeiro Pereira	Aceito
Outros	Declaracao_do_Local_de_Coleta_Paulo_VS_Pereira.pdf	06/03/2017 11:13:00	Paulo Vitor Soeiro Pereira	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não