

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICA DE RIBEIRÃO PRETO

Mecanismo de ação de flavonóides no metabolismo oxidativo
e na fagocitose de neutrófilos humanos desencadeados por
receptores Fc gama e CR

Everton de Oliveira Lima dos Santos

Ribeirão Preto
2010

RESUMO

SANTOS, E.O.L. **Mecanismo de ação de flavonóides no metabolismo oxidativo e na fagocitose de neutrófilos humanos desencadeados por receptores Fc gama e CR.** 2010. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

O sistema imune inato é organizado por processos complexos que envolvem os diversos tipos celulares que culminam na eliminação de uma variedade de microorganismos a fim de proteger o organismo de infecções. Os neutrófilos são células importantes neste sistema, sendo capazes de migrar rapidamente ao foco da infecção. Estas células reconhecem e fagocitam partículas estranhas e atuam no sentido de elimina-los através da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), proteínas antimicrobianas e enzimas proteolíticas dos grânulos, que são liberadas no fagossomo e no espaço extracelular. Entretanto, em algumas doenças inflamatórias e autoimunes têm sido encontradas lesões nos tecidos envolvendo a produção excessiva de EROs pelos neutrófilos, desencadeada por imunocomplexos (ICs) via receptores Fc gama (Fc γ) e de complemento (CR). Assim, a modulação da ativação destes receptores e da produção de EROs é importante na manutenção da homeostasia. Nas últimas décadas, flavonóides são considerados como metabólitos secundários promissores mostrando atividade antioxidante e imunomodulatória. Neste trabalho foi avaliado o efeito modulatório dos flavonóides galangina, kaempferol, quercetina e miricetina em algumas funções efetoras de neutrófilos humanos, como o metabolismo oxidativo estimulado via receptores de membrana Fc γ e/ou CR, fagocitose e atividade microbica, além do efeito citotóxico, antioxidante e inibitório dessas substâncias sobre a atividade das enzimas mieloperoxidase (MPO) e NADPH oxidase. Os flavonóides analisados mostraram um efeito modulatório negativo no metabolismo oxidativo dos neutrófilos humanos na seguinte ordem: galangina> kaempferol> quercetina > miricetina. Embora a galangina tenha exercido maior atividade, sua ação antioxidante e inibitória na atividade das enzimas MPO e NADPH oxidase foi a menos efetiva dentre os flavonóides avaliados. Além disso, esta substância inibiu de maneira mais acentuada a resposta celular mediada por ambos os receptores Fc γ e CR quando comparado a estimulação destes receptores individualmente. As substâncias contendo o grupo catecol, quercetina e miricetina mostraram elevada eficiência na inibição da atividade das enzimas NADPH oxidase e MPO, e na redução do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH). De maneira geral, os flavonóides não interferiram no processo fagocítico e no mecanismo microbica, e não induziram toxicidade e morte celular por apoptose ou necrose. Os resultados apresentados neste trabalho mostram uma possível aplicação destes flavonóides como fármacos de origem natural em doenças inflamatórias que apresentem acúmulo de neutrófilos, sendo uma ferramenta promissora para o tratamento efetivo destas doenças.

Palavras chave: Neutrófilos, flavonóides, fagocitose, imunocomplexo, metabolismo oxidativo.

1- INTRODUÇÃO

1.1 Histórico dos leucócitos polimorfonucleares

As descobertas científicas entre os séculos 19 e 20 aumentaram significativamente o entendimento dos processos de defesa do hospedeiro, conduzindo a importantes avanços na prática médica. Durante este período, foram propostos mecanismos para esclarecer a marginação leucocitária nos vasos sanguíneos, a migração dos leucócitos ao local da inflamação (diapedese) e o processo de fagocitose, assim como houve o desenvolvimento de técnicas para contagem celular e, conseqüentemente, a definição de leucopenia (diminuição de leucócitos), de neutropenia (diminuição de neutrófilos), entre outras (DAILE et al., 2008). Estes avanços científicos permitiram observar, que a função dos fagócitos na defesa do hospedeiro contra microorganismos envolve uma série de etapas: produção e distribuição destas células na circulação sanguínea em quantidade adequada pela medula óssea; sua migração do sangue para os tecidos afetados; sua interação com a partícula estranha e posterior fagocitose, culminando com os eventos pós-fagocitose que conduzem à morte e digestão da partícula ingerida e, finalmente, a apoptose do neutrófilo (ZAKHIREH et al., 1979; THEILGAARD-MONCH et al., 2006).

1.2 Características do neutrófilo

Os neutrófilos são abundantes na corrente sanguínea e considerados a primeira linha de defesa do sistema imune do organismo contra patógenos, devido às atividades específicas como aderência ao endotélio vascular, quimiotaxia ao sítio inflamatório, fagocitose, desgranulação e morte dos microorganismos. Estes processos estão envolvidos em sua função de identificar, ingerir e eliminar os microorganismos (ZHONG et al., 2003; HENSON, 2005; LUO et al., 2007; HARTL et al., 2008).

Os neutrófilos são produzidos na medula óssea, e esta produção é induzida pelo fator estimulador de colônia de granulócitos, sendo que seres humanos adultos produzem mais de 1×10^{11} neutrófilos por dia e o tempo de vida desta célula na circulação é de aproximadamente 6 horas. Estas células são esféricas e apresentam tamanho de 12 a 15 μm de diâmetro com numerosas projeções de membrana, tendo o seu núcleo segmentado de três a cinco lóbulos (ABBAS et al., 2005).

1.2.1 Grânulos

Durante o processo de maturação do neutrófilo ocorre a formação de grânulos intracelulares que são classificados em primários (ou azurófilos), secundários (ou específicos), terciários (com alta concentração de gelatinase) e vesículas secretórias, cujos componentes (Tabela 1) estão relacionados à morte intracelular de microorganismos. Além da função microbicida, as enzimas e os peptídeos contidos nos grânulos de neutrófilos também desempenham uma variedade de funções regulatórias em processos inflamatórios (ELGHETANY, 2002; FAURSCHOU et al., 2003; LEVY, 2004; MEYER-HOFFERT, 2005; BORREGAARD et al., 2007).

Estes grânulos constituem um importante reservatório, pois além de armazenar proteínas antimicrobianas, proteases e componentes da NADPH oxidase (atividade microbicida), possuem também uma variedade de receptores de membrana para moléculas de adesão endotelial, proteínas de matriz endotelial e mediadores solúveis da inflamação (FAURSCHOU et al., 2003).

Os diferentes grânulos dos neutrófilos, contendo proteínas antimicrobianas, podem liberar seu conteúdo no fagossomo ou no meio extracelular. A exocitose dos grânulos envolve uma seqüência de eventos cuidadosamente orquestrada, que é importante para a eficiência da resposta inflamatória, prevenindo ou resolvendo lesões teciduais (FAURSCHOU et al., 2003).

Os neutrófilos possuem ação eficiente, devido a constituição destes grânulos previamente armazenados. Dentre as várias proteínas presentes, as de relevância neste estudo são as enzimas NADPH oxidase e mieloperoxidase (MPO). Ambas estão envolvidas no processo do metabolismo oxidativo celular, responsável pela produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) que irão culminar na morte do patógeno (ARNHOLD et al., 1999).

1.2.1.1 NADPH oxidase

Os neutrófilos possuem o complexo enzimático NADPH oxidase, o qual apresenta subunidades citoplasmáticas e de membrana, além de um centro redutor que transfere elétrons do doador de elétrons NADPH, gerando radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet -}$) no espaço extracelular ou fagossomal (DAHLGREN e KARLSSON., 1999; ROOS et al., 2003; SHEPPARD et al., 2005; EL-BENNA.; et al, 2008).

1.2.1.1.1 Componentes citoplasmáticos

As subunidades citoplasmáticas da NADPH oxidase são representadas pelas oxidases de fagócitos (^{phox}) p47^{phox}, p67^{phox} e p40^{phox} e Rac-2. Estas subunidades estão complexadas, com exceção da proteína Rac-2 que quando ligada a GDP atua como inibidor da translocação (FAURSCHOU., et al., 2003; ROOS., et al, 2003; SHEPPARD., et al, 2005; BORREGAARD., et al., 2007).

As subunidades citoplasmáticas nas células em repouso permanecem dormentes Após ativação celular por ligação de estímulos aos receptores específicos, ocorre fosforilação dos resíduos de serina presentes na subunidade p47^{phox}, que transporta o complexo citosólico para as proteínas de membrana, formando o complexo enzimático na forma ativa (Figura 1-A). A regulação deste processo envolve interações proteína-proteína e fosforilações (WIEN TJES, 1996; PARK., et al., 1997; GROEMPING., et al., 2005; EL-BENNA et al., 2008).

1.2.1.1.2 Componentes de membrana

Os componentes de membrana da NADPH oxidase são encontrados tanto na membrana plasmática como na membrana dos grânulos específicos, de gelatinase e das vesículas secretórias (tabela 1), consistindo nas subunidade p22^{phox} (subunidade α), gp91^{phox} (subunidade β) e Rap1, além da flavina adenina dinucleotídeo (FAD) que serve como sítio de ligação para NADPH e dois grupos prostéticos heme, um que se liga seletivamente a gp91^{phox} e outro que interage com a gp91^{phox} e p22^{phox}. (FAURSCHOU et al., 2003; ROOS., et al, 2003; SHEPPARD., et al, 2005; BORREGAARD., et al., 2007).

A ligação da gp91^{phox} e da p22^{phox} origina o heterodímero citocromo b558, que é uma flavohemoproteína ligada à membrana, com a função de transferir elétrons através da membrana para o fagossomo ou para o espaço extracelular (figura 1-B) (SHEPPARD., et al, 2005). Os neutrófilos em repouso possuem de 60-70% do flavocitocromo b558 localizados na membrana dos grânulos específicos, 20-25% na membrana dos grânulos de gelatinase e o restante está presente na membrana plasmática e vesículas secretórias (EL-BENNA., et al, 2008).

O interesse na descoberta de inibidores específicos desta enzima é importante para obter informações a respeito do seu funcionamento e também para encontrar agentes que modulem sua atividade (JAQUET et al., 2009). Compostos naturais têm sido considerados como possíveis inibidores da NADPH oxidase para uso clínico e isto é importante em

algumas condições patológicas para prevenir a formação de EROs (GUZIK e GRIENDLING, 2009).

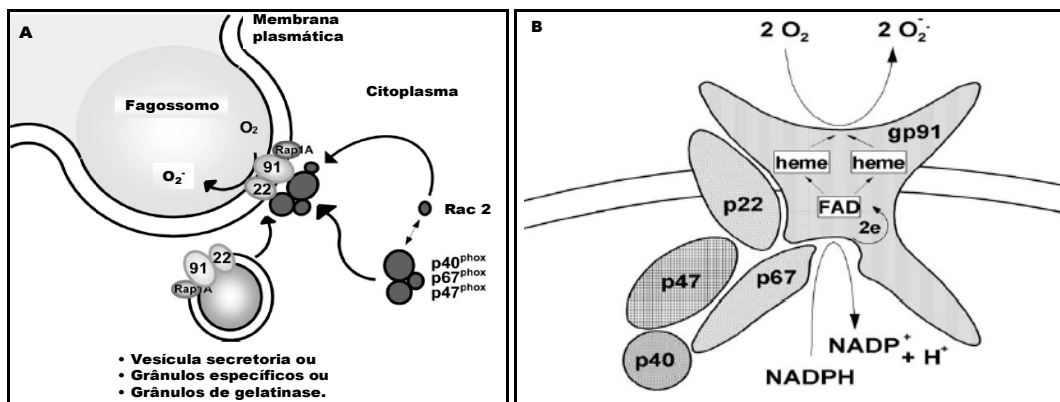


Figura 1: Esquema representativo da localização dos componentes e ativação da NADPH oxidase. **A:** Ativação da NADPH oxidase, formação do fagossomo e reunião dos componentes da NADPH oxidase citosólicos: (p47^{phox}, p40^{phox}, p67^{phox} e Rac2) e de membrana (gp91^{phox}, p22^{phox} e Rap1A). Os componentes citosólicos estão complexados, com exceção do complexo Rac2. As subunidades de membrana são encontradas na membrana plasmática e na membrana dos grânulos. **B:** Mecanismo de transferência de elétrons após migração dos componentes citosólicos até as subunidades na membrana plasmática e granular. O NADPH do citosol liga-se à enzima e doa seus elétrons, os quais são transferidos para o oxigênio molecular através do FAD e grupos heme, gerando ânion superóxido no fagossomo ou no meio extracelular. Adaptado de Roos et al., (2003).

1.2.1.2 Mieloperoxidase (MPO)

A enzima MPO aumenta a eficiência da ação microbicida de neutrófilos, produzindo ácido hipocloroso (HOCl) através da utilização de íons cloreto (Cl⁻) e H₂O₂, este último oriundos da ação da superóxido dismutase (SOD) sobre o O₂⁻ proveniente da NADPH oxidase. Esta enzima é uma proteína catiônica sintetizada durante a diferenciação mielóide na medula óssea, está presente no interior dos grânulos primários azurófilos (Tabela I) de neutrófilos e monócitos (KETTLE et al., 1993; ROMAN et al., 2007; GUILPAIN et al., 2008).

O sítio ativo desta enzima apresenta uma molécula de ferro no estado férrico (Fe³⁺) localizado no interior de uma fenda adequada para passagem de H₂O₂ e pequenos íons, e sua ação catalítica gera ao menos três intermediários redox como mostra a figura 2 (BOLSCHER, 1984; ZENG et al., 1992; VAN DER VEEN et al., 2009).

O primeiro intermediário é o composto I, formado a partir da reação de H₂O₂ com a forma férrica (MPO³⁺) da enzima. Este intermediário pode ser convertido para o estado MPO³⁺ através da redução de 2 elétrons (ē) por haletos (Cl⁻), sendo esta nomeada ciclo da

halogenação. Ainda podem ocorrer duas reduções sequenciais por compostos doadores de e^- : na primeira o composto I é reduzido a composto II; na segunda etapa, o composto II é reduzido, permitindo assim que a enzima retome o estado MPO^{3+} , sendo esta etapa denominada de ciclo da peroxidase. Além destes intermediários podem-se obter o composto III através da reação do composto II com o H_2O_2 , ou da MPO^{3+} com $O_2^{\cdot-}$; porém, o composto III na presença de $O_2^{\cdot-}$ poderá regenerar a enzima para o estado MPO^{3+} (HAMPTON et al, 1998; DAVIES et al, 2008).

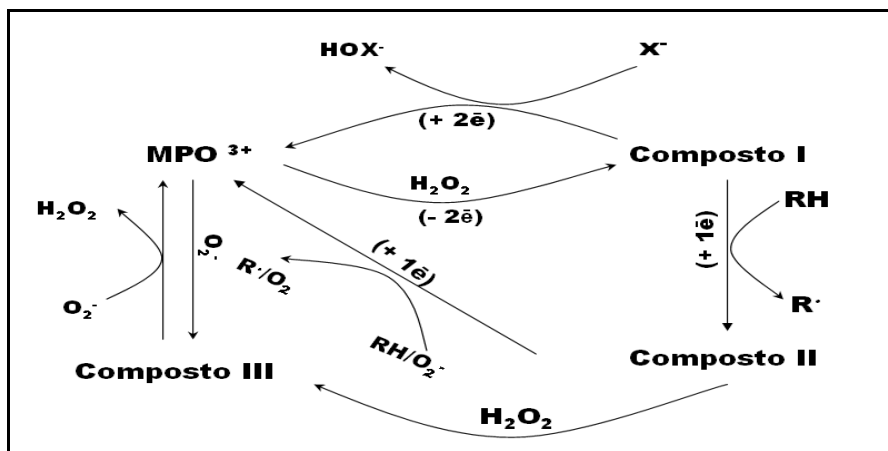


Figura 2: Reações da mieloperoxidase. MPO^{3+} : Mieloperoxidase férrica; RH: substratos orgânicos; X⁻: halogênio; HOX⁻: ácido hipohaloso. Adaptado de Hampton et al. (1998) e Davies et al. (2008)

Além destas funções na eliminação de patógenos, esta enzima tem demonstrado envolvimento em inúmeros processos inflamatórios, promovendo ativação e inativação de proteínas secretadas pelos neutrófilos, inativação de toxinas e de mediadores inflamatórios (FORMAN et al., 1986; HAMPTON et al., 1998; WINTERBOURN et al., 2000; ROMAN et al., 2007).

Tabela 1 – Principais componentes dos grânulos dos neutrófilos

Grânulos azurófilos	Grânulos específicos	Grânulos de gelatinase	Vesícula secretória
CD63, CD68	CD11b/CD18, CD66	CD11b/CD18, CD66	CD11b/CD18, CD66
Preseñilin	CD67	CD67	CD67, CD10, CD13
Ácido β glicerofosfatase	Estomatina	gp91 ^{phox} /p22 ^{phox}	CD14, CD16, CD45
Ácido mucopolissacarídeo	fMLP-R	fMLP-R	CR1
α_1 -antitripsina	Fibronectina -R	SCAMP, SNAP 23	C1q-R
α manosidase	gp91 ^{phox} /p22 ^{phox}	uPA-R	DAF
Azurocidina	Rap1, Rap2	VAMP-2	Fosfatase alcalina
BPI	Subunidade α proteína G	Acetiltransferase	fMLP-R
β glicerofosfatase	SCAMP, SNAP 23	β_2 Microglobulina	gp91 ^{phox} /p22 ^{phox}
β Glicuronidase	TNF-R	CRISP-3	Leucolisina
Catepsinas	Trombospondina-R	Gelatinase	Proteínas do plasma
Defensinas	uPA-R	Lisozima	
Elastase	Vitronectina-R		
Lisozima	VAMP-2		
MPO	β_2 Microglobulina		
Proteinase -3	Cistatina C, Cistatina F		
Ubiquitina	Colagenase		
	CRISP-3		
	Gelatinase		
	Heparinase		
	Histaminase		
	Lactoferrina		
	Lisozima		
	NGAL		
	Sialidase		
	Transcobalamina-I		
	uPA		

Faurschou et al., (2003); Borreggard et al., (2007)

1.2.2 Receptores

Os fagócitos reconhecem os patógenos diretamente e iniciam uma resposta inflamatória e antimicrobiana, através de receptores que desencadeiam fagocitose e morte do patógeno (UNDERHILL, 2007). Os receptores para o fragmento cristalizável (Fc) da imunoglobulina de classe G (IgG) e os receptores para proteínas do complemento (CR) são os dois principais grupos envolvidos na ativação de neutrófilos nos sítios inflamatórios (JAKUS et al., 2009). A estimulação e cooperação funcional destes receptores estimula a fagocitose, a liberação de mediadores inflamatórios e a geração de EROs (PRICOP et al., 1999; HIRAHASHI et al., 2006).

1.2.2.1 Receptores de complemento

O sistema complemento é essencial na resposta imune inata contribuindo para a eliminação de ICs, fagocitose, lise de membranas e mobilização de células imunes inflamatórias através das anafilotoxinas C3a, C4a e C5a (LEE, 2008). Este sistema é ativado por interações entre as diversas proteínas que o constitui, através de um mecanismo de cascata, e sua ativação pode ocorrer por quatro vias diferentes: via clássica, via alternativa, via da lectina (HOMEISTER et al., 1994) e uma via recém descoberta, a via da protease extrínseca (HUBER-LANG et al., 2006).

A elucidação da função dos receptores de complemento (CR) tem sido realizada após a descoberta de pacientes com defeitos na expressão de CD11/CD18. Os leucócitos destes pacientes não podem aderir ao endotélio ou mediar a fagocitose de partículas opsonizadas com complemento, desta maneira estes pacientes sofrem de infecções recorrentes (EDWARDS, 1995).

Existem quatro tipos de receptores CR (CR1, CR2, CR3 e CR4), sendo compostos por dímeros com uma subunidade comum (CD18) e outra subunidade variável (CD11 a, b, c, d) (HIRAHASHI et al., 2006). O CR1 (CD11b/CD18) ou CD35 é um receptor de alta afinidade para C3b e C4b presente nos neutrófilos que o utilizam para se ligar a partículas opsonizadas com fragmentos do complemento e internalizá-las, após a ativação celular e transdução de sinal são desencadeados os mecanismos microbicidas. O CR2 ou CD21 estimula as respostas imunes humorais, é encontrado nos linfócitos B, e reconhece os fragmentos C3b e iC3b. O CR3, também chamado de MAC-1 liga-se ao fragmento C3bi, sendo composto por subunidade- α (CD11b) e subunidade β (CD18). Este receptor é expresso na superfície de neutrófilos e em outras células do sistema imune, como fagócitos mononucleares, mastócitos e células NK. O CR4 (CD11c/CD18) possui a porção α diferente, por isso é chamado CD11c e, a mesma cadeia β que o MAC-1, também se liga ao C3bi e acredita-se que a função deste receptor seja semelhante à do CR3. Estes receptores são encontrados em neutrófilos, fagócitos mononucleares e células NK (ABBAS et al., 2005).

Ambos os receptores, CR1 e CR3, associam-se com os fragmentos C3b/C3bi do sistema complemento, e estão expressos nos neutrófilos, sendo que o CR3 representa um importante ligante para iC3b nestas células (EDWARDS, 1995; ROTHER et al., 1998). A expressão de CR3 na superfície do neutrófilo pode ser aumentada rapidamente através da exocitose dos grânulos intracelulares em resposta a vários estímulos. A expressão de CR3 na superfície facilita a fagocitose de partículas opsonizadas com C3bi, bem como o recrutamento de neutrófilos ao sítio da inflamação (O'SHEA et al., 1985; HED et al., 1988; ROTHER et al., 1998).

1.2.2.2 Receptores Fc – gama

Os receptores Fc gamma (Fc γ R) são glicoproteínas de membrana, descritas há mais de 30 anos em humanos. Todos os Fc γ R diferem quanto à distribuição celular, função e afinidade por isotipos de IgG (DAËRON, 1997; SCHMIDT e GESSNER, 2005). Estes receptores pertencem à superfamília das imunoglobulinas, e a as três principais classes identificadas são: Fc γ RI (CD64), expresso em monócitos e macrófagos, podendo ser induzido em neutrófilos; Fc γ RII (CD32), receptor amplamente distribuído entre as células, compreendendo as subclasses Fc γ RIIIa e Fc γ RIIIb; e Fc γ RIII (CD16), altamente glicosilado, liga-se a IgG na forma de imunocomplexo, e pode ser dividido nas duas subclasses: Fc γ RIIIa, que é o receptor de células NK, e Fc γ RIIIb, um receptor ligado por âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI) em neutrófilos. Os receptores Fc γ RII e Fc γ RIII reconhecem IgG previamente complexada ao antígeno multivalente, ou seja, na forma de imunocomplexo (ICs) (DAËRON, 1997; BROOKS et al., 1989; SELVARAJ et al., 1988).

Os Fc γ R são importantes mediadores da ligação entre a imunidade humoral e a celular, desencadeando respostas tais como: citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC), liberação de metabólitos tóxicos de oxigênio, fagocitose, desgranulação e liberação de mediadores inflamatórios (DAËRON, 1997; SCHMIDT e GESSNER, 2005; NIMMERJAHN, 2006). Os Fc γ R reconhecem a porção Fc (fragmento cristalizável) da imunoglobulina de classe G (IgG), sendo importantes reguladores da resposta imune em doenças auto-imunes, constituído de receptores de ativação e inibição os quais se ligam à mesma porção Fc da IgG (DAËRON, 1997; SCHMIDT et al., 2005).

Os neutrófilos expressam as classes de receptores transmembrana Fc γ RIIIa (CD32) e Fc γ RIIIb (CD 16). A primeira é que é uma glicoproteína de MM igual a 40kDa expressa em baixa densidade, (20.000 – 40.000 cópias/célula) que possui um motivo de ativação de tirosina (ITAM) no domínio intracelular. O Fc γ RIIIb (CD16) também é uma glicoproteína com MM igual 50-70 kDa, sendo expresso em alta densidade (100.000-300.000 cópias/célula) e não possui uma região terminal citoplasmática, estando inserida na membrana por meio de uma ancora de glicosil fosfatidilinositol (GPI) (RETH, 1989; DAERON, 1997; VAN DE WINKEL et al., 1993).

1.3 Funções

Como já mencionado os neutrófilos são as primeiras células a alcançar o local da inflamação, através de múltiplas etapas, envolvendo adesão inicial dos neutrófilos circulantes ao endotélio vascular ativado, com o subsequente extravasamento (diapedese) e migração ao foco inflamatório (quimiotaxia), onde auxilia na eliminação dos microorganismos através de fagocitose, produção de EROs e liberação de substâncias microbicidas (FAURSCHOU et al., 2003).

1.3.1 Fagocitose e atividade microbicida

Os neutrófilos mostram uma característica importante durante o processo de fagocitose, que é o aumento do consumo de oxigênio ou “burst” respiratório, sendo a enzima NADPH oxidase a responsável por este evento (SHEPPARD et al., 2005). Esta enzima tem a característica bioquímica de produzir EROs, sendo este um importante mecanismo de defesa de fagócitos, porém a exacerbação desta função faz desta enzima uma fonte de estresse oxidativo em muitas doenças (JAQUET et al., 2009; GUZIK e GRIENGLING, 2009). O FAD e o grupo heme contidos no citocromo b558 executa a transferência de elétrons sequencialmente (figura 1) da NADPH, formada a partir da oxidação da glicose no ciclo metabólico da hexose monofosfato do citosol para a membrana plasmática, e doa este elétron para o oxigênio molecular no interior do fagossomo ou no meio extracelular, gerando o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) utilizado como substrato para a formação de outros produtos tóxicos, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (SHEPPARD et al., 2005; JAQUET et al., 2009).

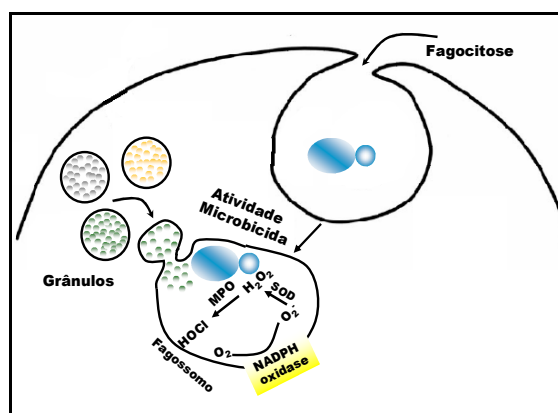


Figura 3: Fagocitose e atividade microbicida de neutrófilos. Após a fagocitose, o microorganismo é internalizado e eliminado por EROs e proteínas antimicrobianas liberadas dos grânulos. Adaptado de Kennedy e DeLeo, 2008.

As EROs geradas pelo sistema NADPH oxidase podem não ser suficientes para matar os microrganismos, assim, os grânulos azurófilos dos neutrófilos contendo MPO são liberados através da desgranulação, e esta enzima catalisa a oxidação de íons haleto (Cl^- , Br^- , I^-) e tiocianato (SCN^-) para ácidos hipohalosos, utilizando H_2O_2 como substrato. O HOCl é o principal produto, devido à elevada concentração de Cl^- nos fluidos corporais. HOCl é um potente antimicrobiano que atua nos microrganismos por halogenação ou pela oxidação de proteínas e lipídios (PULLAR et al., 2000; BABIOR, et al., 2002).

1.3.2 Apoptose

A apoptose é o mecanismo pelo qual a célula promove a sua autodestruição de maneira programada e não inflamatória, através de processos intracelulares altamente regulados, como a ativação de enzimas que degradam seu DNA nuclear e as proteínas citoplasmáticas (KUMAR et al., 2005).

Os neutrófilos podem sofrer apoptose constitutiva ou espontânea (ausência de estímulos) para manter a homeostase do sistema imune. Este mecanismo de morte provoca a diminuição das funções celulares, sendo caracterizado por perda dos grânulos citoplasmáticos, condensação da cromatina, núcleo picnótico, entre outras (VAN DEN BERG et al., 2001; KENNEDY e DELEO, 2008).

A apoptose ocorre através de vias sinalizadoras que ativam um conjunto de proteases intracelulares chamadas caspases, que levam à essa série de mudanças morfológicas e bioquímicas sofridas pelas células (LEIST, 2001). Esta ativação pode ocorrer por duas vias distintas, a intrínseca, como na apoptose espontânea (intracelular) envolvendo EROs, e a extrínseca (extracelular), ativada pelo fator de necrose tumoral ($\text{TNF-}\alpha$) ou pela ligação de Fas ao seu receptor específico (Figura 4) (KENNEDY e DELEO, 2008).

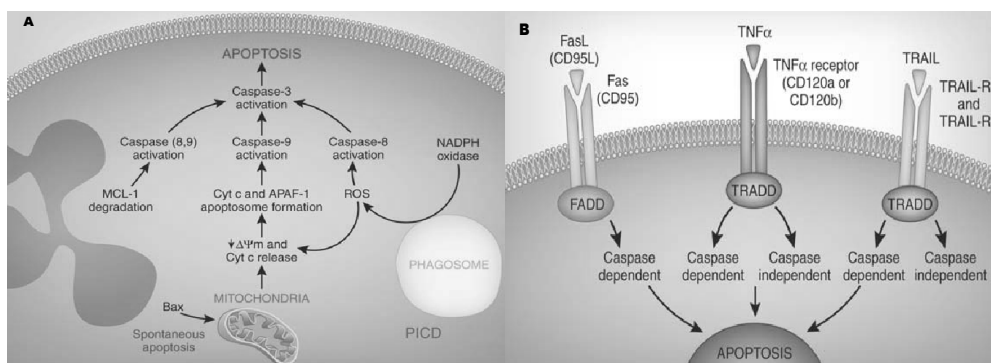


Figura 4: Mecanismo de apoptose de neutrófilos. A: Via apoptótica intrínseca resultando em sinal intracelular. B: Via extrínseca originada por sinais extracelulares (KENNEDY e DELEO, 2008).

Posteriormente à fagocitose, os neutrófilos sofrem apoptose, sendo eliminados por macrófagos e fornecendo condições para a resolução da inflamação sem a liberação de compostos citotóxicos que causariam danos aos tecidos (KROEMER, 1998; KENNEDY e DELEO, 2008).

No sistema imunológico, a apoptose dos neutrófilos é o principal mecanismo de controle da intensidade da resposta inflamatória, bem como da lesão tecidual que pode ser causada pela permanência prolongada destas células ativadas no local da inflamação (KIN, 2004).

A apoptose tipicamente é observada por detecção de degradação do DNA, ativação da caspase e exposição de fosfatidilserina na superfície da membrana (SAVILL, 1997; KENNEDY e DELEO, 2008).

1.4 Doenças que envolvem a participação de neutrófilos

A destruição de microrganismos pelos neutrófilos após a fagocitose é mediada principalmente pelo desencadeamento do seu metabolismo oxidativo com a produção EROs, seguido da desgranulação com liberação de enzimas lisossomais (SOEHNLEIN et al., 2007). Em algumas doenças ocorre o acúmulo destas células, as quais na presença de ICs depositados no tecido e proteínas do sistema complemento, promovem a estimulação excessiva destes leucócitos via receptores Fc γ e CR, gerando EROs que são liberadas para o meio extracelular, promovendo lesão tecidual (NATAN, 2006; JAKUS et al., 2009). O aumento de EROs estabelece um desequilíbrio celular entre a quantidade de oxidantes e antioxidantes, denominado estresse oxidativo, que está presente em doenças inflamatórias crônicas, como a artrite reumatóide (AR) (SOLOMON et al., 2005; VALKO, 2007; FILIPPIN et al., 2008).

A procura por medicamentos de origem vegetal tem conduzido a um renovado interesse farmacêutico pelos flavonóides (HOULT et al., 1996). Várias formas de terapias antioxidantes têm sido propostas em modelos experimentais de artrite. Flavonóides extraídos do chá verde preveniram o desenvolvimento de artrite induzida por colágeno; por outro lado, outro estudo mostrou que a ingestão oral de vitamina E não foi efetiva em bloquear o desenvolvimento da doença, mas apresentou efeito analgésico (HAQQI et al., 1999; HITCHON et al., 2004).

Deste modo, temos que a modulação destes processos por substâncias naturais é alvo terapêutico potencial para o tratamento da AR, além de outras doenças como o lúpus eritematoso sistêmico (RAHMAN, et al., 2006).

1.5 Produtos naturais

Produtos naturais derivados de animais, plantas e microorganismos estão sendo investigados e utilizados para prevenir ou tratar doenças desde o início da história humana. Estas substâncias apresentam características como diversidade química, especificidade bioquímica, entre outras propriedades moleculares que favorecem à descoberta de novos fármacos à partir destes compostos (WILLIAMS et al., 1989; KOEHN e CARTER, 2005).

A química dos produtos naturais envolve o estudo de biossíntese, isolamento, determinação da estrutura, investigação das propriedades biológicas e, por fim, a produção em grande escala. Desta maneira, o estudo da química dos produtos naturais é importante para outras disciplinas como, por exemplo, a farmacologia, onde se avalia por ensaios biológicos a ação destas substâncias com estruturas químicas definidas para a seleção de novos compostos com ação terapêutica (BRAZ-FILHO, 1999; KOEHN e CARTER, 2005; MCCHESENEY et al., 2007).

1.5.1 Flavonóides

1.5.1.1 Biossíntese e estrutura

O termo flavonóides relaciona-se com pigmentos vegetais e representa uma classe de substâncias amplamente distribuídas na natureza. Qualitativamente e quantitativamente, os flavonóides representam um dos maiores grupos de produtos naturais conhecidos, e são definidos como compostos que têm núcleo aromático com substituintes hidroxilados e/ou derivados funcionais (HELLER et al., 1986; HAVSTEEN, 2002; RAHMAN et al., 2006).

Estes compostos apresentam estrutura comum de três anéis (A, C e B) constituindo um esqueleto difenilpropano (C₆-C₃-C₆), sendo dois anéis benzênicos (anel A e B) ligados através de um heterocíclico com uma dupla ligação (anel C) (FORMICA et al., 1995). A biossíntese do anel A ocorre a partir da condensação de malonil-coenzima A (CoA), e os anéis C e B pela via do ácido chiquímico, ambos originados do metabolismo da glicose (MIDDLETON et al., 2000; HAVSTEEN, 2002; CROZIER et al., 2009).

Estes compostos apresentam intrínseca variação estrutural devido a diferenças estruturais no anel aglicona e no seu estado de óxido-redução; diferenças no número e posicionamento de hidroxilas; e por fim, diferenças na derivação dos grupos hidroxila, como exemplo a presença de grupos metil, de carboidratos e de isoprenóides (MIDDLETON et al., 2000; HAVSTEEN, 2002; RAHMAN, et al., 2006).

1.5.1.2 Distribuição

Os flavonóides são amplamente distribuídos em bebidas e alimentos como cebola, couve, brócolis, maçã, vinho tinto e chá, no entanto, a galangina é um flavonol de ocorrência restrita, sendo encontrada somente na própolis (ASTILL et al., 2001; VINSON et al., 2001; LOTITO et al., 2004; BARRINGTON et al., 2009; CROZIER et al., 2009). As principais subclasses de flavonóides encontradas na dieta incluem flavonóis, flavonas, antocianinas, flavononas e isoflavonas (CROZIER et al., 2009).

Devido ao seu amplo espectro de ação em diversas doenças crônicas, há um intenso interesse em estudar os compostos fenólicos, sendo a sua atividade antioxidante dependente da estrutura química, do posicionamento dos grupos substituintes e do grau de hidroxilação (HU et al., 1995; VINSON et al., 2001; LOTITO et al., 2004; FURUSAWA et al., 2005; MOREIRA et al., 2007).

1.5.1.3 Atividades biológicas

Os flavonóides são compostos fenólicos com ações bioquímicas e farmacológicas, sugerindo que membros deste grupo de compostos podem inibir diversas enzimas incluindo hidrolases, óxido redutases, DNA sintetase, RNA polimerase, fosfatases, fosfoquinases e oxigenases (MIDDLETON, 2000; HAVSTEEN, 2002; GARCIA-LAFUENTE et al., 2009).

Diversos trabalhos têm mostrado que estes compostos possuem atividade antiinflamatória, antioxidante, antialérgica, hepatoprotetora, antitrombótica, antiviral e atividade anticarcinogênica (MIDDLETON et al., 2000; GARCIA-LAFUENTE et al., 2009).

1.5.1.3.1 Ação anticarcinogênica

A atuação dos flavonóides na inibição de angiogênese e proliferação tumoral foi apresentada em diversos estudos epidemiológicos (BENAVENTE-GARCIA e CASTILLO, 2008).

Os flavonóides podem atuar no desenvolvimento tumoral através de proteção de danos oxidativos ao DNA, inativação da carcinogênese, inibição da expressão de genes mutagênicos e ativação de sistema enzimáticos de detoxicação de xenobióticos (BENAVENTE-GARCIA e CASTILLO, 2008).

1.5.1.3.2 Ação cardiovascular

Estudos clínicos mostram que hipercolesterolemia e diabetes estão associados com o aumento da geração de EROs no sistema vascular, sugerindo que o estresse oxidativo está envolvido com a patofisiologia das doenças cardiovasculares. As EROs podem oxidar lipoproteínas de baixa densidade (LDL), que ingeridas por macrófagos originam as células espumosas, sendo estas um componente inicial na formação de placa aterosclerótica (ARAUJO et al., 2005; BENAVENTE-GARCIA e CASTILLO, 2008).

Diversos trabalhos epidemiológicos mostraram que a ingestão de flavonóides reduz o risco de problemas cardiovasculares através da prevenção de oxidação de LDL, vasodilatação coronariana e diminuição da agregação de plaquetas (BENAVENTE-GARCIA e CASTILLO, 2008).

1.5.1.3.3 Atividade antiinflamatória

O processo inflamatório é caracterizado por aumento da permeabilidade do endotélio e influxo de leucócitos no interstício, resultando em edema. A inflamação é uma resposta normal a um tecido lesionado, porém apresenta-se descontrolada em doenças crônicas auto-imunes, como artrite reumatóide e nestes casos, fármacos antiinflamatórios são administrados para redução deste processo. A utilização dos flavonóides como antiinflamatórios tem sido estudada em ensaios *in vivo* para futuramente estes compostos estarem disponíveis como medicamentos e com baixo custo (BENAVENTE-GARCIA e CASTILLO, 2008).

Alguns mecanismos têm sido propostos para explicar a ação antiinflamatória dos flavonóides, incluindo atividade antioxidante através do sequestro de radicais livres, regulação da atividade de células inflamatórias, modulação do metabolismo do ácido araquidônico, modulação da produção e expressão gênica de moléculas proinflamatórias (BENAVENTE-GARCIA e CASTILLO, 2008; GARCIA-LAFUENTE et al., 2009).

1.5.1.3.4 Interação com o sistema imune

Alguns flavonóides apresentam ações bioquímicas e farmacológicas que afetam a atividade de células imunes como linfócitos T e B, macrófagos, neutrófilos e mastócitos (GARCIA-LAFUENTE et al., 2009).

A sinalização celular é importante para as células executarem suas funções, e alguns flavonóides, como a quercetina têm modulado a produção de citocinas proinflamatórias através da supressão da atividade de componentes da sinalização como NF-kB, ERK, p38 MAPK em macrófagos; diminuição da produção de interleucina – 6 (IL-6) e, além disso,

outros flavonóides mostraram-se eficientes no tratamento de artrite reumatóide induzida por cristais (CHO et al., 2003; LIU et al., 2005; JACKSON et al., 2006).

A interação de flavonóides com sistemas celulares mostra que estes compostos podem modular a produção de EROs, além de outras funções, como a desgranulação e apoptose (SELLOUM et al., 2001; MOREIRA et al., 2007; RAMOS, 2007).

A ingestão de alimentos e bebidas contendo flavonóides tem grande importância na manutenção da homeostase, e este efeito benéfico ocorre através da sua interação com sistemas enzimáticos, proteínas e lipídios de sinalização (RAHMAN et al., 2006).

No entanto, ainda é necessário uma melhor compreensão de como estas substâncias são absorvidas no trato gastrointestinal e metabolizadas por sua microflora. Já foram detectados glicosídeos de quercetina, como a rutina (3-raminosil-glicosil – quercetina) no sangue, mas o possível mecanismo de absorção não é totalmente conhecido por falta de métodos analíticos com maior seletividade (HOLLMAN e KATEN, 1997). Estes pesquisadores propõem que o co-transportador de glicose-sódio, encontrado na parede do intestino, pode transportar o flavonóide que apresente moléculas de açúcar em sua estrutura. Andlauer et al. (2001) também confirmaram a absorção intestinal e detectaram a presença de o metabólitos de flavonóides glicosilados em ratos. Pesquisas ainda demonstram que a quercetina, quando absorvida pelo organismo, é eliminada lentamente, contribuindo significativamente para a defesa antioxidante do sangue (HOLLMAN e KATAN, 1997, 1999).

Ainda deve ser considerado que a administração de flavonóides em humanos, apresenta problemas que envolvem sua solubilidade, permeabilidade, estabilidade ou biotransformação antes de alcançar a circulação sistêmica (CROZIER et al., 2009). Para isto, caso se confirme o efeito biológico destes compostos, será necessário o uso da tecnologia farmacêutica para superar estas dificuldades e possibilitar o uso terapêutico.

6. CONCLUSÃO

O conjunto de resultados deste trabalho mostrou que os flavonóides apresentaram um efeito inibitório e dependente da concentração sobre o metabolismo oxidativo dos neutrófilos humanos quando ativados por ICs via diferentes receptores de membrana celular.

Estas substâncias modularam negativamente a atividade das enzimas NADPH oxidase e MPO, principais responsáveis pela produção de EROs em neutrófilos, embora não tenham mostrado interferência na atividade microbicida e na capacidade fagocítica dessas células. Além disso, a redução da produção de EROs pelos neutrófilos após o tratamento com os flavonóides não está relacionada com a morte celular por necrose ou apoptose.

A galangina foi o flavonóide que mostrou interferência significativa na cooperação dos receptores Fcγ e CR, e também apresentou melhor eficiência inibitória no metabolismo oxidativo dentre os flavonóides avaliados, embora tenha apresentado baixa eficiência na redução do radical livre DPPH e inibição da atividade da NADPH oxidase e MPO.

A NADPH oxidase, responsável pela etapa inicial da produção de EROs, foi inibida pela quercetina e miricetina de maneira eficiente. Outra enzima que sofreu modulação negativa por estas substâncias foi a MPO, que atua em etapas posteriores da produção de EROs pelos neutrófilos. A presença do grupo catecol nestas substâncias mostrou-se importante para a inibição enzimática e também para a atividade antioxidante.

A utilização dos flavonóides no tratamento de doenças envolvendo o acúmulo de neutrófilos poderá ser eficiente, já que os resultados apresentados mostraram que estas substâncias foram capazes de atuar nos sistemas relacionados com o metabolismo oxidativo dessas células estimuladas por ICs.

7. REFERÊNCIAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H. **Imunologia celular e molecular**. 5ª ed, Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

ADEREN, A. Phagocytosis and the inflammatory response. **J Infect Dis**, Chicago, v. 187, n.2, p. S340-345, 2003.

ANDLAUER, W.; STUMPF, C.; FURST, P. Intestinal absorption of rutin in free and conjugated forms. **Biochem. Pharmacol**, Oxford, v. 62, p. 369–374, 2001.

ARAÚJO, P. W. B.; JÚNIOR, L. J. Q.; VASCONCELOS, H. D.; ALMEIDA, J. R. G. S. Flavonóides e hipertensão. **Rev Bras Hipertens**. Ribeirão Preto, v.12, n.3, p. 188-189, 2005.

ARNHOLD, J.; BENARD, S.; KILIAN, U.; REICHI, S.; SCHILLER, J.; ARNOLD, K. Modulation of luminol chemiluminescence of fMet-Leu-Phe stimulated neutrophils by affecting dephosphorylation and the metabolism of phosphatidic acid. **Luminescence**, Chichester, v. 14, p. 129-137, 1999.

ASTILL, C.; BIRCH, M.R.; DACOMBE, C.; HUMPHREY, P.G.; MARTIN, P.T. Factor affecting the caffeine and polyphenol content of black and green tea infusions. **J.Agric. Food Chem**. Washington, v.49, p.5340-5347, 2001.

BABIOR, B.M.; LAMBETH, J.D.; NAUSEEF, W. The neutrophil NADPH oxidase. **Arch Biochem Biophys**, New York, v. 397, p. 342, 2002.

BARRINGTON, R.; WILLIAMSON, G.; BENNETT, R. N; BARRY, D.D.; BRODBELT, J. S.; KROON, P. A. Absorption, conjugation and efflux of the flavonoids, kaempferol and galangin, using the intestinal CaCo-2/Tc7 cell model. **Journal of functional foods**. London, v.1, p. 74-87, 2009.

BENAVENTE-GARCIA, O.; CASTILLO, J. Update on uses and properties of *citrus* flavonoids: New findings in anticancer, cardiovascular, and anti-inflammatory activity. **J. Agric. Food Chem**. Washington, v. 56, p. 6185-6205, 2008.

BLOIS, M.S. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. **Nature**. New York, v.181, p.1199-1200, 1958.

BOLSCHER, B.G.; WEVER, R. A kinetic study of the reaction between human mieloperoxidase, hydroperoxidase and cyanide: inhibition by chloride and thiocyanate. **Biochim Biophys Acta**. Amsterdam, v. 788, p.1-10, 1984.

BORREGAARD, N.; SORENSEN, O.E.; THEILGAARD-MÖNCH, K. Neutrophils granules: a library of innate immunity proteins. **TRENDS in immunology**. Oxford, v.28, n.8, p.340-345, 2007.

BRAZ-FILHO, R.; Brazilian phytochemical diversity: bioorganic compounds produced by secondary metabolism as a source of new scientific development, varied industrial applications and enhance human health and the quality of life. **Pure Appl. Chem**, London, v.71.; n.9.; p.1663-1672, 1999.

BROOKS, D.G.; QIU, W.Q.; LUSTER, A.; RAVETCH, J.V. Structure and expression of human IgG FcRII (CD32). Functional heterogeneity is encoded by the alternatively spliced products of multiple genes. **J. Exp. Med.**, New York, v. 170, p. 1369-1385, 1989.

BURDA, S.; OLESZEK, W. Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. **J. Agric. Food Chem.**, Washington, v. 49, p. 2774-2779, 2001.

CHANCE, B.; WILLIAMS, G.R. The respiratory chain and oxidative phosphorylation. **Advances in enzymology.** New York, v.17, p.65-134, 1956.

CHO, S. Y.; PARK S. J.; KWON, M. J.; JEONG, T. S.; BOK, S. H., CHOI, W. Y.; JEONG, W. I.; RYU, S. Y.; DO, S. H.; LEE, C. S.; SONG, J. C.; JEONG, K. S. Quercetin suppresses proinflammatory cytokines production through MAP kinases and NF- κ B pathway in lipopolysaccharide-stimulated macrophage. **Molecular and Cellular Biochemistry**, The Hague, v. 243, p. 153–160, 2003.

CLARCK; SHEPARD, A. Dialysis technique for preparing fluorescent antibody. **Virology.**, New York, v. 20, p.642-644, 1963.

CROZIER, A.; JAGANATH, I. B.; CLIFFORD, M. N. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. **Nat. Prod. Rep.**, London, v. 26, p. 1001–1043, 2009.

COSTA, M.; XIMENES, V. F.; FONSECA, L. M. Hypochlorous Acid Inhibition by Acetoacetate: Implications on Neutrophil Functions. **Biol. Pharm. Bull.**, Tokyo, v. 27, n. 8, p. 1183-1187, 2004.

DALE, D.C.; BOXER, L. LILES, W.C. The phagocytes: neutrophils and monocytes. **Blood.**, New York, v.112, n. 4, p.935-945, 2008.

DAERON, M. Fc receptor biology. **Annu Rev Immunol**, Palo Alto, v.15, p.203-234, 1997.

DAHLGREN, C.; KARLSSON, A. Respiratory burst in human neutrophils. **Journal of Immunological Methods.** Amsterdam, v. 232, p.3-14, 1999.

DARZYNKIEWICZ, Z.; JUAN, G.; LI, X.; GORCZYCA, W.; MURAKAMI, T.; TRAGANOS, F. Cytometry in cell necrobiology: Analysis of apoptosis and accidental cell death (Necrosis). **Cytometry**, New York, v. 27, p.1-20, 1997.

DAVIES, M.J.; HAWKINS, C.L.; PATTISON, D.I.; REES, M.D. Mammalian Heme Peroxidases: From Molecular Mechanisms to health Implications. **Antioxidants & Redox Signaling**, Larchmont, v.10, n.7,p.1199-1234, 2008.

DEREVIANKO, A.; D'AMICO, R.; GRAEBER, T.; KEEPING, H.; SIMM, H. H. Endogenous PMN-derived reactive oxygen intermediates provide feedback regulation on respiratory burst signal transduction. **J. Leukoc. Biol.**, New York, v. 62, p. 268-276, 1997.

EDWARDS, S.W. Cell signaling integrins and immunoglobulin receptors in primed neutrophils. **Trends in Biochemical Sciences.** Amsterdam, v.20, n.9, p.362-367, 1995.

- EL-BENNA, J.; DANG, P. M. C.; GOUGEROT-POCIDALO M. A. Priming of the neutrophil NADPH oxidase activation: role of p47phox phosphorylation and NOX2 mobilization to the plasma membrane. **Semin Immunopathol**, Berlin, v. 30, p. 279–289, 2008.
- ELGHETANY, M.T. Surface antigen changes during normal neutrophilic development: a critical review. **Blood Cells Mol Dis**. Orlando, v.28, p.240-264, 2002.
- FAURSCHOU, M.; BORREGAARD, N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. **Microbes and Infection**. Paris, v.5, p.1317-1327, 2003.
- FAHEY, J.L.; WUNDERLICH, J.; MISHELL, R. The immunoglobulins of mice. I – Four major classes of immunoglobulins: 7S2, &S1, 1A, 2A and 18S1M – globulins. **Journal of experimental Medicine**, New York. v. 120, p.223, 1964.
- FILIPPIN, L.I.; VERCELINO, R.; MARRONI, N.P.; XAVIER, R.M. Redox signalling and the inflammatory response in rheumatoid arthritis. **Clinical and Experimental Immunology**, Oxford, v. 152, p. 415–422, 2008.
- FORMAM, H.J.; THOMAS, M.J. Oxidant production and bactericidal activity of phagocytes. **Annual Review of Physiology**, Palo Alto, v.48, p.669-680, 1986.
- FORMICA, J. V.; REGELSON, W. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. **Food Chem. Toxicol**, Oxford, v. 33, n. 12, p. 1061-1080, 1995.
- FREITAS, M.; PORTO, G.; LIMA, J. L.F.C.; FERNANDES, E. Optimization of experimental settings for the analysis of human neutrophils oxidative burst *in vitro*. **Talanta**, London, v. 78, p.1476–1483, 2009.
- FURUSAWA, M.; TANAKA, T.; ITO, T. Antioxidant activities of hydroxyl flavonoids. **J. Health Sci**, Tokyo, v.51(3), p.376-378, 2005.
- GARCYA-LAFUENTE, A.; GUILLAMON, E.; VILLARES, A.; ROSTAGNO, M. A.; MARTYNEZ, J. A. Flavonoids as anti-inflammatory agents: implications in cancer and cardiovascular disease. **Inflamm. Res**, Basel, v. 58, p. 537–552, 2009.
- GROEMPING, Y.; RITTINGER, K. Activation and assembly of the NADPH oxidase: a structural perspective. **Biochem. J**, London, v.386, p. 401-416, 2005.
- GROSS, S.; GAMMON, S.T.; MOSS, B.L.; RAUCH, D.; HARDING, J.; HEINECKE, J.W.; RATNER, L.; WORMS, D.P. Bioluminescence imaging of mieloperoxidase activity *in vivo*. **Nature Medicine**, New York, v.15, n.4, p.455-461, 2009.
- GROVES, E.; DART, A. E., COVARELLI, V., CARON, E. Molecular mechanisms of phagocytic uptake in mammalian cells. **Cell. Mol. Life Sci**, Basel, v. 65, p. 1957-1976, 2008.
- GUILPAIN, P.; SERVETTAZ, A.; BATTEUX, F.; GUILLEVIN, L.; MOUTHON, L. Natural and disease associated anti-myeloperoxidase (MPO) autoantibodies. **Autoimmunity Reviews**, Amsterdam, v.7, p. 421–425, 2008.

GUZIK, T.J.; GRIENGLING, K.K. NADPH oxidases – molecular understanding finally reaching the clinical level? **Antioxidants & Redox signaling**, Larchmont, v.11, n.10, p.2365-2370, 2009.

HAQQI, T.M.; ANTHONY, D.D.; GUPTA, S.; AHMAD, N.; LEE, M.S.; KUMAR, G.K.; MUKHTAR, H. Prevention of collagen-induced arthritis in mice by a polyphenolic fraction from green tea. **Proc Natl Acad Sci – USA**, Washington, v.96, p. 4524-4529, 1999.

HAMPTON, M.B.; KETTLE, A.J.; WINTERBOURN, C.C. Inside the neutrophils phagosome: oxidants, mieloperoxidase and bacterial killing. **Blood**, New York, v.92, n.9, p.3007-3017, 1998.

HARTL, D.; LEHMANN, N.; HOFFMANN, F.; JANSSON, A.; HECTOR, A.; NOTHEIS, G.; ROOS, D.; BELOHRADSKY, B.; WINTERGERST, U. Dysregulation of innate immune receptors on neutrophils in chronic granulomatous disease. **J. Allergy Clin Immunol**, St. Louis, v.121, n.2, p.375-382, 2008.

HAVSTEEN, B.H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacol. Therapeut**, Oxford, v.96, p.67-202, 2002.

HED, J. Methods for distinguishing ingested from adhering particles. **Methods in enzymology**. New York, v. 132, p.198-204, 1986.

HED, J.; BERG, O.; FORSLID, J.; HALLDEN, G.; LARKA-RAFNER, G. The expression of CR1 and CR3 on non-modulated and modulated granulocytes of healthy blood donors as measured by flow cytofluorometry. **Scand. J. Immunol**, Oxford, v.28, p.339-344, 1988.

HELLER W.; FORKMANN, G. Biosynthesis in the flavonoids. Advance in reseach since 1986 (harborne J. B. ed) p. 499-535. **Chapman and Hall LTd**, London.

HENSON, P.M. The immunologic release of constituents from neutrophil leukocytes. The role of antibody and complement on nonphagocytosable surfaces or phagocytosable particles. **Jounal of immunology**, Baltimore. v. 107, n. 6, p. 1535-1546, 1971.

HENSON, P.M. Dampening inflammation. **Nature Immunology**, New York, v.6, n.12, p.1179-1181, 2005.

HIRAHASHI, J.; MEKALA, D.; ZIFLLE, J.V.; XIAO, L.; SAFFARIPOUR, S.; WAGNER, D.D.; SHAPIRO, S.D.; LOWELL, C.; MAYADAS, T.N. MAC-1 Signaling via Src family and Syk kinases results in elastase-dependent thrombohemorrhagic vasculopathy. **Immunity**, Cambridge, v.25, p.273-283, 2006.

HITCHON, C. A.; EL-GABALAWY, H.S. Oxidation in rheumatoid arthritis, **Arthritis Res Ther**, London, v.6, p. 265-278, 2004.

HOLLMAN, P. C. H.; KATAN, M. B. Absorption, metabolism and health effects of dietary flavonoids in man. **Biomed & Pharmacother**, New York, v.51, p. 305-3 10, 1997.

HOLLMAN, P. C. H.; KATAN, M. B. Dietary Flavonoids: Intake, Health Effects and Bioavailability. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 37, p. 937-942, 1999.

HOMEISTER, J. W.; LUCCHESI, B. R. Complement activation and inhibition in myocardial ischemia and reperfusion injury. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol**, Palo Alto, v. 34, p. 17-40, 1994.

HOULT, J.R.S.; MORONEY, M.A.; PAYÁ, M. Actions of flavonóides and coumarins on lipoxygenase and cyclooxygenase. **Methods in Enzymology**, New York, v.234, p.443-454, 1994.

HU, J.P.; CALOMME, M.; LASURE, A.; DE BRUYNE, T.; PIETERS, L.; VLIETINCK, A.; VANDEN BERGHE, D.A. Structure-activity relationship of flavonoids with superoxide scavenging activity. **Biol. Trace Elem. Res**, London, v.47, p.327-331, 1995.

HUBER-LANG, M.; SARMA, J.V.; ZETOUNE, F.S.; RITTIRSCH, D.; NEFF, T.A.; MCGURE, S.R. et al. Generation of C5a in the absence of C3: a new complement activation pathway. **Nat Med**, New York, v.12, p. 682-687, 2006.

JACKSON, J. K.; HIGO, T.; HUNTER, W. L.; BURT, H. M. The antioxidants curcumin and quercetin inhibit inflammatory processes associated with arthritis. **Inflamm. Res**, Basel, v. 55, 168–175, 2006.

JAQUET, V.; SCAPOZZA, L.; CLARK, R.A.; KRAUSE, K. H.; LAMBETH, J.D. Small molecule NOX inhibitors: ROS-generating NADPH oxidases as therapeutic targets. **Antioxidants & Redox Signaling**, Larchmont, v. 11, n. 10, p. 2535-2552, 2009.

JAKUS, Z.; SIMON, E.; FROMMHOLD, D.; SPERANDIO, M.; MÓCSAI, A. Critical role of phospholipase C γ 2 in integrin and Fc receptor-mediated neutrophil functions and the effector phase of autoimmune arthritis. **J. Exp. Med**, New York, v. 206, n. 3, p. 577-593, 2009.

JITKAEW, S.; WITASP, E.; ZHANG, S.; KAGAN, V. E.; FADEEL, B. Induction of caspase- and reactive oxygen species independent phosphatidylserine externalization in primary human neutrophils: role in macrophage recognition and engulfment. **J. Leukoc. Biol**, New York, v. 85, p. 427–437, 2009.

JOHNSTONE, K.J.; THORPE, R. **Immunochemistry in practice**. 2.ed. Oxford, Blackwell Scientific Publications, 1987.

KABEYA, L. M.; MARCHI, A. A.; KANASHIRO, A.; LOPES, N. P.; SILVA, C. H. T. P.; PUPO, M. T.; LUCISANO-VALIM, Y. M. Inhibition of horseradish peroxidase catalytic activity by new 3-phenylcoumarin derivatives: Synthesis and structure–activity relationships. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Oxford, v. 15, p. 1516–1524, 2007.

KAJIYA, K.; ICHIBA, M.; KUWABARA, M.; KUMAZAWA, S.; NAKAYAMA, T. Role of lipophilicity and hydrogen peroxide formation in the cytotoxicity of flavonols. **Biosci. Biotechnol. Biochem**, Tokyo, v. 65, n.5, p. 1227-1229, 2001.

KANASHIRO, A.; SOUZA, J.G.; KABEYA, L.M.; AZZOLINI, A. E.; LUCISANO-VALIM, Y.M. Elastase release by stimulated neutrophils inhibited by flavonoids: importance of the catechol group. **Z. Naturforsch. C**, Tubingen, v.62, n. 5, p.357-361, 2001.

KENNEDY, A.D.; DELEO, F.R. Neutrophil apoptosis and the resolution of infection. **Immunol. Res**, Basel, v. 43, p. 25-61, 2009.

KETTLE, A.J.; GEDYE, C.C.; WINTERBOURN, C.C.; Superoxide is na antagonist of antiinflammatory drugs that inhibit hypochlorous acid production by mieloperoxidase. **Biochem Pharmacol**, Oxford, v.45, n.10, p.2003-2010, 1993.

KIN, S.; ELKON, K.B. Ma, X. Transcriptional suppression of interleukinin-12 gene expression following phagocytosis of apoptotic cells. **Immunity**, Cambridge, v.21, p.643-653, 2004.

KOEHN, F. E.; CARTER, G. T. The evolving role of natural products in drug discovery. **Nat Rev Drug Discov**, London, v.4, p. 206-220, 2005.

KOPPRASCH, S.; PIETZSCH, J.; GRAESSLER, J. Validation of different chemilumigenic substrates for detecting extracellular generation of reactive oxygen species by phagocytes and endothelial cells. **Luminescence**, Chichester, v.18, p.268 – 273, 2003.

KROEMER, G. The mitochondrion as na integrator/coordinator of cell death pathways. **Cell Death Differ**, London, v. 5. p. 547, 1998.

KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; FAUSTO, N.; ROBINS, S.L.; COTRAN, V. **Bases patológicas das doenças**. 7ª. ed, Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

LEE, H.; WHITFELD, P.L.; MACKAY, C.R. Receptors for complement C5a. The importance of C5aR and the enigmatic role of C5L2. **Immunology and Cell Biology**, Adelaide, v.86, p.153-160, 2008.

LEIST, M. and Jäättelä, M. Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. **Nat Rev Mol Cell Biol**, New York, v.2, p.589-598, 2001.

LEVY, O. antimicrobial proteins and peptides: anti-infective molecules of mammalian leukocytes. **Journal of Leukocyte Biology**, Bethesda, v.76, p. 909-925, 2004.

LIU, J.; LI, X.; YUE, Y.; LI, J.; HE, T.; HE, Y. The Inhibitory Effect of Quercetin on IL-6 Production by LPS- Stimulated Neutrophils. **Cellular & Molecular Immunology**, Beijing, v. 2, n. 6, p. 455-460, 2005.

LOTITO, S.B.; FREI,B. Relevance of apple polyphenols as antioxidants in human plasm: contrasting in vitro and in vivo effects. **Free Radic. Biol. Med**, New York, v.36, p.201-211, 2004.

LUCISANO, Y.M.; MANTOVANI, B. Lysossomal enzyme release from polymorphonuclear leukocytes induced by immune complexes of IgM and IgG. **Journal of Immunology**, Baltimore, v.132, p.2015-2020, 1984.

LUCISANO-VALIM, Y. M.; L. KABEYA, M.; KANASHIRO, A.; RUSSO-CARBOLANTE, E. M. S.; POLIZELLO, A. C. M.; AZZOLINI, A. E. C.S.; SILVA, S. C.; LOPES, J. L. C.; OLIVEIRA, C. A.; MANTOVANI, B. A simple method to study the activity of natural compounds on the chemiluminescence of neutrophils upon stimulation by immune complexes. **J. Pharmacol. Toxic. Methods**, New York, v. 47, p. 53– 58, 2002.

LUNDQVIST, H.; DAHLGREN, C. Isoluminol-enhanced chemiluminescence: a sensitive method to study the release of superoxide anion from human neutrophils. **Free Radic. Biol. Med**, New York, v.20, p. 785 -792, 1996.

LUO, H. R.; LOISON, F. Constitutive neutrophil apoptosis: Mechanisms and regulation. **Am. J. Hematol**, New York, v. 83, p. 288-295, 2008.

MAYADAS, T. N.; CULLERE, X. Neutrophil $\beta 2$ integrins: moderators of life or death decisions. **Trends. Immunol**, Oxford, v.26, n. 7, 2005.

MARQUETTE, C. A.; BLUM L. J. Applications of the luminol chemiluminescent reaction in analytical chemistry. **Anal Bioanal Chem**, Heidelberg, v. 385, P. 546–554, 2006.

MARZOCCHI-MACHADO CM, ALVES CM, AZZOLINI AE, POLIZELLO AC, CARVALHO IF, LUCISANO-VALIM YM. Fc gamma and complement receptors: expression, role and co-operation in mediating the oxidative burst and degranulation of neutrophils of Brazilian systemic lupus erythematosus patients. **Lupus**, London, v.11, n.4, p. 240-248, 2002.

MCCHESENEY, J. D.; VENKATARAMAN, S. K.; HENRI, J. T. Plant natural products: Back to the future or into extinction?. **Phytochemistry**, New York, v. 68, p. 2015–2022, 2007.

MEYER-HOFFERT, U.; WINGERTSZAHN, J.; WIEDOW, O. Human leukocyte elastase induces keratinocyte proliferation by epidermal growth factor receptor activation. **Journal of Investigative Dermatology**, Chapel Hill, v.123, p.338-345, 2005.

MIDDLETON, E. Jr.; HANDAS WAMI, C.; THEOHARIDES, C. T. The effect of plant flavonoids on mammalian cells: Implications for inflammation heart disease, and cancer. **Pharmacological Reviews**, Baltimore. v. 52, n.4, p.673-751, 2000.

MOREIRA, M.R.; KANASHIRO, A.; KABEYA, L.M.; POLIZELLO, A.C.M.; AZZOLINI, A.E.C.S.; Curti, C.; OLIVEIRA, C.A.; DO-AMARAL, A.T.; VALIM, Y.M.L. Neutrophil effector functions triggered by Fc-gamma and/or complement receptor are dependent on B-ring hydroxylation pattern and physicochemical properties of flavonols. **Life Sciences**, Oxford, v. 81, p. 317-326, 2007.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunological Methods**, Amsterdam, v.65, p. 55-63, 1983.

NATAN, C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. **Nat. Rev. Immunol**, London, v. 6, p. 173-182, 2006.

NIMMERJAHN, F.; RAVETCH, J.V. Fc γ receptors: old friends and new family members. **Immunity**, Cambridge, v.24, p.19-28, 2006.

OLIVEIRA, C.A.; AZZOLINI, A.E.C.S.; SILVA, S.C. KANASHIRO, A.; KABEYA, L.M.; AZEVEDO, A.P.G.B.; GONÇALVES, C.F.F; CORDEIRO, D.S.; LEITÃO, D.P.S.; GASPAR, L.R.; SOUZA, P.L.V.; LUCISANO-VALIN, Y.M.; MANTOVANI, B. Avaliação Bioquímica e estrutural da interação de imunocomplexos de IgG com leucócitos polimorfonucleares: efeito de antioxidantes naturais. **Eclética Química**, São Paulo, 27A, p.273-284, 2002.

OTTONELLO, L.; FRUMENTO, G.; ARDUINO, N.; DAPINO, P.; TORTOLINA, G.; DALLEGRI, F. Immune complex stimulation of neutrophil apoptosis: investigating the involvement of oxidative and nonoxidative pathways. **Free Radical Biology & Medicine**. New York, v. 30, n. 2, p.161-169, 2001.

OUCHTERLONY, O. Diffusion-in-gel methods for immunological assays. **Progress in Allergy**. Basel. v.15, p.1-78, 1958.

O'SHEA, J.J.; BROWN, E.J.; SELIGMANN, B.E.; METCALF, J.A.; FRANK, M.M.; GALLIN, J.I. Evidence for distinct intracellular pools of receptors for C3b and C3bi in human neutrophils. **J. Immunol**, Baltimore, v.134, p.2580-2587, 1985.

PARK, J.W.; BABIOR, B.M. Activation of the leukocyte NADPH oxidase subunit p47phox by protein kinase C. A phosphorylation dependent change in the conformation of the C-terminal end of p47 phox. **Biochemistry**, Washington, v. 36, p. 7474-7480, 1997.

PRICOP, L.; GOKHALE, J.; REDECHA, P.; NG, S.C.; SALMON, J.E. Reactive oxygen intermediates enhance Fc γ receptor signaling and amplify phagocytic capacity. **J. Immunol**, Baltimore, v.162, p.7041-7048, 1999.

PULLAR, J.M.; VISSERS, M.C.M.; WINTERBOURN, C.C. Living with a killer: the effects of hypochlorous acid on mammalian cells. **IUBMB Life**, London, v.50, n.4/5, p.259-266, 2000.

RAHMAN, I.; BISWAS, S.K.; KIRKHAM, P.A. Regulation of inflammation and redox signaling by dietary polyphenols. **Biochem Pharmacol**, Oxford, v.72, p.1439-1452, 2006.

RAMOS, S. Effects of dietary flavonoids on apoptotic pathways related to cancer chemoprevention. **J. Nut. Biochem**, Stoneham, v.18, p.427-442, 2007.

RETH, M. Antigen receptor tail clue. **Nature**, London, v.338, p. 383-384, 1989.

REEVES, E. P.; NAGL, M.; GODOVAC-ZIMMERMANN, J.; SEGAL, A. W. J. Reassessment of the microbicidal activity of reactive oxygen species and hypochlorous acid with reference to the phagocytic vacuole of the neutrophils granulocyte. **J. Med. Microbiol**. Edinburgh, v. 52, p. 643-651, 2003.

RODRIGUES, T.; SANTOS, A.C.; PIGOSO, A.A.; MINGATTO, F.E.; UYEMURA, S.A.; CURTI, C. Thioridazine interacts with the membrane of mitochondria acquiring antioxidant activity toward apoptosis – potentially implicated mechanism. **Br. J. Pharmacol.** London, v. 136, p.136-142, 2002.

ROMAN, R.M.; WENDLAND, A.E.; POLANCZYK, C.A. Mieloperoxidase e doença arterial coronariana: da pesquisa à prática clínica. **Arq. Bras. Cardiol**, São Paulo, v.91, n.1, p.12-19, 2007.

ROTHWELL, J. A.; DAY, A. J.; MORGAN, M. R. A. Experimental determination of octanol-water partition coefficients of quercetin and related flavonoids. **J. Agric. Food Chem**, Washington, v. 53, p. 4355-4360, 2005.

ROOS, D.; VAN BRUGGEN, R.; MEISCHL, C. Oxidative killing of microbes by neutrophils. **Microbes and Infection**. Paris, v. 5, p. 1307–1315, 2003.

ROTHER, K.; TILL, G.O.; HANSCH, G.M. **The complement system**, 2nd, Berlin and New York, Ed. Springer, 1998.

SAHLIN, S.; HED, J.; RUNDQUIST, I. Differentiation between attached and ingest immune complex by a fluorescence quenching cytofluorometric assay. **J. Immunological Methods**. Amsterdam, v. 60, p.115-124, 1983.

SAVILL, J. Apoptosis in resolution of inflammation. **J. Leukocyte Biology**, New York, v.61, p. 375-380, 1997.

SELLOUM, L.; REICHL, S.; MULLER, M.; SEBIHI, L.; ARNHOLD, J. Effects of Flavonols on the Generation of Superoxide Anion Radicals by Xanthine Oxidase and Stimulated Neutrophils. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 395, n. 1, p. 49–56, 2001

SELLOUM, L.; DJELILI, H.; SEBIHI, L.; ARNHOLD, J. Scavenger effects of flavonols on HOCl-induced luminol chemiluminescence. **Luminescence**, Chichester, v. 19, p. 199-204, 2004.

SELVARAJ, P.; ROSSE, W.F.; SILBER, R.; SPRINGER, T.A. The major Fc receptor in blood has a phosphatidylinositol anchor and is deficient in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. **Nature**, London, v.333, p. 565-567, 1988.

SHEPPARD, F. R.; KELHER, M. R; MOORE, E. E.; MCLAUGHLIN, N. J. D.; BANERJEE, A.; SILLIMAN, C. C. Structural organization of the neutrophil NADPH oxidase: phosphorylation and translocation during priming and activation. **J. Leukoc. Biol**, Betesda, v. 78, p.1025–1042, 2005.

SOLOMON, S.; KASSAHN, D.; ILLGES, H. The role of the complement and the FcγR system in the pathogenesis of arthritis. **Arthritis Research & Therapy**, London, v.7, p.129-135, 2005.

SCHMIDT, R. E.; GESSNER, J. E. Fc receptors and their interaction with complement in autoimmunity. **Immunology Letters**, Amsterdam, v. 100, p.56-57, 2005.

SUZUKI, K.; NAMIKI, H. Cytoplasmic pH-dependent spreading of polymorphonuclear leukocytes: Regulation by pH of PKC subcellular distribution and F-actin assembly. **Cell Biology International**, London, v. 31, p. 279-288, 2007.

SHIBA, Y.; KINOSHITA T.; CHUMAN, H.; TAKETANI, Y.; TAKEDA, E.; KATO, Y.; NAITO, M.; KAWABATA, K.; ISHISAKA, A.; TERAOKA, J.; KAWAI, Y. Flavonoids as Substrates and Inhibitors of Myeloperoxidase: Molecular Actions of Aglycone and Metabolites. **Chem. Res. Toxicol**, Washington, v. 21, p. 1600–1609, 2008.

SOEHNLEIN, O.; KENNE, E.; ROTZIUS, P.; ERIKSSON, E. E.; LINDBOM, L. Neutrophil secretion products regulate anti-bacterial activity in monocytes and macrophages. **Clin. Exp. Immunol**, Oxford, v. 151, p. 139–145, 2007.

THEILGAARD-MONCH, K.; PORSE, B.T.; BORREGAARD, N. Systems biology of neutrophils differentiation and immune response. **Current Opinion in Immunology**. London, v.18, p.54-60, 2006.

TU, Y.C. ; LIAN, T.W. ; YEN, J.H. ; CHEN, Z.T. ; WU, M.J. Antiatherogenic effects of kaempferol and rhamnocitrin. **J. Agri. Food. Chem**. Washington, v. 55, p.9969-9976, 2007.

TWENTYMAN, P.R.; LUSCOMBRE, M. A study of some variable in a tetrazolium dye (MTT) based assay for cell growth and chemosensitivity. **Br. J. Cancer**, London, v. 56, p. 279-285, 1987.

UNDERHILL, D.M.; Collaboration between the innate immune receptor dectin-1, TLRs and NODs. **Immunological Review**. Copenhagen, v. 219, p. 75-87, 2007.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOLI, J.; CRONIN, M.T.D.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **International Journal of Biochemistry**. Bristol, v.39, p.44-84, 2007.

VAN DE WINKEL, J.G.; CAPEL, P.J. Human IgG Fc receptor heterogeneity: molecular aspects and clinical implications. **Immunol Today**. Amsterdam, v.14, p.215-221, 1993.

VAN DEN BERG, J.M, et al. Divergent effects of tumor necrosis factor α on apoptosis of human neutrophils. **Journal of leukocyte Biology**, New York, v.69, p.467-473,2001.

VAN DER VEEN, B.S.; WINTER, M.P.J.; HEERINGA, P. Myeloperoxidase: Molecular mechanism of action and relevance to human health and disease. **Antioxidant Redox Signal**, Larchmont, v.11, p. 2899-2937, 2009.

VAN SPRIEL, A. B.; LEUSEN, J. H. W.; VAN EGMOND, M.; DIJKMAN, H. B. P. M.; ASSMANN, K. J. M.; MAYADAS, T. N. VAN DE WINKEL, J. G. J. Mac-1 (CD11b/CD18) is essential for Fc receptor-mediated neutrophil cytotoxicity and immunologic synapse formation. **Blood**, New York, v.97, n.8, p. 2478-2486, 2001.

VINSON, J.A.; SU, X.; ZUBIK, L.; BOSE, P. Phenol antioxidant quantity and quality in foods: fruits. **J.Agric. Food Chem**, Washington, v.49, p.5315-5321, 2001.

VOICE, J.K.; LACHMANN, P.J. Neutrophil Fc γ and complement receptors involved in binding soluble IgG immune complex and in specific granule release induced by soluble IgG immune complex. **Eur. J. Immunol**, Weinheim, v.27, p. 2514-2523, 1997.

WANG, L.; TU, Y.C.; LIAN, T.W.; HUNG, J.T.; YEN, J.H.; WU, M.J. Distinctive antioxidant and anti-inflammatory effects of flavonols. **J. agric. Food. Chem**, Washington, v.54, p.9798-9804, 2006.

WEIR, D.M. **Immunochemistry and molecular immunology**. 5.ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications, p.570, 1986.

WIEN TJES, F.B.; PANAYOTOU, G.; REEVES, E.; SEGAL, A.W. Interactions between cytosolic components of the NADPH oxidase: p40phox interacts with both p67phox and p47phox. **Biochem J**, London, v. 317, p. 919-924, 1996.

WILLIAMS, D. M.; STONE, M.J.; HAUCK, P.R.; RAHMAN, S.K. Why are secondary metabolites (natural products) biosynthesized? **J. Nat. Prod**, Cincinnati v.52. n.6. p.1189-1208, 1989.

WINTERBOURN, C.C.; KETTLE, A. Biomarkers of mieloperoxidase-derived hypochlorous acid. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v.29, n.5, p.403-409, 2000.

YASUI, K.; KOBAYASHI, N.; YAMAZAKI, T.; AGEMATSU, K.; MATSUZAKI, S.; ITO, S.; NAKATA, S.; BABA, A.; KOIKE, K. Superoxide dismutase (SOD) as a potential inhibitory mediator of inflammation via neutrophils apoptosis. **Free Radic. Research**, Yverdon, v. 39, n.7, p.755-762, 2005.

ZAKHIREH, B.; BLOCK, L.H.; ROOT, R.K. Neutrophil function and host resistance. **Infection**, Munchen, v.7, n.2, p.88-98, 1979.

ZENG, J. FENNA, R.E. X-ray crystal structure of canine mieloperoxidase at 3 Å resolution. **J Mol Biol**, New York, v.226, p. 185-207, 1992.

ZHONG, B.; JIANG, K.; GILVARY, D. L.; PEARLIE K. BURNETTE, EPLING.; RITCHEY C.; LIU, J.; JACKSON, R. J.; GELLER, E. H.; WEI, S. Human neutrophils utilize a Rac/Cdc42-dependent MAPK pathway to direct intracellular granule mobilization toward ingested microbial pathogens. **Blood**, New York, v.101, p.3240-3248, 2003.

ZIELINSKA-PRZYJEMSKA, M.; IGNATOWICZ, E. Citrus fruit flavonoids influence on neutrophils apoptosis and oxidative metabolism. **Phytotherapy research**, London, v.22, p. 1557-1562, 2008.