

GABRIELA STERLE PEREIRA

**AÇÃO INIBITÓRIA DOS FLAVONOIDES QUERCETINA E RUTINA SOBRE A
ATIVAÇÃO DE NEUTRÓFILOS HUMANOS**

ASSIS

2017

GABRIELA STERLE PEREIRA

**AÇÃO INIBITÓRIA DOS FLAVONOIDES QUERCETINA E RUTINA SOBRE A
ATIVAÇÃO DE NEUTRÓFILOS HUMANOS**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências e Letras de Assis – UNESP – Universidade Estadual Paulista para a obtenção do título de Mestre em Biociências. Área de conhecimento: Caracterização e Aplicação da Diversidade Biológica.

Orientadora: Dra. Karina Alves de Toledo

Bolsista: CAPES

ASSIS

2017

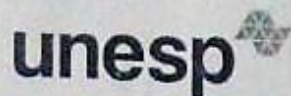
Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca da F.C.L. – Assis – Unesp

P436a Pereira, Gabriela Sterle
 Ação inibitória dos flavonoides quercetina e rutina sobre a
 ativação de neutrófilos humanos / Gabriela Sterle Pereira.
 Assis, 2017.
 60 f. : il.

 Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências e Letras
 de Assis – Universidade Estadual Paulista.
 Orientador: Dr^a Karina Alves de Toledo

 1. Flavonoides. 2. Quercetina. 3. Neutrófilos. 4. Inflama-
 ção. I. Título.

CDD 547.7



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA



Câmpus de Assis

ATESTADO DE APROVAÇÃO – DEFESA

ATESTAMOS que **Gabriela Sterle Pereira**, defendeu, no dia 07/03/2017, a Dissertação intitulada "AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTI-INFLAMATÓRIO DOS FLAVONOIDES RUTINA E QUERCETINA", junto ao Programa de Pós-graduação em BIOCÊNCIAS, Curso de Mestrado Acadêmico, tendo sido "APROVADA".

Atestamos ainda que a obtenção do título dependerá de homologação pelo Órgão Colegiado competente.

Assis, 7 de março de 2017.

SUELI APARECIDA FRANCO
Supervisora Técnica de Seção

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, provedor de todas as coisas.

Aos meus pais Agnaldo e Rosana, os quais são parte integral de mim e de todas as minhas vitórias, incluindo o mestrado, que não seria possível sem o apoio deles, de todas as maneiras. Sou extremamente grata pela sorte de tê-los como família. Não tenho e jamais terei como agradecer por tudo que fazem e são para mim.

À minha irmã Juliana, minha companheira desde o início da minha vida, primeira amiga, inspiração e estímulo mesmo nos dias difíceis. Obrigada por sempre acreditar em mim.

À toda a minha família, sempre presente, avós, tios e primos os quais acompanham meus passos e com quem posso contar sempre.

Ao meu amigo, companheiro e namorado Adenilton, por todo apoio, compreensão, ajuda, dedicação e amor ao longo desse processo.

Às minhas amigas de vida, Maria Olívia, Lígia, Larissa e Isabela, que mesmo distantes acompanham os meus dias, fazendo-os mais divertidos e sendo acalanto nos momentos difíceis. Aos meus amigos de república, Gabriel e os mestres Yuri e Fernanda, que vem me acompanhando ao longo dos anos, mostrando que somos capazes e que os sonhos são possíveis.

Aos amigos da turma XXII de Ciências Biológicas da Unesp Assis. É uma honra tê-los como parceiros de profissão e de vida. Vivemos nossos melhores anos juntos e é sempre um prazer desfrutar da companhia de amigos tão incríveis.

À todos os meus companheiros do laboratório LAINV Bruno, Amanda, Priscila, Larissa, Lilian, Igor, Mirian, Tiago, Hiago, Gustavo e Pedro pela boa convivência, por contribuírem não só para o desenvolvimento do projeto e com conhecimento compartilhado, mas também pelo clima leve e divertido dividido por todos.

À Lilian, sempre muito disposta, pelas coletas de sangue. Agradeço ainda, por juntamente ao Igor, desenvolvermos nossos experimentos em conjunto e o projeto como um todo, ambos foram fundamentais para que fosse possível a conclusão do projeto.

À doutoranda Mirian, não tenho palavras para agradecer, pela disposição e paciência em dividir comigo seu conhecimento e me auxiliar em toda a realização e discussão da parte de bioinformática. Agradeço ainda pelas discussões científicas, sempre muito construtivas.

Ao professor Sérgio Stampar, pelo voto de confiança, pela vaga no programa de mestrado e principalmente por toda a compreensão. Agradeço ainda, por me estimular a continuar e concluir o mestrado.

À CAPES pela bolsa de pós graduação.

Por fim, agradeço à minha orientadora Karina Alves de Toledo, por seu incrível profissionalismo, sendo uma inspiração como educadora e pesquisadora, sempre ética, comprometida e presente, sanando nossas dúvidas, dificuldades e estimulando nossa carreira. Por dividir conosco todo seu conhecimento, não só científico, mas também pessoal. Agradeço ainda, pela amizade, pelos bons momentos, por toda ajuda, conversas, conselhos e risadas.

PEREIRA, G.S **Ação inibitória dos flavonoides quercetina e rutina sobre a ativação de neutrófilos humano**. 2017. 62 f.: il. Dissertação de Mestrado em Biociências – Faculdade de Ciências e Letras de Assis – Universidade Estadual Paulista. Assis, 2017.

RESUMO

Rutina e Quercetina são flavonoides encontrados em diversos alimentos, incluindo aqueles indicados como complemento no tratamento de doenças inflamatórias. Durante o processo inflamatório, neutrófilos são as primeiras células a serem recrutadas por estarem diretamente relacionadas à ativação e resolução destes processos. Assim, frequentemente estas células são alvos para novos compostos anti-inflamatórios. A descrição da atividade anti-inflamatória de rutina e quercetina se estende para vários ativadores das vias clássicas dos neutrófilos. O estudo quanto aos compostos forbol ésteres, como PMA (phorbol myristate acetate), que ativam de maneira específica a sinalização da proteína quinase C, ainda são escassos. O objetivo deste trabalho foi analisar a atividade anti-inflamatória de rutina e quercetina sobre neutrófilos ativados por PMA. Para tanto, foram analisadas etapas importantes do processo inflamatório mediadas pelos neutrófilos: adesão, desgranulação, e liberação das NETs (Neutrophil Extracellular Traps). Nossos resultados demonstraram que, ativação de neutrófilos por PMA: (i) rutina e quercetina não inibem a adesão dos neutrófilos, (ii) quercetina inibe a desgranulação, (iii) ambos inibem a atividade da mieloperoxidase (MPO), assim como (iv) inibem a liberação das NETs na ausência de morte celular. Análises de *docking molecular* sugerem que tais eventos podem estar relacionados à geração de complexos quercetina/MPO e rutina/elastase.

Palavras-chave: Flavonoides, quercetina, neutrófilos, inflamação.

Pereira, G.S. **Inhibitory action of flavonoids quercetin and rutin on the activation of human neutrophils** 2017. 62 f.: il. Master dissertation in Bioscience– Faculdade de Ciências e Letras de Assis – Universidade Estadual Paulista. Assis, 2017.

ABSTRACT

Rutin and Quercetin are flavonoids found in several foods, including those indicated as a supplement in the inflammatory treatment diseases. During the inflammatory process, neutrophils are the first cells to be recruited. They are directly related to the activation and resolution of these processes. Thus, these cells often target new anti-inflammatory compounds. The description of the anti-inflammatory activity of rutin and quercetin extends to several activators of classical neutrophil pathways. Studies involving forbol esters compounds, as PMA ((phorbol myristate acetate), which activate in a specific manner the protein kinase signalling, it is still poor. The aim of this study was to analyze the anti-inflammatory activity of rutin and quercetin on PMA-activated neutrophils. For this, important steps of the inflammatory process mediated by neutrophils were analyzed: adhesion, degranulation, and release of NETs (Neutrophil Extracellular Traps). Our results demonstrated that neutrophil activation by PMA: (i) rutin and quercetin did not inhibit neutrophil adhesion, (ii) quercetin inhibited degranulation, (iii) both inhibited myeloperoxidase activity (MPO), as well as (iv) both inhibit the release of NETs in the absence of cell death. Molecular docking analyzes suggest that such events may be related to the generation of quercetin/MPO and rutin/elastase complexes.

Keywords: Flavonoids, quercetin, neutrophils, inflammation.

LISTA DE FIGURAS

1. Introdução

Figura 1 – Estrutura de domínios dos subtipos da PKC convencional, nova e atípica.....	15
Figura 2 – Ativação da via PKC por PMA em neutrófilos.....	16
Figura 3 – Os grânulos do neutrófilo.....	18
Figura 4 – Esquema de liberação das armadilhas extracelulares do neutrófilo.....	19
Figura 5 – Estrutura básica da molécula de flavonoide.....	20
Figura 6 – Estrutura da molécula de quercetina em sua forma aglicona.....	23
Figura 7 – Estrutura da molécula de rutina.....	24

2. Artigo

Figura 1 – Quercetina e rutina não alteram a adesão de neutrófilos.....	36
Figura 2 – Quercetina interfere no processo de desgranulação.....	39
Figura 3 – Quercetina e rutina inibem a ação enzimática da Mieloperoxidase.....	41
Figura 4 – Quercetina e rutina reduzem a liberação das NETs.....	44
Figura 5 - A viabilidade celular dos neutrófilos não é alterada pela presença de quercetina ou rutina.....	45
Figura 6. Docking molecular do complexo Quercetina / Mieloperoxidase.....	48
Figura 7. Docking molecular do complexo Rutina / Mieloperoxidase.....	49
Figura 6. Docking molecular do complexo Quercetina / Elastase.....	50
Figura 6. Docking molecular do complexo Rutina / Elastase.....	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

C5a	Componente 5 ^a do sistema complemento
C3a	<i>Componente 3^o do sistema complemento</i>
ECM	<i>Extracellular matrix</i>
ECAM	<i>Epithelial Cell Adhesion Molecule</i>
fMLP	<i>N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine</i>
ICAM	<i>Intercellular Adhesion Molecule</i>
IL	Interleucina
Mac-1	<i>Macrophage-1 Antigen</i>
NETs	<i>Neutrophil Extracellular Traps</i>
PAF	<i>Platelet-Activating Factor</i>
PECAM-1	<i>Platelet/Endothelial-Cell Adhesion Molecule 1</i>
PMA	<i>Phorbol Myristate Acetate</i>
PSGL-1	<i>P-Selectin Glycoprotein Ligand 1</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
TNF- α	<i>Tumor Necrosis Factor α</i>
VAP-1	<i>Vascular Adhesion Protein</i>
PMN's	Polimorfonucleares
VCAM-1	<i>Vascular Cell Adhesion Molecule 1</i>

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1. INTRODUÇÃO GERAL	11
1.1. NEUTRÓFILOS NO PROCESSO INFLAMATÓRIO	11
1.2. CASCATA DE ATIVAÇÃO NEUTROFÍLICA	12
1.3. AÇÃO NEUTROFÍLICA.....	16
1.4. FLAVONÓIDES	20
1.4.1. QUERCETINA	22
1.4.2. RUTINA	24
2. OBJETIVOS	26
3. ARTIGO.....	27
4. CONCLUSÕES GERAIS.....	53
5. REFERÊNCIAS	54

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1 NEUTRÓFILOS NO PROCESSO INFLAMATÓRIO

Inflamação pode ser definido como o processo de “recrutamento e ativação de células do sistema imunológico após infecção ou injúrias” (Amulic et al., 2012). São características clássicas do processo inflamatório a dor, rubor, calor e edema. Tais sintomas surgem devido a alterações no endotélio, que levam ao aumento no volume do fluxo sanguíneo, diminuição da velocidade do fluxo e extravasamento de fluídos e proteínas do sangue.

O processo inflamatório tem início geralmente devido a injúrias teciduais ou infecções por microorganismos que podem ser detectada pelos macrófagos. Estas células fagocíticas, presentes nos tecidos, iniciam o recrutamento de outros tipos celulares, através da secreção de substâncias atraentes, como citocinas e quimiocinas. O primeiro tipo celular a migrar para o local de inflamação são os neutrófilos, cuja principal função também é fagocítica (Junior et al., 2007).

Os neutrófilos são leucócitos de núcleo segmentado, assim como os basófilos e eosinófilos. Por tal característica, são chamados de leucócitos polimorfonucleares (PMN's). Assim como os outros PMN's, o neutrófilo possui grânulos em seu citoplasma, o que também permite chamá-los de granulócitos. A afinidade por corantes neutros é a responsável pela nomenclatura adotada para os neutrófilos (Amulic et al., 2012). Sendo os leucócitos mais abundantes na corrente sanguínea (50-70%), os neutrófilos são componentes da resposta imune inata e adaptativa, possuindo função vital para a imunidade (Doeing et al., 2003).

O recrutamento de neutrófilos tem início pela liberação de mediadores inflamatórios como citocinas, cistenil-leucotrienos e histamina, liberados por fagócitos presentes no tecido e que causam alterações na superfície endotelial. Neutrófilos recrutados, uma série de eventos da microcirculação, composta basicamente pelas etapas de rolamento, adesão e transmigração (Kolaczowska e Kubes, 2013), também denominada cascata de ativação neutrofílica.

1.2 CASCATA DE ATIVAÇÃO NEUTROFÍLICA

A presença de diversos mediadores inflamatórios, principalmente IL-1- β e TNF- α , aumenta a expressão das moléculas de adesão no endotélio, P-selectina e E-selectina, dando início aos primeiros passos da cascata de ativação neutrofílica, a captura e rolamento. As L-selectinas e o Ligante de Glicoproteína da P-selectina 1 (PSGL1) são moléculas presentes na membrana celular do neutrófilo e interagem com ligantes presentes no endotélio - Lewis-x e as selectinas P e E, respectivamente. A interação apresentada entre essas moléculas é de baixa afinidade, o que faz com que a ligação seja rompida e refeita ao longo do vaso sanguíneo, o que promove a desaceleração do neutrófilo, culminando na captura e rolamento do mesmo (Kolaczowska e Kubes, 2013). Uma vez que estão em contato com o endotélio, os neutrófilos podem iniciar o processo de firme adesão.

A adesão, assim como outros passos da ativação dos neutrófilos ao endotélio, é dependente do rearranjo do citoesqueleto, que ocorrerá pela ativação intracelular de quinases das famílias Src, HcK, Fgr e Lyn. A ativação das quinases garantirá ainda a expressão e mudança de afinidade das

integrinas, moléculas essenciais para a etapa de firme adesão (Borregaard, 2010).

As integrinas da família $\beta 2$ integrinas, LFA-1 (Antígeno Associado à Função dos Linfócitos 1) e Mac-1 (Antígeno dos Macrófagos 1) são as principais moléculas de adesão expressas pelos neutrófilos. Ambas possuem grande afinidade com as moléculas da família das imunoglobulinas, expressas pelo endotélio, como ICAM1 (Molécula de Adesão Intercelular 1), ICAM2 (Molécula de Adesão Intercelular 2) E VCAM (Molécula de Adesão Vascular). A interação entre LFA-1 e ICAM1 é essencial para o processo de firme adesão dos neutrófilos ao vaso, que culminará no passo seguinte, a transmigração através das células endoteliais (Yuan et al., 2012).

A transmigração é mediada através das integrinas, imunoglobulinas CAMs (ICAM-1, ICAM-2 e VCAM) e proteínas de junção como a PECAM-1 (Molécula de Adesão Celular e Endotelial Plaquetária). Existe atualmente duas possíveis formas descritas para a realização da transmigração (ou diapedese): a paracelular e a transcelular. No caso da paracelular, o neutrófilo utiliza a junção entre as células endoteliais para a migração. No processo transcelular, a passagem é feita através de uma célula endotelial, que forma uma estrutura chamada “domo”, e que envolve o neutrófilo e possibilita sua passagem (Kolaczkowska e Kubes, 2013).

Uma vez transposta a barreira endotelial, o neutrófilo segue direcionado pelo gradiente quimiotático. Tal gradiente é detectado pelos neutrófilos através de receptores acoplados à proteína G (GPCR - G protein-coupled receptor, do inglês) (Xu et al., 2003). Os principais receptores GPCR expressos em neutrófilos são: para fMLP, leucotrieno B₄, quimiocinas CXCL1 e CXCL2, fator

ativador de plaquetas (PAF- PAFR) e componentes solúveis do sistema complemento C5a e C3a (Williams et al., 2011).

As vias clássicas de estímulo para a cascata de ativação neutrofílica consistem na interação com receptores expressos na membrana plasmática, sendo os mais importantes os Receptores Acoplados à Proteína G (GPCR), Receptores Fc, Receptores de adesão (Selectinas e seus ligantes), Receptores de Citocina e via de Receptores Toll-like (Futosi *et al.*, 2013).

O Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) é um derivado do óleo de croton e potente ativador das funções neutrofílicas. O estímulo proporcionado pelo PMA foge das vias clássicas de ativação do neutrófilo, uma vez que não ocorre via receptores de membrana. O PMA possui capacidade de inserção na bicamada lipídica da célula, funcionando como intermediário para a Proteína Quinase C (PKC) (Repine et al., 1974).

A Proteína Quinase C (PKC) é uma isoenzima, pertencente à família das Quinases AGC, juntamente com as quinases A e G. Tal proteína está envolvida no processo de sobrevivência, crescimento, proliferação, migração e apoptose celular. Dentre as PKC's, existe alguns subgrupos que são classificados em: convencionas (cPKC), novas (nPKC) e atípicas (nPKC). Cada grupo possui diferentes representantes, os quais apresentam diferentes domínios regulatórios (C1 e C2) e domínios catalíticos, como mostrado na Figura 1 (Wu-Zhang e Newton, 2013).

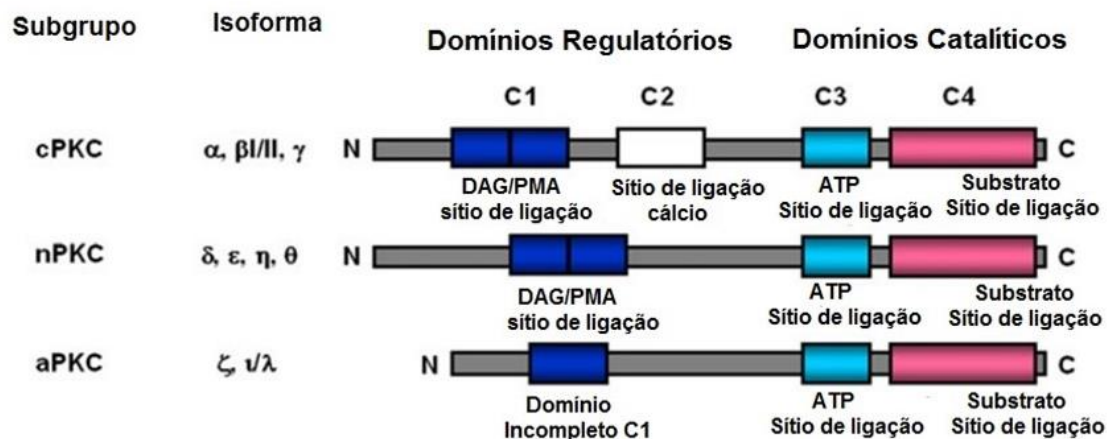


Figura 1. Estrutura de domínios dos subtipos da PKC, convencional, nova e atípica. As isoformas convencionais (cPKC) são ativadas por cálcio e Diacylglycerol (DAG) ou phorbol esters (PMA) Adaptado (Bertram e Ley, 2011).

Nos neutrófilos encontram-se expressas as PKC's dos tipos α e β – ambas do subgrupo cPKC e PKC- δ das nPKC. São atribuídas às isoformas desta proteína a influência em alguns eventos do neutrófilo como durante o processo de adesão, em que auxilia na mudança do pH interno da célula, na apoptose, na montagem do complexo enzimático da NADPH e na ativação do *burst* oxidativo. O PMA tem como alvo o domínio regulatório C1 da PKC, ativando diretamente a proteína e eliminando a necessidade do intermediário DAG (diacylglicerol) (Bertram e Ley, 2011). O esquema detalhado de ativação mediada por PMA encontra-se na Figura 2.

Paralelamente e sinergisticamente à cascata de ativação neutrófilica, estas células promovem eventos intimamente relacionados à sua atividade microbicida. São eles, a desgranulação, a fagocitose, a geração de EROS e NETs, os quais serão tratados no próximo item.

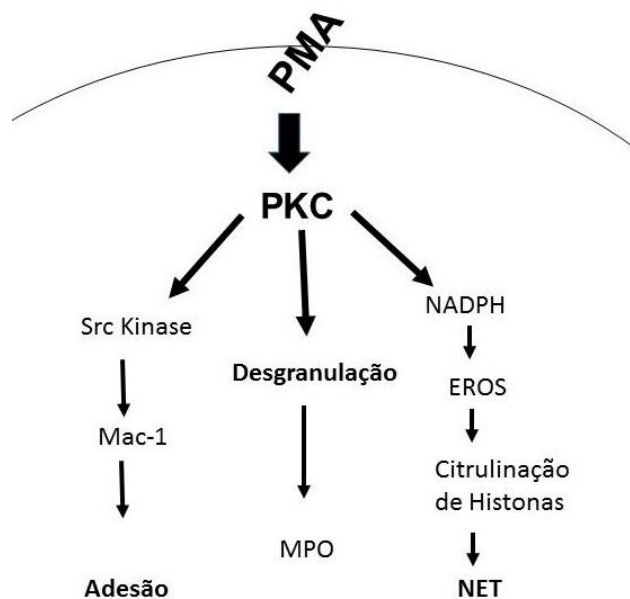


Figura 2. Ativação da via PKC por PMA em neutrófilos. PMA ativa diretamente PKC via inserção na membrana plasmática, que resulta em adesão, desgranulação e geração de NETs através de diferentes vias de sinalização (elaborado a partir de (Mashimo *et al.*, 2008; Minguet *et al.*, 2013).

1.3. AÇÃO NEUTROFÍLICA

Os neutrófilos, como células do sistema imune e fagócitos profissionais possuem um arcabouço diverso de mecanismos que possibilitam a eliminação de patógenos, que podem ser ainda intra ou extracelulares. Após o recrutamento até o foco de inflamação, os neutrófilos realizam a fagocitose de partículas ou microorganismos, englobando-os através de uma complexa interação de lipídios de membrana, cascatas de sinalização intracelular e rearranjos do citoesqueleto. A morte do microorganismo se dá no interior de vesículas especializadas, os fagolisossomos, cujos quais se fundirão aos grânulos citoplasmáticos, que contribuirão com enzimas digestivas e conteúdo antimicrobiano. Além dos grânulos, a geração de Espécies Reativas de Oxigênio (EROS) também contribuem no processo de fagocitose (Kruger *et al.*, 2015).

Os grânulos citoplasmáticos podem ainda ser liberados extracelularmente num processo denominado desgranulação. Além das vesículas secretórias, os grânulos dos neutrófilos podem ser classificados em três tipos: os primários, também chamados de azurofílicos, os secundários ou específicos e os terciários ou gelatinase. A nomenclatura numérica adotada diz respeito à ordem de formação desses grânulos de acordo com o estágio de maturação do neutrófilo. Entretanto, a propensão à desgranulação ocorre de forma inversa, sendo as vesículas secretórias as primeiras a se fundirem com a membrana plasmática, seguido dos grânulos terciários (gelatinase), grânulos secundários (específicos) e por fim, com menor propensão à desgranulação, os primários ou azurofílicos (Figura 3).

Em função da variação na propensão de mobilização dos grânulos, é possível associar a liberação dos conteúdos granulares aos estados de ativação dos neutrófilos. As vesículas secretórias, por exemplo estão associadas ao processo de adesão, uma vez que o contato com o endotélio induz sua liberação (Amulic et al., 2012). Os grânulos de gelatinase por sua vez, parecem estar ligados ao processo de transmigração (Delclaux et al., 1996). Ao alcançar o sítio inflamatório, tem início o processo de *burst* oxidativo e a mobilização dos grânulos específicos (tendo como principais proteínas as lisoenzimas e lactoferrinas). Por último, os grânulos azurofílicos contendo lisoenzimas, defensinas, elastase e mieloperoxidase, que podem tanto fundir-se aos fagossomos quanto serem expelidos para o tecido extracelular no processo de desgranulação propriamente dito. A mobilização e fusão dos grânulos específicos às vesículas fagocíticas é de grande importância, já que estão contidos nesses grânulos componentes do complexo enzimático da NADPH

oxidase necessária para o *burst* oxidativo e a geração de EROS (Amulic et al., 2012).

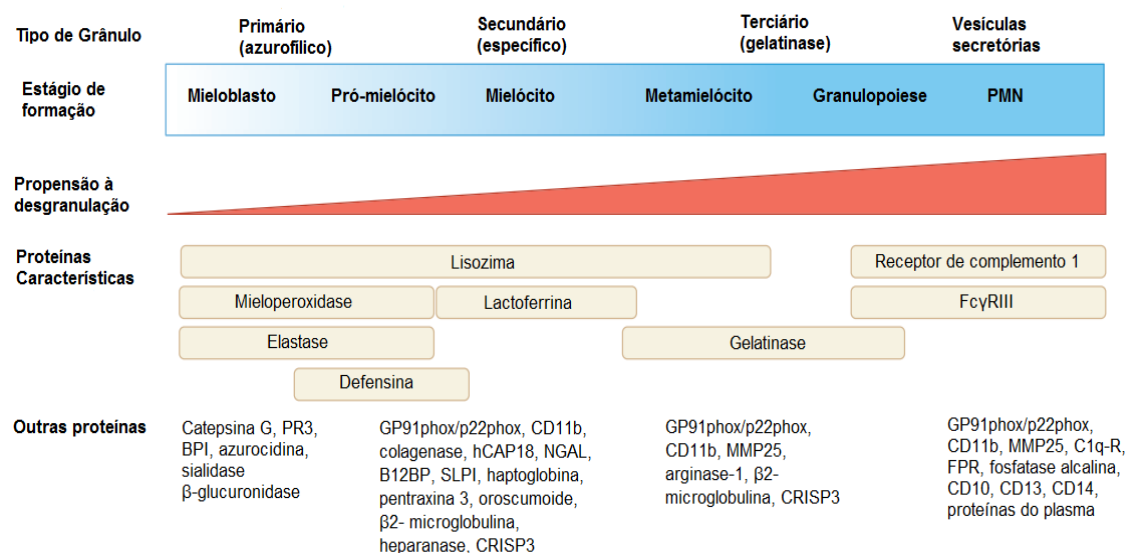


Figura 3 - Os grânulos do neutrófilo. Os neutrófilos possuem três tipos de grânulos contidos em seu citoplasma, sendo eles os azurofílicos, específicos e gelatinase acrescidos das vesículas secretórias. Os grânulos possuem composições diferentes, que podem ser observadas na figura. Além disso divergem no tempo de maturação durante a hematopoiese e na propensão à desgranulação. (Adaptado de Amulic et al., 2012)

Por fim, uma elevada ativação pode fazer com que o neutrófilo produza armadilhas extracelulares, as chamadas NETs (Neutrophil Extracellular Traps). Formadas por DNA descondensado, histonas e proteínas nucleares/granulares, as NETs são capazes de capturar e matar alguns patógenos externos à célula – esquema apresentado na Figura 4.

Recentemente, os mecanismos de formação das NETs vêm sendo examinados, visando compreender melhor por quais vias ocorre esse fenômeno. Sabe-se que a elastase (presente nos grânulos primários) está envolvida no processo de descondensação do material genético celular, e que as EROS,

formadas em especial pela NADPH e pela mieloperoxidase possuem papel de grande importância na geração das NETs. Entretanto, estudos apontam que a via de ativação do neutrófilo é fundamental para compreender o processo desenvolvido até a liberação das armadilhas extracelulares (Kruger *et al.*, 2015).

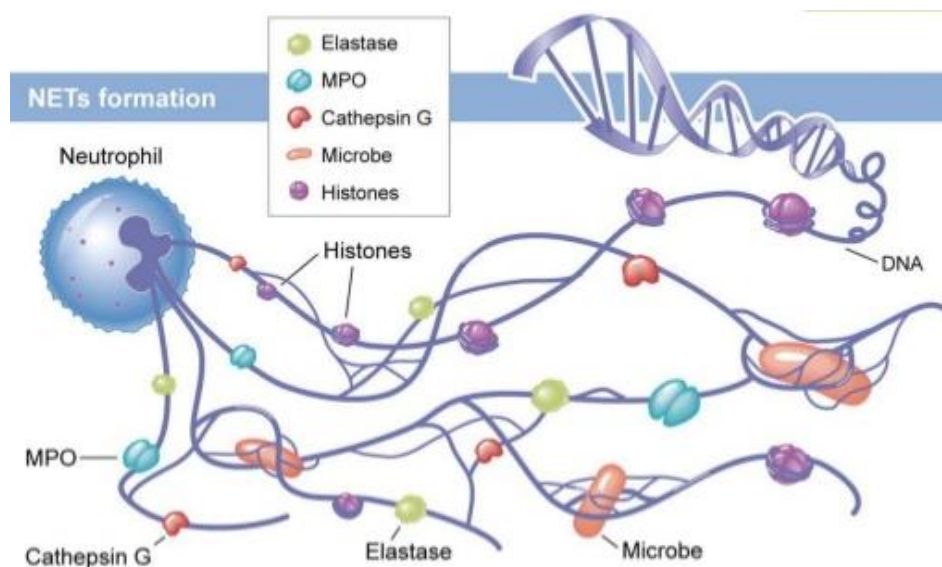


Figura 4. Esquema de liberação das armadilhas extracelulares do neutrófilo. O neutrófilo libera extracelularmente as cromatinas descondensadas associadas à histonas, enzimas e conteúdo dos grânulos citoplasmáticos (Adaptado de Miyata e Fan, 2012).

Diante do exposto, pode-se afirmar que processo inflamatório traz diversos benefícios, dentre eles, podemos citar: diluição das toxinas, acesso de anticorpos, proteínas de fase aguda e componentes do sistema complemento no local de infecção/lesão, transporte de drogas, eficácia no processo de coagulação, aumento da oxigenação e nutrição local e indução da resposta imunológica adaptativa. No entanto, a exacerbação destes processos pode resultar no desenvolvimento de diversas patologias (diabetes, doença de crohn, artrites, etc). Com o intuito de restaurar o equilíbrio da resposta

imunológica e, conseqüentemente, melhorar a qualidade de vida dos indivíduos afetados, novas substâncias capazes de interferir na atividade inflamatória dos neutrófilos e, com efeitos colaterais reduzidos, tem sido alvos de pesquisas recentes. Os vegetais produzem uma ampla gama de compostos, denominados metabólitos secundários (ex, os flavonoides), que têm demonstrado grande importância na inibição de processos inflamatórios.

1.4. FLAVONOIDES

Flavonóides são compostos fenólicos encontrados em vegetais como metabólitos secundários. Sabe-se que nas plantas sua principal sua função é evitar o estresse oxidativo (Agati et al., 2012) além de ter papel também na regulação do crescimento (Taylor e Grotewold, 2005). A estrutura química básica é formada por quinze átomos de carbono, estruturados em dois anéis aromáticos (benzenos) (A e B, como mostrado na figura 1) e ligados por um anel pirano (C) (Figura 5).

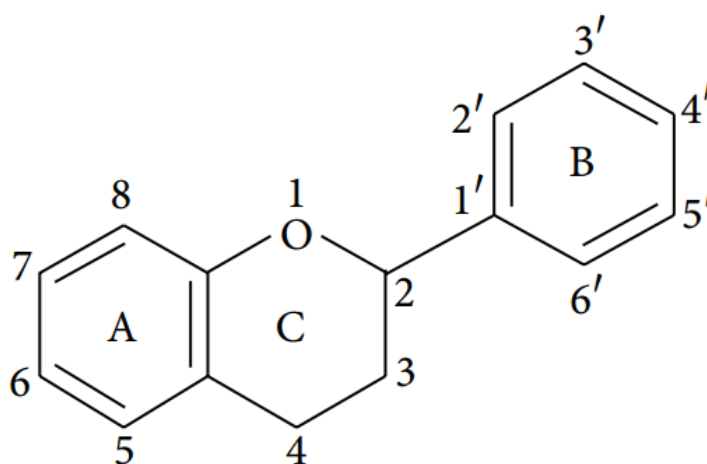


Figura 5. Estrutura básica da molécula de flavonoide. Os anéis aromáticos (benzenos) estão indicados pelas letras A e B, enquanto a letra C demonstra o anel pirano.

Dentre os flavonoides, existem classes, cujos compostos são classificados de acordo com sua estrutura química. Essa diferenciação entre as classes é feita com base nos níveis de oxidação e pelo padrão de substituições no anel pirano (C). Já a organização dentro das classes, é baseada no padrão de substituições nos anéis aromáticos (A e B) (Middleton Jr, 1998). Flavona, flavonol, flavanona, antocianidinas e isoflavonóides são algumas das classes existentes.

Uma questão muito relevante quanto à estrutura química desses metabólitos é a glicosilação. Os compostos podem se apresentar na forma aglicona, glicosídica (mono, di ou tri) e ainda como derivados metilados. A estrutura básica do flavonoide é a forma aglicona. Quando a molécula interage e se liga com carboidratos, geralmente nos carbonos 3 ou 7, dizemos que o flavonóide é glicosídico. Essas interações são importantes pois a forma apresentada influencia na absorção dos compostos pelo organismo, quando ingeridos pela dieta e também em suas atividades biológicas (Kumar e Pandey, 2013). Segundo literatura, a forma aglicona possui potencial antioxidante maior quando comparado à sua forma glicosídica (Ratty e Das, 1988). Entretanto, outros discutem se a glicosilação pode aumentar a biodisponibilidade do flavonoide (Hollman et al., 1999).

Por apresentarem resultados promissores nos tratamentos e/ou prevenção de diversas patologias, as pesquisas acerca dos flavonoides vêm sendo ampliadas há alguns anos. Dentre seus efeitos, já foram descritas ação antibacteriana (Mori e Nishizawa, 1987; Borris, 1996; Cushnie e Lamb, 2005), antiviral (Gerdin e Svensjö, 1982), hepatoprotetora (Saller et al., 2001; He et al., 2004), antitumoral (Lamartiniere et al., 1995; Singhal et al., 1995), anti-

inflamatória (Middleton e Kandaswami, 1992; Tunon et al., 2009; Pan et al., 2010) e antioxidante (Rice-Evans et al., 1996; Van Acker et al., 1996; Pannala et al., 2001; Kumar e Pandey, 2013).

A classe “Flavonol” é uma das mais amplas e é representada dentre outros, pelos compostos: quercetina, kaempferol, galengina, kaempferid, rutina e myricetina (Stewart et al., 2000; Fabre et al., 2001). Além de diversas atividades biológicas descritas para os flavonóides desse grupo, a ingestão usual pela dieta por grande parte da população, torna ainda mais interessante e necessário o conhecimento do potencial desses compostos.

1.4.1. QUERCETINA

A quercetina (3,3',4',5,6-Pentahidroxiflavona) é o flavonóide mais presente em alimentos usuais da dieta humana. Pode ser encontrado em cebolas, maçãs, uvas, tomates, chás, vinho tinto, entre outros (Stewart et al., 2000). Nas plantas, a quercetina geralmente está presente como um de seus derivados glicosídicos, dificilmente em sua forma aglicona (Figura 6). Na cebola por exemplo, pode estar presente como quercetin-4'-glucoside e quercetin-3,4'-glucoside. Outros exemplos de derivados glicosídicos da quercetina são Quercetin-3-rhamnoglucoside, Quercetin-3-galactoside, Quercetin-3-rhamnoside, Quercetin-3-glucoside, onde ocorre a interação de uma ou mais moléculas de glicose no carbono 3 do anel pirano (C) (Erlund, 2004).

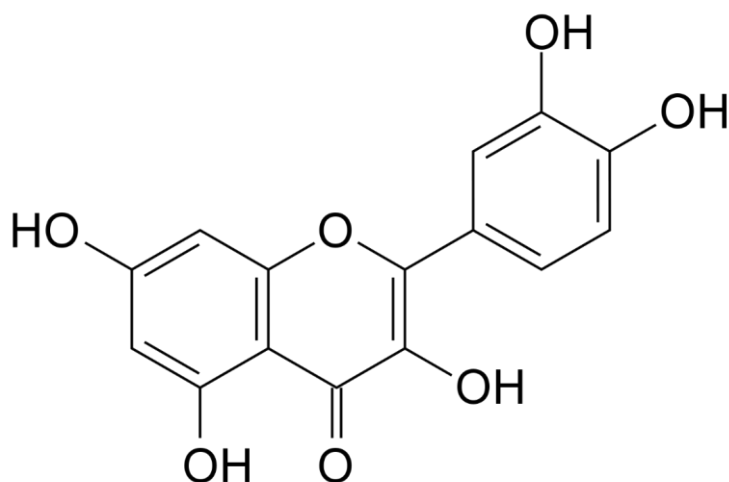


Figura 6. Estrutura da molécula de quercetina em sua forma aglicona.

Tanto por sua disponibilidade, quanto pela fórmula química, sendo a molécula aglicona a base para muitos derivados, a quercetina é o flavonoide melhor descrito atualmente. Já foram reportadas para este metabólito ações anti carcinogênica (Verma et al., 1988; Deschner et al., 1991; Huang et al., 1997), anti-inflamatória (Ferry et al., 1996; Suyenaga et al., 2014), antiviral (Kaul et al., 1985; Vrijssen et al., 1988), antioxidante (Chopra et al., 2000; Carvalho et al., 2010), cardioprotetora (Hollman et al., 1999), dentre outras.

Entretanto, os mecanismos de ação da quercetina à nível molecular e até mesmo celular, por vezes ainda permanecem desconhecidos. As propriedades da quercetina estão associadas a algumas características bioquímicas, como a de quelar íons de metal, sequestrar radicais livres de oxigênio, inibição de enzimas, indução da expressão de enzimas protetivas, entre outras (Erlund, 2004).

1.4.2. RUTINA

O flavonóide rutina (Quercetin-3-rhamnoglucoside ou 3,3',4',5,7-pentahydroxyflavone-3-rhamnoglucoside) pertencente também à classe dos flavonóis possui como estrutura básica, uma molécula de quercetina, ligada a duas moléculas de glicose, sendo elas respectivamente, uma glicose e uma rhamnose, substituintes na posição 3 do anel pirano. A combinação dessas duas moléculas é denominada rutinose, o que confere o nome ao composto (Khalifa et al., 1983) (Figura 7).

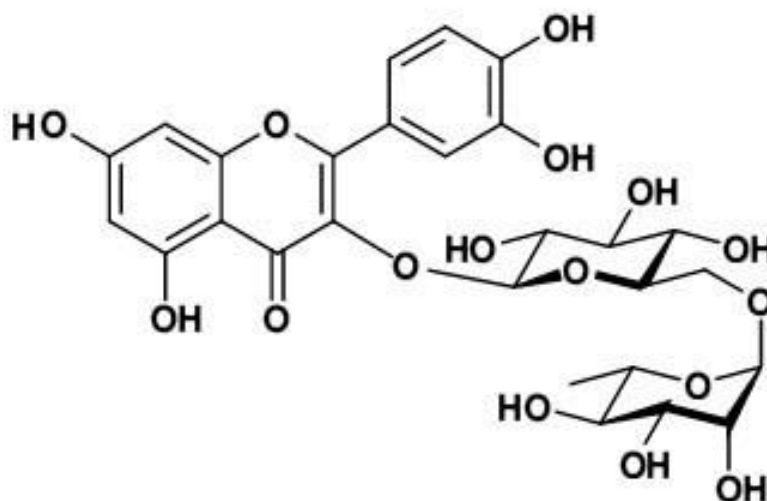


Figura 7. Estrutura da molécula de rutina.

A rutina, assim como a quercetina e demais flavonóides pode ser encontrada em frutas, vegetais e plantas em geral, presentes em nosso cotidiano, como chás, maçãs, feijão, tomate, etc (Thompson et al., 1999). Um dos principais frutos em concentração de rutina é a fava, fruto do faveiro (*Dimorphandra mollis*), espécie arbórea nativa do cerrado brasileiro (Chaves e Usberti, 2003).

Assim como muitos flavonóides, a rutina é objeto de estudo de diversas pesquisas, buscando elucidar suas possíveis ações, funcionalidades e

mecanismos efetores. Dessa forma, é possível encontrar em literatura alguns estudos em que a rutina atua de forma satisfatória no combate, prevenção ou melhora de quadros patológicos.

Podemos citar como exemplo o efeito gastroprotetivo (Abdel-Raheem, 2010) *in vivo* para úlceras e lesões gástricas (La Casa et al., 2000). Potencial anti-diabético (Cervantes-Laurean et al., 2006; Hao et al., 2012), neuroprotetivo (Choi et al., 2006; Gulpinar et al., 2012), anticarcinogênico (Deschner et al., 1991), antioxidante (Yang et al., 2008; Korkmaz e Kolankaya, 2010; Mahmoud, 2012) e anti-inflamatório (Shen et al., 2002; Han, 2009; Lee et al., 2012).

A rutina foi descrita ainda como um potente agente “scavenger”, ou seja, com capacidade de sequestrar radicais livres de oxigênio (Kerry e Abbey, 1997). Rutina apresentou ainda ótimo efeito quando testada no tratamento de artrite em modelo experimental, com redução de até 100% nas lesões observadas (Guardia et al., 2001).

2. OBJETIVOS

Rutina e Quercetina tiveram algumas de suas atividades anti-inflamatórias descritas diante de estímulos relacionados às vias clássicas de receptores de ativação dos neutrófilos, como GPCR, Fc, receptores de adesão, receptores de citocina e TLR.

O presente estudo buscou avaliar a ação destes flavonoides sobre neutrófilos estimulados por PMA (Phorbol 12-Myristate 13-Acetate), um forte indutor da ativação neutrofílica via sinalização de PKC. Para tanto, foram realizados testes de adesão, desgranulação, liberação de NETs e simulação de interação molecular.

3. ARTIGO

AÇÃO INIBITÓRIA DOS FLAVONOIDES QUERCETINA E RUTINA SOBRE A ATIVAÇÃO DE NEUTRÓFILOS HUMANOS

Gabriela Sterle Pereira^a, Igor Percebom^a, Lilian Mai^a, Karina Alves Toledo^{a*}

^aUniv. Estadual Paulista -UNESP, Departamento de Ciências Biológicas,
Faculdade de Ciências e Letras, CEP 19806-900, Assis, SP, Brasil.

*Corresponding author: Karina Alves Toledo, Av Dom Antônio, 2100, Parque
Universitário, ZIP 19806-900, Assis/SP, Brazil. Tel: + 55-18-3302-5848; E-mail
address: karinalves@assis.unesp.br

RESUMO

Rutina e Quercetina são flavonoides encontrados em diversos alimentos, incluindo aqueles indicados como complemento no tratamento de doenças inflamatórias. Durante o processo inflamatório, neutrófilos são as primeiras células a serem recrutadas por estarem diretamente relacionadas à ativação e resolução destes processos. Assim, frequentemente estas células são alvos para novos compostos anti-inflamatórios. A descrição da atividade anti-inflamatória de rutina e quercetina se estende para vários ativadores das vias clássicas dos neutrófilos. O estudo quanto aos compostos forbol ésteres, como PMA (phorbol myristate acetate), que ativam de maneira específica a sinalização da proteína kinase C, ainda são escassos. O objetivo deste trabalho foi analisar a atividade anti-inflamatória de rutina e quercetina sobre neutrófilos ativados por PMA. Para tanto, foram analisadas etapas importantes do processo inflamatório mediadas pelos neutrófilos: adesão, desgranulação, e liberação das NETs (Neutrophil Extracellular Traps). Nossos resultados demonstraram que (i) rutina e quercetina não inibem a adesão dos neutrófilos, (ii) quercetina inibe a desgranulação, (iii) ambos inibem a atividade da mieloperoxidase (MPO), assim como (iv) inibem a liberação das NETs na ausência de morte celular. Análises de *docking molecular* sugerem que tais eventos podem estar relacionados à interação destes flavonoides com enzimas MPO e elastase.

Palavras-chave: rutina, quercetina, neutrófilos, inflamação, PMA, PKC.

INTRODUÇÃO

A inflamação é um processo que inclui uma resposta imune complexa, que ocorre em várias etapas e pode ser causada por agentes químicos, físicos, microbiológicos e imunológicos. Ela envolve o recrutamento de leucócitos, em primeira linha neutrófilos. Os neutrófilos foram considerados um alvo para intervenção farmacológica dada a sua capacidade para matar microorganismos, para iniciar e amplificar o processo inflamatório. O recrutamento de neutrófilos e a ativação de suas atividades inflamatórias requerem uma complexa sequência de eventos, incluindo a adesão celular, desgranulação e, mais recentemente, armadilhas extracelulares dos neutrófilos liberação (NET) (Kruger et al., 2015). O controle do processo inflamatório é fundamental devido aos riscos associados: danos nos tecidos, perda da funcionalidade de órgãos ou mesmo morte.

Compostos inflamatórios podem estimular vias clássicas de ativação dos neutrófilos através de receptores expressos na membrana plasmática, como: receptores acoplados à proteína G (GPCR), receptores Fc, receptores de adesão, receptores de citocina e receptores Toll-like (Futosi et al., 2013). Alternativamente, a ativação neutrofílica proporcionada por agentes forbois, como Phorbol 12-Myristate 13-Acetate (PMA), ocorre através do estímulo da Proteína Quinase C (PKC) e não por receptores de membrana como nas vias clássicas.

Plantas medicinais e seus ativos assumem destaque na medicina popular, principalmente pelas suas atividades anti-inflamatórias no tratamento de feridas e infecções (Baliga, 2011; Rizvi e Mishra, 2013). Substâncias de natureza química diversas (flavonóides, taninos e terpenos) são responsáveis por vários

destes efeitos biológicos (Costa et al., 2000; Grangeiro et al., 2006; Leite et al., 2010; Tenfen et al., 2015).

Os flavonoides chamam a atenção por possuírem uma gama de efeitos promissores para o desenvolvimento de fármacos. A quercetina apresenta bons resultados como antioxidante, anti-inflamatório, anti-histamínico, imunomodulador, dentre outros (Formica e Regelson, 1995; Kumar e Pandey, 2013). A rutina também já foi descrita por sua ação anti-inflamatória em processos de lesão pulmonar aguda (Chen et al., 2014; Huang et al., 2014), gastrites (Abdel-Raheem, 2010) e lesões gástricas (La Casa et al., 2000) além da função antioxidante (La Casa et al., 2000; Afanas'eva et al., 2001; Guardia et al., 2001).

Diversos trabalhos têm relatado a atividade anti-inflamatória de Quercetina e Rutina em neutrófilos classicamente ativados. No entanto, existe ainda uma carência de estudos que avaliem o potencial destes flavonoides que apresentam a via de PKC ativada. Aqui, nosso objetivo foi realizar a avaliação da atividade anti-inflamatória da quercetina e da rutina em neutrófilos estimulados por PMA.

MATERIAIS E MÉTODOS

Quercetina e Rutina

Os compostos utilizados foram adquiridos, já isolados e puros, da marca Sigma. Para todos os ensaios as concentrações utilizadas foram as mesmas, sendo elas: 3.12-50 μ M para quercetina e 9-150 μ M para rutina.

Isolamento de neutrófilos por método de gelatina

O sangue periférico foi em tubos contendo anticoagulante citrato de sódio 3,2%. A punção venosa foi realizada em voluntários saudáveis que não estavam fazendo uso de substâncias anti-inflamatórias. O isolamento de neutrófilos foi realizado de acordo com a metodologia previamente descrita (Henson, 1971b; a; Lucisano e Mantovani, 1984). Os tubos contendo o sangue foram centrifugados (10 minutos, 1250g) e o plasma removido. Foi então adicionada solução de gelatina a 2.5% em NaCl 0.15M, que permaneceu dessa maneira por 15 minutos em banho maria à 37°C. O sobrenadante contendo neutrófilos foi então diluído em NaCl 0.15M e centrifugado novamente (10 minutos, 800g). Para a lise das hemácias remanescentes foi adicionado 5ml de NaCl 0.2% por 1 minuto. Em seguida, foi adicionado 5 ml de NaCl 1.6% e levado à centrifuga (10 minutos, 800g). O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 1 mL de solução tamponante (específica para cada ensaio). Os neutrófilos foram corados com Turk para a realização da contagem em câmara de Neubauer.

Todos os ensaios foram realizados seguindo os princípios éticos em pesquisa humana, recomendados pelo Comitê de Ética da Faculdade de Ciências e Letras de Assis, UNESP (procedimentos aprovados sob registro nº 57233716.8.0000.5401).

Viabilidade Celular (Ensaio MTT)

A citotoxicidade foi avaliada através do método colorimétrico com MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) 2,5-Diphenyl Tetrazolium bromide), o qual consiste em medir indiretamente a viabilidade celular pela atividade enzimática mitocondrial.

Os neutrófilos humanos, em concentração de 2.5×10^5 foram dispostos em uma placa de cultura de 96 poços, onde foram incubados em diferentes concentrações de Quercetina (3.12-50 μM) e Rutina (9-150 μM) diluídas em 100 μL de meio de cultura. Após 1-4hs de incubação sob 37°C, foi adicionado 10 μL da solução de MTT (1mg/mL) e aguardadas mais duas horas. Os cristais de formazan presentes nas células viáveis foram diluídos pela adição de 50 μL de DMSO (Dimethyl Sulfoxide) e a absorbância das amostras mensurada em espectrofotômetro a 560nm. Neutrófilos foram incubados somente em meio de cultura para controle negativo e em meio de cultura acrescido de água oxigenada (H_2O_2) como positivo de morte. A metabolização do sal é diretamente proporcional a viabilidade celular, possibilitando inferir a viabilidade celular a partir da absorbância mensurada. Os valores das absorbâncias foram convertidos em porcentagens pela equação: Citotoxicidade celular (%) = valor da amostra x 100 / média controle.

Adesão Celular

Neutrófilos humanos (4×10^5) diluídos em meio de cultura RPMI com 5% de Soro Fetal Bovino foram incubados em placas de 96 poços, na presença de diferentes concentrações de Quercetina (3.12-50 μM) e Rutina (9-150 μM) durante 15 minutos, para que fosse possível a sedimentação celular. As células foram então estimuladas com Phorbol Myristate Acetate (PMA 20nM) por 1 hora à 37°C. As células que não aderiram foram removidas através da lavagem da placa com NaCl 0.15M. O teste Bicinchoninic Acid (BCA; Pierce) foi utilizado para evidenciar o conteúdo proteico presente nos poços em virtude da células aderentes. A absorbância dos poços foi mensurada à 560nm em um leitor de microplaca.

Secreção de Mieloperoxidase

A liberação de mieloperoxidase (MPO) no processo de desgranulação foi mensurada de acordo com o seguinte processo: Neutrófilos humanos (2×10^5), purificados através do método histopaque, foram diluídos em meio de cultura e incubados por 30 minutos, na presença de diferentes concentrações de Quercetina (3.12-50 μM) e Rutina (9-150 μM), e então, estimulados através de PMA (80 nM) por 3 horas à 37°C. Ao fim da incubação, neutrófilos serão centrifugados (457 g, por 5 minutos) e o sobrenadante, incubado na presença de TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine) – um substrato para peroxidases. Após 10 minutos e a amostra ter obtido tom azulado, é adicionado o stopper, que para a reação. A absorbância das amostras foi mensurada à 405nm no leitor de microplaca.

Atividade da Mieloperoxidase

Neutrófilos humanos (2×10^5), purificados através do método histopaque, foram diluídos em meio de cultura e estimulados através de PMA (50 nM) por 3 horas à 37°C em placa de 6 poços. Ao fim da incubação, neutrófilos foram centrifugados (457 g, por 5 minutos) e ao sobrenadante foram adicionadas diferentes concentrações dos flavonoides rutina e quercetina e em seguida incubado na presença de TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine) – um substrato para peroxidases. Após 10 minutos e a amostra ter obtido tom azulado, foi adicionada solução *stopper*. A absorbância das amostras foi mensurada à 405nm no leitor de microplaca.

Liberção de NETs

Neutrófilos humanos (2×10^5) foram incubados com diferentes concentrações de Quercetina (3.12-50 μ M) e Rutina (9-150 μ M) durante 30 minutos e então estimulados com PMA (80nM) por 4 horas, à 37°C. As NETs geradas pela atividade neutrofílica foram quantificadas no sobrenadantes daquelas células utilizando Picogreen dsDNA kit (Invitrogen), de acordo com o recomendado pelo fabricante.

Docking Molecular

Os *dockings* proteína-ligantes foram executados com o programa Auto-Dock Vina 1.1.2, usando o plugin AutoDock/Vina PyMOL (Trott e Olson, 2010). Os arquivos SDF da quercetina e da rutina foram obtidos da base de dados PubChem, sendo convertidos a arquivos de PDB e completos com hidrogênios usando o programa UCSF Chimera (Pettersen *et al.*, 2004). O programa UCSF Chimera também foi usado para minimizar as estruturas dos compostos. A simulação de *docking* foi realizada usando o algoritmo genético como gradiente local de otimização. Para cada simulação de docking da elastase uma caixa de 108,27 x 82,34 x 19,68 (*grid points* nos eixos X, Y, Z) que foi centralizada nos sítios catalíticos ALA70, ASN117, HIS57 e SER195 e nos sítios ativos (ASN61, LEU99, LEU143). Para Mieloperoxidase as dimensões foram de 29,41 x 4,54 x 38,53 que foi centralizada no agrupamento heme. A afinidade dos compostos dockados foi expressa em termos de energia de ligação (kcal/mol). Cada simulação de *docking* levou cerca de 10 minutos em uma estação de trabalho Intel i7 CPU.

Análise estatística

Os dados experimentais foram avaliados por análise de variância (ANOVA one-way) seguido por teste de Bonferroni. Adotou-se um nível de significância de 5%. Todos os ensaios foram realizados em triplicata, pelo menos, em três ensaios independentes.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O processo inflamatório é um evento extremamente regulado e sincronizado em que as primeiras células a serem recrutadas para o sítio de dano/infecção são os neutrófilos. A migração dos neutrófilos apresenta etapas fundamentais para que estas células cheguem ao foco inflamatório e exerçam suas funções microbidas. Dentre elas, podemos citar a adesão, a desgranulação e a liberação das NETs. Neste estudo, nós avaliamos tais etapas em neutrófilos humanos pré-incubados com quercetina ou rutina e estimulados por PMA.

A adesão dos neutrófilos é um evento inicial na migração destas células e que é dependente de moléculas de adesão (integrinas) presentes tanto na superfície dos neutrófilos como do endotélio. Neutrófilos estimulados por PMA aderiram firmemente em placas de 96 poços após 1h de incubação (Figuras 1A e 1B). O mesmo efeito foi observado em neutrófilos estimulados por PMA mas que haviam sido pré-incubados com quercetina (Figura 2A) ou rutina (Figura 2B). Assim, podemos dizer que nenhum dos flavonoides testados foi capaz de inibir a adesão de neutrófilos induzida por PMA.

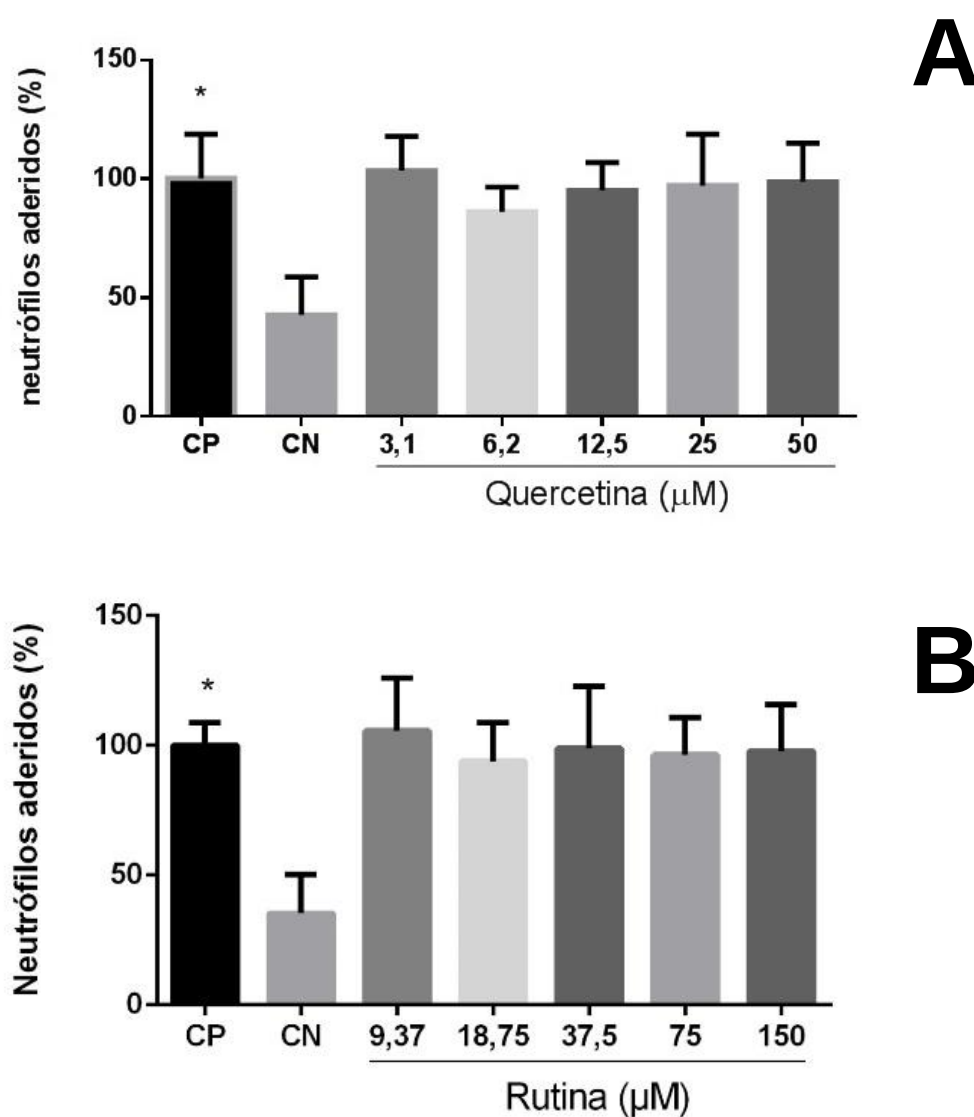


Figura 1. Quercetina e Rutina não alteram a adesão de neutrófilos. Neutrófilos (4×10^5) foram incubados em diferentes concentrações de quercetina (A) ou rutina (B) e posteriormente estimulados à adesão por PMA (20nM). A aderência foi quantificada por método colorimétrico BCA. Neutrófilos foram estimulados com PMA para Controle Positivo (CP) de adesão e neutrófilos apenas em meio de cultura foram utilizados como Controle Negativo (CN). * $p < 0.05$ em relação ao CN.

Segundo Souto et al., 2011, a quercetina reduz o recrutamento de neutrófilos, porém não pela diminuição de receptores de membrana relacionados à adesão celular. (Suyenaga et al., 2014) apontam inclusive que a quercetina aumenta a expressão de moléculas envolvidas na adesão, como a L-Selectina e $\beta 2$ Integrina, sem afetar sua afinidade. A inibição do recrutamento apresentado pela quercetina está ligada à expressão das quinases intracelulares que ao serem inibidas, impedem a polimerização do citoesqueleto, o que inviabiliza a migração quando estimulada por agentes ativadores das vias clássicas (Souto et al., 2011). A ativação direta da Proteína Quinase C (PKC) por PMA poderia assim estar impossibilitando a inibição desta quinase pela quercetina e consequentemente do processo de adesão celular.

A rutina já foi apontada como uma moduladora para a expressão de moléculas de adesão de células epiteliais (Son et al., 2001), entretanto é relatado em modelo *in vivo* que a rutina não exerce papel inibitório na migração de neutrófilos (La Casa et al., 2000; Suyenaga et al., 2014), o que demonstra que o processo de adesão não sofreu alterações. Portanto, a literatura auxilia e reforça a ideia de que quercetina e rutina não apresentam efeito direto na inibição da adesão neutrofílica.

Os primeiros estágios de ativação dos neutrófilos envolvem também o início do processo de desgranulação. A liberação dos grânulos nos neutrófilos ocorre sequencialmente sendo as vesículas secretórias as primeiras a se mobilizarem seguidas pelos grânulos secundários (gelatinase), grânulos específicos e por fim, os azurofílicos. A enzima elastase se encontra especialmente concentrada nos grânulos azurofílicos, assim como a enzima Mieloperoxidase (MPO). Assim, a quantificação de ambas enzimas no

sobrenadante dos neutrófilos indicam se as células realizaram a secreção de todos os 4 tipos de grânulos, tendo sido completo o processo de desgranulação. Portanto tal mensuração traz importantes informações a respeito do nível de ativação celular.

A liberação do conteúdo dos grânulos auxilia o neutrófilo na execução das diferentes etapas necessárias ao seu recrutamento e ação microbida, já que são também imprescindíveis para a fagocitose e liberação das NETs (armadilhas extracelulares do neutrófilo). Em um estudo recente de Costa e colaboradores, 2016, foram apresentados dados demonstrando que o extrato das folhas da espécie arbórea *Eugenia punicifolia*, a qual contém dentre outros flavonoides, alguns derivados de quercetina, é capaz de inibir a desgranulação de neutrófilos. Visando analisar a possível inibição dessa função neutrofílica pelos flavonoides, foi realizada a dosagem de Mieloperoxidase (MPO) presente no sobrenadante após estímulo com PMA.

Como esperado, a quercetina apresentou função inibitória no processo de desgranulação neutrofílica, uma vez que os níveis de Mieloperoxidase no sobrenadante foram inferiores à amostra controle, que foi incubada apenas na presença de PMA. Nas concentrações de 25 μ M e 50 μ M, as taxas de MPO são significativamente menores do que aquela apresentada pelo PMA somente (CP).

A desgranulação é uma função de extrema importância para o sistema imune, já que libera mediadores importantes para a eliminação de patógenos extracelulares. Entretanto, sabe-se que a liberação dos grânulos pode levar também a injúrias no tecido saudável, uma vez que os grânulos não possuem especificidade, podendo estar associado inclusive aos casos como artrite

reumatóide, lesões pulmonares, entre outras. Desta forma, suprimir esse processo pode ter grande relevância para resolução do quadro inflamatório.

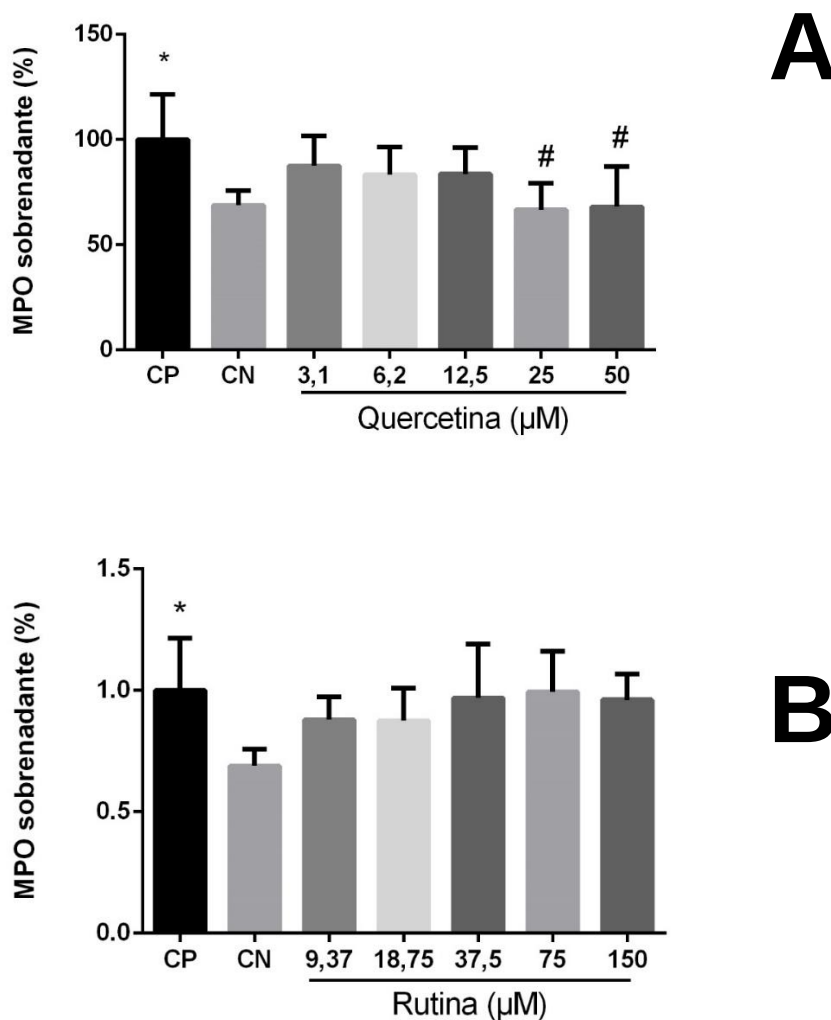


Figura 2. Quercetina interfere no processo de desgranulação. Neutrófilos humanos (2×10^5) foram incubados com diferentes concentrações de quercetina (A) ou rutina (B) por 30 minutos e então estimulados à desgranulação com PMA (80nM). A quantificação de MPO liberada foi feita utilizando-se o método de TMB. Neutrófilos foram estimulados com PMA para Controle Positivo (CP) de desgranulação e neutrófilos mantidos apenas em meio de cultura foram utilizados como Controle Negativo (CN). * $p < 0,05$ em relação ao controle negativo (CN); # $p < 0,05$ em relação ao controle positivo (CP).

Ao contrário da quercetina, a rutina não apresentou capacidade de conter o processo de desgranulação, uma vez que os níveis de MPO livre no sobrenadante não possuem diferença estatística em relação ao controle positivo (CP), demonstrando que todos os tipos de grânulos foram mobilizados.

É presente na literatura a ação inibitória de ambos os flavonoides sobre a atividade da Mieloperoxidase (Kostyuk et al., 2003; Regasini et al., 2008). A mieloperoxidase é uma enzima da família das peroxidases e está presente nos grânulos dos neutrófilos. A principal ação da MPO consiste em catalisar a reação entre íons cloreto (Cl^-), brometo (Br^-) e iodeto (I^-) com o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), advindo da atividade da NADPH, para a formação ácido hipocloroso (HOCl), ácido hipobromoso e ácido hipoiodoso, respectivamente (Ribeiro et al., 2015). Além disso, a MPO é liberada juntamente com os filamentos de DNA no momento da extrusão das NETs e tem papel também na geração das mesmas, não só pela geração das EROS (Papayannopoulos et al., 2010).

Tendo em vista os dados da literatura e a importância dessa enzima para as funções neutrofílicas, foi realizado o teste catalítico da enzima. Os neutrófilos foram estimulados com PMA e incubados por 4 horas, tempo suficiente para que ocorra total mobilização dos grânulos. Após o tempo estipulado, foram adicionados aos poços diferentes concentrações dos flavonoides se na presença deles, MPO seria capaz de oxidar o substrato TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine).

O resultado encontrado corrobora com o descrito na literatura. Tanto rutina quanto quercetina foram capazes de diminuir a atividade enzimática da Mieloperoxidase (Figura 3). Apesar de apresentar uma tendência à queda na maioria das amostras, a quercetina em concentração de $50\mu\text{M}$ foi a que

apresentou diferença estatisticamente relevante, demonstrando decréscimo em torno de 40% na capacidade oxidativa da enzima. Embora mais discreta, a rutina em concentração de 150 μM apresentou também queda na taxa de atividade da MPO.

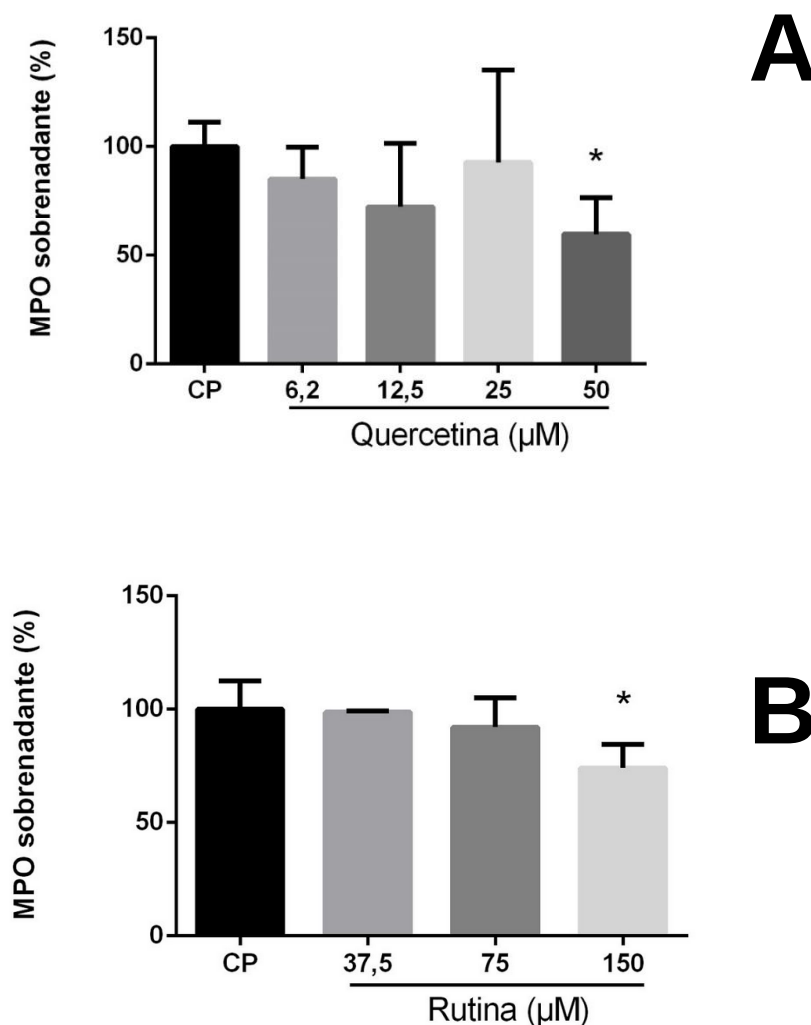


Figura 3. Quercetina e rutina inibem a ação enzimática da Mieloperoxidase. Neutrófilos humanos (2×10^5) foram estimulados com PMA (80nM) e incubados por um período de 4 horas. Após o tempo determinado foram adicionadas diferentes concentrações de quercetina (A) ou rutina (B) por 10 minutos. A atividade enzimática foi aferida pelo substrato para MPO (TMB). Neutrófilos estimulados com PMA, sem adição dos flavonoides foram utilizados como Controle Positivo (CP). * $p < 0,05$ em relação ao controle positivo PMA.

Apesar da rutina já ter sido utilizada como inibidora da Mieloperoxidase (Maseneni et al., 2013), é descrito que a quercetina possui melhor ação inibitória da enzima quando ambas são testadas (Pincemail et al., 1988; Kostyuk et al., 2003; Regasini et al., 2008), acompanhando o que nossos ensaios apresentaram.

O resultado inibitório de ambos os flavonoides pode ser relacionado à estrutura química, já que a presença do grupo catecol é considerado de grande importância para a capacidade de inibição da mieloperoxidase (Kanashiro et al., 2007; Regasini et al., 2008). A quercetina possui na posição C3 uma hidroxila livre, que é um grupo de importância para a função *scavenger* do flavonoide (Bors et al., 1990). Em contraponto, a rutina, que é um derivado glicosídico da quercetina, possui na mesma posição uma porção glicosídica, sendo a substituição feita por uma glicose e uma ramnose. A glicosilação diminui o potencial antioxidante dos flavonoides em geral, que também é uma afirmação correta em relação à rutina e quercetina (Regasini et al., 2008). A substituição no C3 pode ser a razão do resultado mais expressivo da quercetina.

Além dos mecanismos clássicos utilizados pelos neutrófilos no processo inflamatório como o *burst* oxidativo, a desgranulação e a fagocitose existe ainda mecanismos mais recentes como as NETs – Armadilhas Extracelulares dos Neutrófilos (Neutrophil Extracellular Traps). A liberação das NETs é a última das ferramentas do neutrófilo para a captura e eliminação dos patógenos, onde o neutrófilo expõe seu material genético (DNA e histonas) juntamente com o conteúdo de seus grânulos (Amulic et al., 2012).

Neutrófilos estimulados por PMA apresentaram liberação das NETs de acordo com a descrição da literatura (Figuras 4A e 4B). Em nossas amostras-teste, neutrófilos foram primeiramente incubados com quercetina ou rutina e posteriormente estimulados com PMA. A presença da quercetina foi capaz de reduzir a liberação das NETs de maneira estatisticamente significativa apenas na concentração de 50 μ M (Figura 4A). Concentrações abaixo de 50 μ M não apresentaram qualquer efeito. Por outro lado, a pré-incubação dos neutrófilos com rutina não somente reduziu como inibiu por completa a liberação das NETs induzida por PMA (Figura 4B). Tal resultado ampara-se no que foi descrito por Kirchner e colaboradores em 2013, em relação à rutina, que não inibiu desgranulação, quimiotaxia, nem a capacidade fagocítica, porém inibiu a geração de NETs.

A liberação das NETs tem sido relacionada a produção de espécies reativas do oxigênio (EROS) pelos neutrófilos durante a ativação do *burst* oxidativo pelas enzimas NADPH oxidase e Mieloperoxidase (Fuchs et al., 2007; Patel et al., 2010; Metzler et al., 2011). A ação antioxidante dos flavonóides consiste no sequestro de radicais livres de oxigênio, função também chamada de “*scavenger*”. Esta redução na disponibilidade de EROS prejudica o funcionamento das enzimas NADPH e da mieloperoxidase. Assim, se não fosse pela capacidade antioxidante reduzida da rutina em comparação à quercetina, o sequestro de EROS poderia explicar o resultado inibitório de NETs ora apresentado.

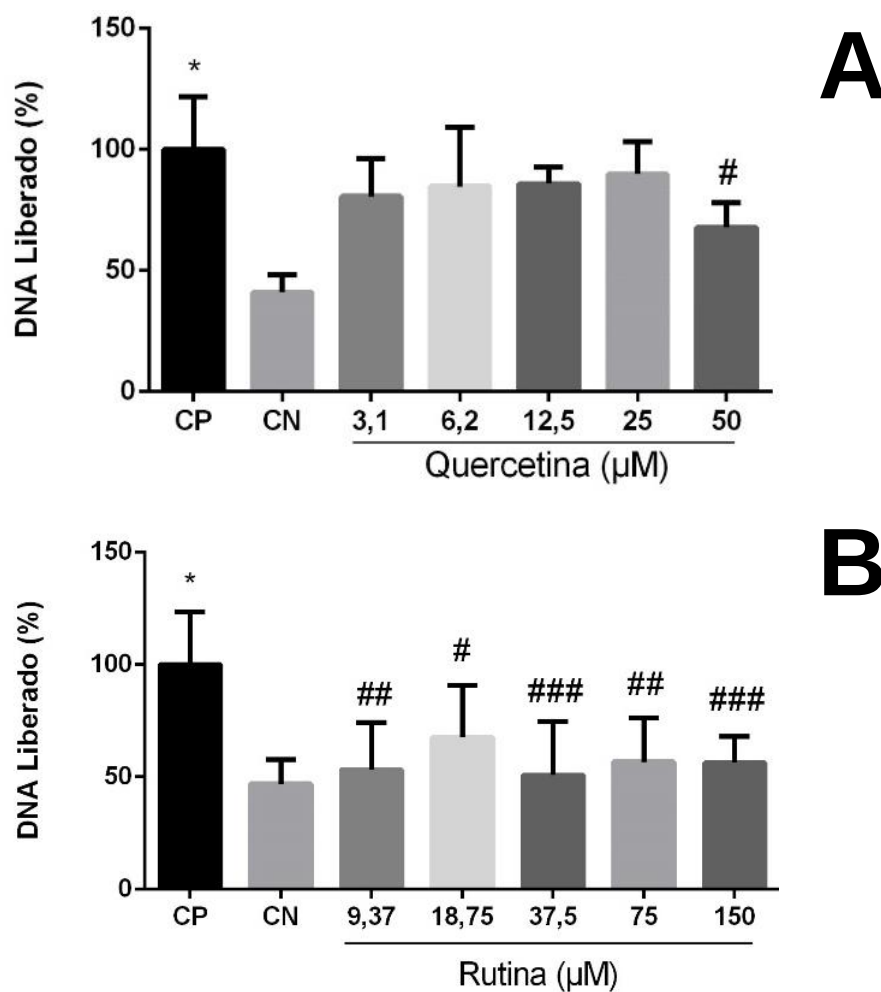


Figura 4. Quercetina e Rutina reduzem a liberação das NETs. Neutrófilos humanos (2×10^5) foram incubados com diferentes concentrações de quercetina (A) ou rutina (B) por 30 minutos e então estimulados à liberação de NETs com PMA (80nM). Neutrófilos foram estimulados com PMA para Controle Positivo (CP) de NETs e neutrófilos mantidos apenas em meio de cultura foram utilizados como Controle Negativo (CN). * $p < 0,0001$ em relação ao controle negativo (CN); # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ em relação ao controle positivo (CP).

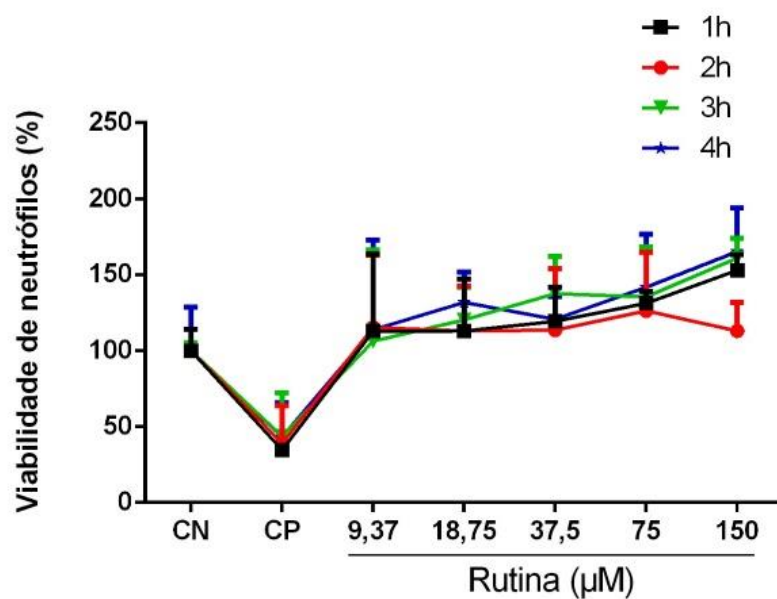
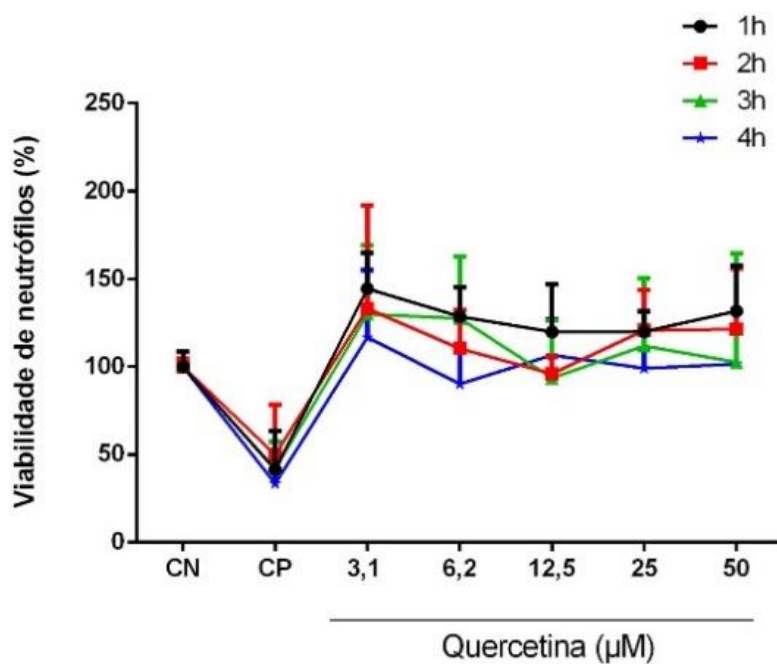


Figura 5. A viabilidade celular dos neutrófilos não é alterada pela presença de quercetina ou rutina. Neutrófilos humanos, em concentração de 2.5×10^5 , foram incubados em diferentes concentrações de quercetina (A) e rutina (B). A viabilidade foi avaliada em 1, 2, 3 e 4 horas através do método de MTT (1 mg/mL). Meio de cultura e água oxigenada (H_2O_2 ; $50 \mu M$) foram utilizados como Controle Negativo (CN) e Controle Positivo (CP) de morte, respectivamente.

Uma segunda hipótese, poderia relacionar a redução na liberação das NETs com a morte celular que eventualmente a presença destes flavonoides tenha induzido. A fim de avaliar esta questão, neutrófilos foram incubados com quercetina ou rutina nas mesmas concentrações utilizadas previamente. O período de incubação foi estendido de 1-4 horas. Em todas as concentrações testadas, na presença de ambos flavonoides, os neutrófilos mantiveram taxas de viabilidade celular semelhantes aquelas apresentadas pelo controle negativo de morte (Figuras 5A e 5B). A análise estatística não demonstrou qualquer diferença entre as amostras, exceto em relação ao controle positivo de morte.

Descartada a possibilidade de morte celular, pode-se ainda sugerir uma possível interação do tipo proteína-ligante entre os flavonoides e proteínas importantes no processo de liberação das NETs. A elastase é uma enzima descrita como fundamental no processo de descondensação do DNA e, portanto, na geração das NETs. Mieloperoxidase, embora não seja fundamental, age em sinergismo com elastase, potencializando a liberação das armadilhas extracelulares de forma independente da sua ação enzimática (Papayannopoulos et al., 2010).

Ferramentas computacionais foram utilizadas para investigar possíveis interações entre as enzimas elastase e mieloperoxidase e os flavonoides rutina e quercetina. O *docking* molecular, que consiste em uma simulação da interação entre os compostos, demonstrou que ambos flavonoides interagem com o radical heme de Ferro da mieloperoxidase, através da interação na região de anéis aromáticos chamada de *stacking* aromático (Figuras 6 e 7). Tal ligação é muito estável, o que explica a inibição apresentada, já que o grupo heme é uma região de grande importância (Cockroft et al., 2005).

A energia de interação entre as moléculas foi bem próxima para quercetina (-8,4 kcal/mol) e rutina (-8,8 kcal/mol). A quercetina interagiu com os resíduos GLN91, SER233 e ainda com o HIS95, sítio catalítico da enzima, por meio de interações de carga (Figura 6) (Davey e Fenna, 1996). A Rutina demonstrou interação com os resíduos, GLU102, ARG232, GLN91, MET87 e também com o sítio catalítico HIS95 (Figura 7) (Davey e Fenna, 1996).

Sendo a quercetina uma molécula hidrofóbica (Shiba et al., 2008), a interação com a região do bolsão do radical heme, também hidrofóbica, é favorecida em relação à rutina, que possui substituição glicosídica na posição C-3 de sua estrutura, o que confere característica mais hidrofílica à molécula. A característica hidrofóbica da quercetina, associada aos dados de *docking molecular*, corroboram com os dados experimentais onde quercetina foi mais eficiente na inibição da liberação e atividade enzimática de MPO.

A interação entre elastase e os compostos foi também satisfatória, já que ambos flavonoides apresentaram interação próxima ao sítio catalítico da enzima (Allen et al., 1996; Mattos et al., 2006). A energia de ligação para a quercetina foi de -6,4 kcal/mol e a da rutina de -7kcal/mol. A quercetina interagiu com os resíduos GLY193 e CYS58, enquanto a rutina interagiu com GLY193 e VAL215 (Figuras 8 e 9). Neste caso, o complexo elastase-rutina demonstrou maior estabilidade em virtude de sua baixa energia de ligação em relação à quercetina. Além disso, a interação da rutina com o resíduo de VAL215 ocorreu numa região muito próxima (VAL 216) daquela já descrita para outros potentes inibidores de elastase (Von Nussbaum et al., 2016).

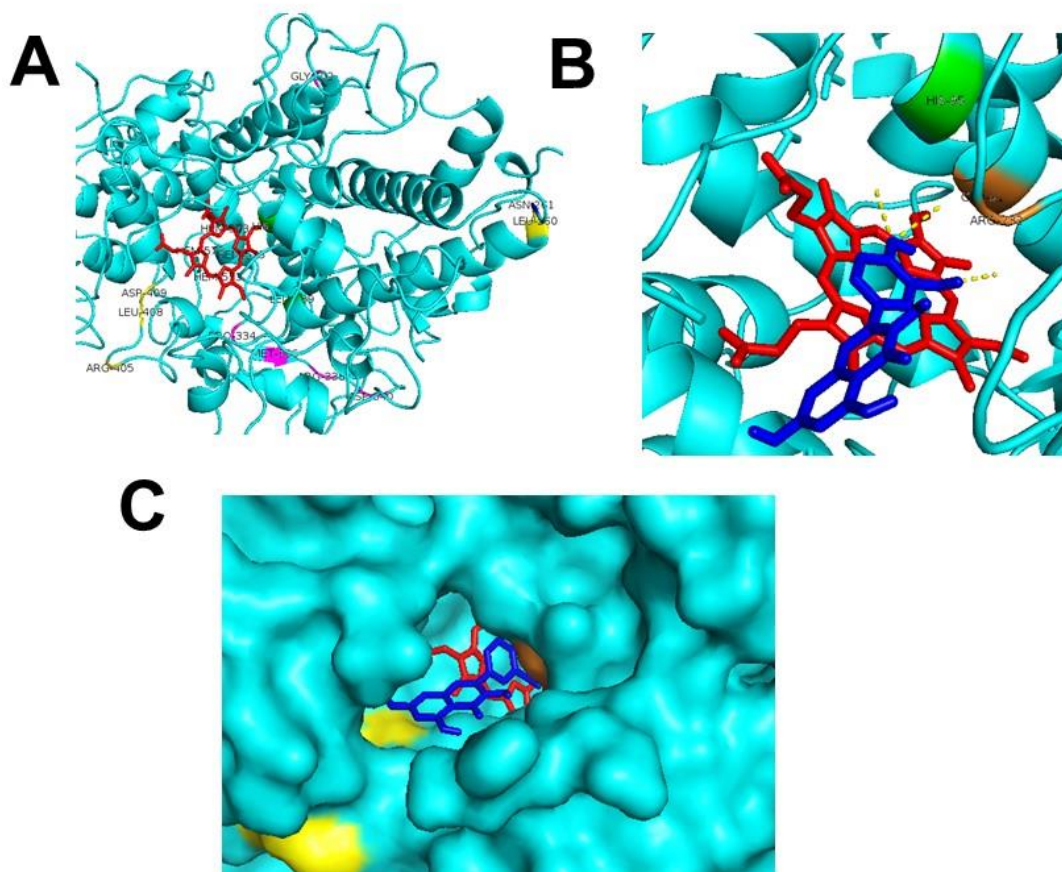


Figura 6. Docking molecular do complexo Quercetina / Mieloperoxidase. A) Estrutura tridimensional da mieloperoxidase humana (PDB ID 4C1M), representada em cartoon. A molécula foi obtida no banco de dados PDB (Protein Data Bank). Em amarelo encontram-se destacados os sítios de ligação da molécula (resíduos LEU260, ARG405, LEU408, ASP409), em azul o sítio ativo (ASN261), em verde o sítio catalítico (HIS95 e LEU239), em rosa estão marcadas as ligações com metal (GLN333, MET336, ARG338, ASP340 e GLY502). B) Local de interação da quercetina, representada em sticks na cor azul. Em laranja estão marcados os resíduos com os quais há interação polar (HIS95 – sítio catalítico, GLN91, SER233) entre o ligante e a proteína. D) MPO em representação de superfície no *docking* com a quercetina.

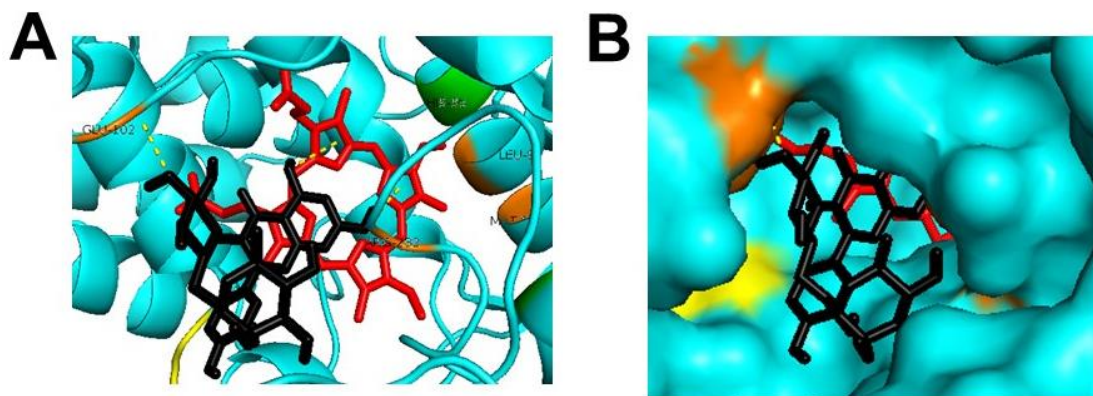


Figura 7. Figura 6. Docking molecular do complexo Rutina / Mieloperoxidase. A) Estrutura tridimensional da mieloperoxidase humana (PDB ID 4C1M), representada em cartoon. A molécula foi obtida no banco de dados PDB (Protein Data Bank). Em amarelo encontram-se destacados os sítios de ligação da molécula (LEU260, ARG405, LEU408, ASP409), em azul o sítio ativo (ASN261), em verde o sítio catalítico (HIS95 e LEU239), em rosa estão marcadas as ligações com metal (GLN333, MET336, ARG338, ASP340 e GLY502). B) Local de interação da rutina, representada em preto. Em laranja estão marcados os resíduos com os quais há interação polar (HIS95, GLU102, ARG232, GLN91, MET87) entre o ligante e a proteína. D) MPO em representação de superfície no *docking* com a quercetina.

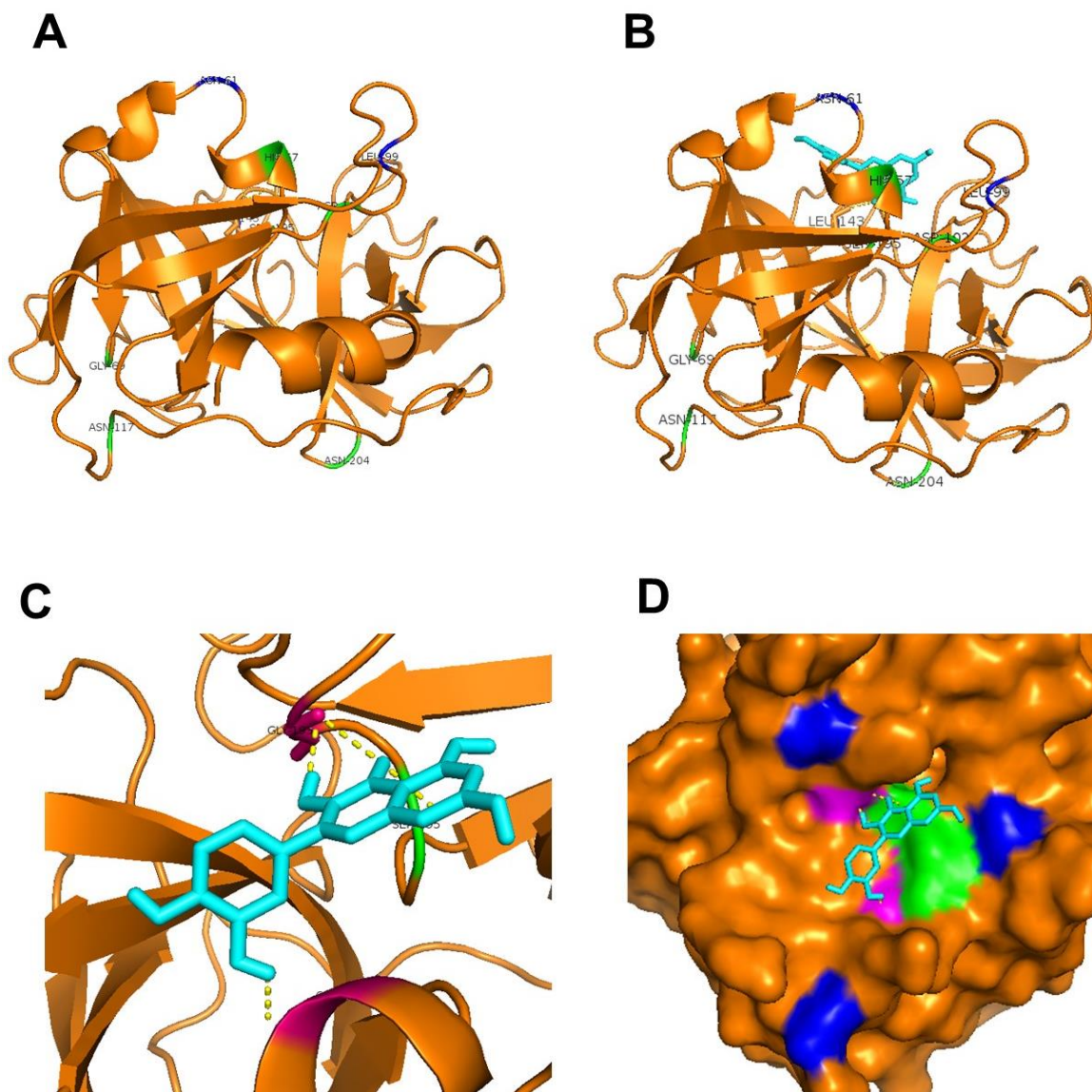


Figura 8. Figura 6. Docking molecular do complexo Quercetina / Elastase. A) Estrutura tridimensional da elastase neutrofílica humana, obtida no banco de dados Protein Data Bank (PDB ID 3Q76), representada em cartoon. Em verde encontram-se os resíduos catalíticos (ALA70, ASN117, HIS57 e SER195) e em azul os sítios ativos (ASN61, LEU99, LEU143). B) Local de interação da quercetina, em azul claro. C) Zoom no ponto de interação da quercetina. Em rosa estão marcados os resíduos em que há interação polar (GLY193 e CYS58) entre o ligante e a proteína. D) A elastase em representação de superfície no *docking* com a quercetina.

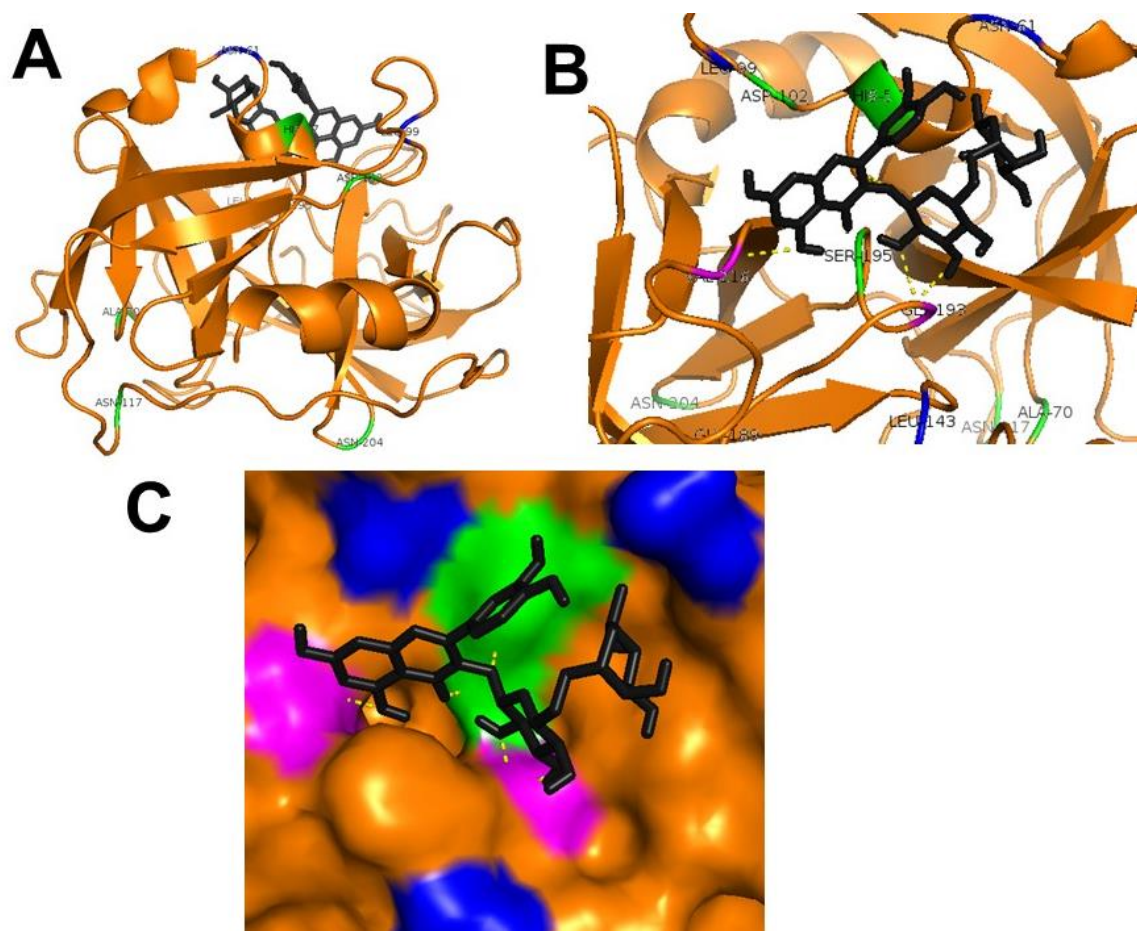


Figura 9. Figura 6. Docking molecular do complexo Rutina / Elastase. A) Estrutura tridimensional da elastase neutrofílica humana, obtida no banco de dados Protein Data Bank (PDB ID 3Q76), representada em cartoon. Em verde encontram-se os resíduos catalíticos (ALA70, ASN117, HIS57 e SER195) e em azul os sítios ativos (ASN61, LEU99, LEU143). Na cor chumbo está a molécula de rutina. B) Zoom no ponto de interação da rutina. Em rosa estão marcados os resíduos em que há interação polar (GLY193 e VAL215) entre o ligante e a proteína. C) A elastase em representação de superfície no *docking* com a rutina, mostrando que a interação da rutina acontece próximo aos sítios de ligação (azul) e catalítico (verde).

Com base em nossos resultados, concluímos que rutina e quercetina não inibem adesão de neutrófilos induzida por PMA em ensaios *in vitro* e na ausência de endotélio e quercetina, diferentemente de rutina, possui habilidade de inibir a desgranulação. Além disso, a associação entre os dados experimentais obtidos *in vivo* e *in silico*, nos auxilia a entender e a propor um mecanismo molecular pelo qual os flavonoides inibem a geração das NETs. Embora, quercetina interaja e iniba mais fortemente MPO, esta não é uma enzima fundamental no processo de NETose. Por outro lado, o papel de destaque da elastase na descondensação da cromatina pode ser melhor inibido pela ação da rutina.

CONCLUSÕES GERAIS

Rutina e quercetina interferem na ativação da via PKC em neutrófilos estimulados por PMA, onde:

1. Rutina e Quercetina não inibem a adesão de neutrófilos;
2. A Quercetina é capaz de inibir a desgranulação, a rutina não.
3. Quercetina e Rutina inibem a ação catalítica da mieloperoxidase.
4. Quercetina e Rutina, principalmente, inibem a liberação das NETs;
5. A inibição na liberação das NETs pelos flavonóides não está associada à morte celular;
6. Quercetina e rutina possuem potencial de interação com MPO e elastase.

No entanto, os complexos de quercetina/MPO e rutina/elastase apresentam parâmetros mais promissores.

REFERÊNCIAS

ABDEL-RAHEEM, I. T. Gastroprotective Effect of Rutin against Indomethacin-Induced Ulcers in Rats. **Basic & clinical pharmacology & toxicology**, v. 107, n. 3, p. 742-750, 2010. ISSN 1742-7843.

AFANAS'EVA, I. B. et al. Enhancement of antioxidant and anti-inflammatory activities of bioflavonoid rutin by complexation with transition metals. **Biochemical pharmacology**, v. 61, n. 6, p. 677-684, 2001. ISSN 0006-2952.

AGATI, G. et al. Flavonoids as antioxidants in plants: location and functional significance. **Plant Science**, v. 196, p. 67-76, 2012. ISSN 0168-9452.

ALLEN, K. N. et al. An experimental approach to mapping the binding surfaces of crystalline proteins. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 100, n. 7, p. 2605-2611, 1996. ISSN 0022-3654.

AMULIC, B. et al. Neutrophil function: from mechanisms to disease. **Annu Rev Immunol**, v. 30, p. 459-89, 2012. ISSN 1545-3278 (Electronic)

0732-0582 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22224774> >.

BALIGA, M. S. Anticancer, chemopreventive and radioprotective potential of black plum (Eugenia jambolana lam.). **Asian Pac J Cancer Prev**, v. 12, n. 1, p. 3-15, 2011. ISSN 1513-7368 (Print)

1513-7368 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21517226> >.

BERTRAM, A.; LEY, K. Protein Kinase C Isoforms in Neutrophil Adhesion and Activation. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, v. 59, n. 2, p. 79-87, 2011. ISSN 1661-4917. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s00005-011-0112-7> >.

BORREGAARD, N. Neutrophils, from marrow to microbes. **Immunity**, v. 33, n. 5, p. 657-70, Nov 24 2010. ISSN 1097-4180 (Electronic)

1074-7613 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21094463> >.

BORRIS, R. P. Natural products research: perspectives from a major pharmaceutical company. **Journal of ethnopharmacology**, v. 51, n. 1, p. 29-38, 1996. ISSN 0378-8741.

BORS, W. et al. Radical chemistry of flavonoid antioxidants. In: (Ed.). **Antioxidants in therapy and preventive medicine**: Springer, 1990. p.165-170.

CARVALHO, M. et al. Human cancer cell antiproliferative and antioxidant activities of Juglans regia L. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 1, p. 441-447, 2010. ISSN 0278-6915.

CERVANTES-LAUREAN, D. et al. Inhibition of advanced glycation end product formation on collagen by rutin and its metabolites. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 17, n. 8, p. 531-540, 2006. ISSN 0955-2863.

CHAVES, M. M. F.; USBERTI, R. Previsão da longevidade de sementes de faveiro (*Dimorphandra mollis* Benth.). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 26, n. 4, p. 557-564, 2003.

CHEN, W. Y. et al. Protective effect of rutin on LPS-induced acute lung injury via down-regulation of MIP-2 expression and MMP-9 activation through inhibition of Akt phosphorylation. **Int Immunopharmacol**, v. 22, n. 2, p. 409-13, Oct 2014. ISSN 1878-1705 (Electronic)

1567-5769 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25091621> >.

CHOI, I. et al. Anti-adipogenic activity of rutin in 3T3-L1 cells and mice fed with high-fat diet. **Biofactors**, v. 26, n. 4, p. 273-281, 2006. ISSN 0951-6433.

CHOPRA, M. et al. Nonalcoholic red wine extract and quercetin inhibit LDL oxidation without affecting plasma antioxidant vitamin and carotenoid concentrations. **Clinical Chemistry**, v. 46, n. 8, p. 1162-1170, 2000. ISSN 0009-9147.

COCKROFT, S. L. et al. Electrostatic control of aromatic stacking interactions. **Journal of the American Chemical Society**, v. 127, n. 24, p. 8594-8595, 2005. ISSN 0002-7863.

COSTA, T. R. et al. Antifungal activity of volatile constituents of *Eugenia dysenterica* leaf oil. **J Ethnopharmacol**, v. 72, n. 1-2, p. 111-7, Sep 2000. ISSN 0378-8741 (Print)

0378-8741 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10967461> >.

CUSHNIE, T. T.; LAMB, A. J. Antimicrobial activity of flavonoids. **International journal of antimicrobial agents**, v. 26, n. 5, p. 343-356, 2005. ISSN 0924-8579.

DAVEY, C. A.; FENNA, R. E. 2.3 Å Resolution X-ray Crystal Structure of the Bisubstrate Analogue Inhibitor Salicylhydroxamic Acid Bound to Human Myeloperoxidase: A Model for a Prereaction Complex with Hydrogen Peroxide[†]. **Biochemistry**, v. 35, n. 33, p. 10967-10973, 1996. ISSN 0006-2960.

DELCLAUX, C. et al. Role of gelatinase B and elastase in human polymorphonuclear neutrophil migration across basement membrane. **American journal of respiratory cell and molecular biology**, v. 14, n. 3, p. 288-295, 1996. ISSN 1044-1549.

DESCHNER, E. E. et al. Quercetin and rutin as inhibitors of azoxymethanol-induced colonic neoplasia. **Carcinogenesis**, v. 12, n. 7, p. 1193-1196, 1991. ISSN 0143-3334.

DOEING, D. C.; BOROWICZ, J. L.; CROCKETT, E. T. Gender dimorphism in differential peripheral blood leukocyte counts in mice using cardiac, tail, foot, and saphenous vein puncture methods. **BMC clinical pathology**, v. 3, n. 1, p. 1, 2003. ISSN 1472-6890.

ERLUND, I. Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. **Nutrition Research**, v. 24, n. 10, p. 851-874, 2004. ISSN 0271-5317.

FABRE, N. et al. Determination of flavone, flavonol, and flavanone aglycones by negative ion liquid chromatography electrospray ion trap mass spectrometry. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 12, n. 6, p. 707-715, 2001. ISSN 1044-0305.

FERRY, D. R. et al. Phase I clinical trial of the flavonoid quercetin: pharmacokinetics and evidence for in vivo tyrosine kinase inhibition. **Clinical Cancer Research**, v. 2, n. 4, p. 659-668, 1996. ISSN 1078-0432.

FORMICA, J.; REGELSON, W. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. **Food and chemical toxicology**, v. 33, n. 12, p. 1061-1080, 1995. ISSN 0278-6915.

FUCHS, T. A. et al. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. **The Journal of cell biology**, v. 176, n. 2, p. 231-241, 2007. ISSN 0021-9525.

FUTOSI, K.; FODOR, S.; MÓCSAI, A. Reprint of Neutrophil cell surface receptors and their intracellular signal transduction pathways. **International immunopharmacology**, v. 17, n. 4, p. 1185-1197, 2013. ISSN 1567-5769.

GERDIN, B.; SVENSJÖ, E. Inhibitory effect of the flavonoid O-(beta-hydroxyethyl)-rutoside on increased microvascular permeability induced by various agents in rat skin. **International journal of microcirculation, clinical and experimental/sponsored by the European Society for Microcirculation**, v. 2, n. 1, p. 39-46, 1982. ISSN 0167-6865.

GRANGEIRO, M. S. et al. Pharmacological effects of *Eugenia punicifolia* (Myrtaceae) in cholinergic nicotinic neurotransmission. **J Ethnopharmacol**, v. 108, n. 1, p. 26-30, Nov 3 2006. ISSN 0378-8741 (Print)

0378-8741 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16759829> >.

GUARDIA, T. et al. Anti-inflammatory properties of plant flavonoids. Effects of rutin, quercetin and hesperidin on adjuvant arthritis in rat. **Il farmaco**, v. 56, n. 9, p. 683-687, 2001. ISSN 0014-827X.

GULPINAR, A. R. et al. Estimation of in vitro neuroprotective properties and quantification of rutin and fatty acids in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) cultivated in Turkey. **Food research international**, v. 46, n. 2, p. 536-543, 2012. ISSN 0963-9969.

HAN, Y. Rutin has therapeutic effect on septic arthritis caused by *Candida albicans*. **International immunopharmacology**, v. 9, n. 2, p. 207-211, 2009. ISSN 1567-5769.

HAO, H.-H. et al. Preventive effects of rutin on the development of experimental diabetic nephropathy in rats. **Life sciences**, v. 91, n. 19, p. 959-967, 2012. ISSN 0024-3205.

HE, Q.; KIM, J.; SHARMA, R. P. Silymarin protects against liver damage in BALB/c mice exposed to fumonisin B1 despite increasing accumulation of free sphingoid bases. **Toxicological Sciences**, v. 80, n. 2, p. 335-342, 2004. ISSN 1096-6080.

HENSON, P. M. The immunologic release of constituents from neutrophil leukocytes. I. The role of antibody and complement on nonphagocytosable surfaces or phagocytosable particles. **J Immunol**, v. 107, n. 6, p. 1535-46, Dec 1971a. ISSN 0022-1767 (Print)

0022-1767 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5120396> >.

_____. The immunologic release of constituents from neutrophil leukocytes. II. Mechanisms of release during phagocytosis, and adherence to nonphagocytosable surfaces. **J Immunol**, v. 107, n. 6, p. 1547-57, Dec 1971b. ISSN 0022-1767 (Print)

0022-1767 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5120397> >.

HOLLMAN, P. C. et al. The sugar moiety is a major determinant of the absorption of dietary flavonoid glycosides in man. **Free radical research**, v. 31, n. 6, p. 569-573, 1999. ISSN 1071-5762.

HUANG, Y. C. et al. Rutin improves endotoxin-induced acute lung injury via inhibition of iNOS and VCAM-1 expression. **Environmental toxicology**, 2014. ISSN 1522-7278.

HUANG, Z.; FASCO, M. J.; KAMINSKY, L. S. Inhibition of estrone sulfatase in human liver microsomes by quercetin and other flavonoids. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, v. 63, n. 1, p. 9-15, 1997. ISSN 0960-0760.

JUNIOR, J. et al. **Imunobiologia: o sistema imune na saúde e na doença**. Artmed, 2007. ISBN 8536307412.

KANASHIRO, A. et al. Elastase release by stimulated neutrophils inhibited by flavonoids: importance of the catechol group. **Z Naturforsch C**, v. 62, n. 5-6, p. 357-61, May-Jun 2007. ISSN 0939-5075 (Print)

0341-0382 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17708440> >.

KAUL, T. N.; MIDDLETON, E.; OGRA, P. L. Antiviral effect of flavonoids on human viruses. **Journal of medical virology**, v. 15, n. 1, p. 71-79, 1985. ISSN 1096-9071.

KERRY, N. L.; ABBEY, M. Red wine and fractionated phenolic compounds prepared from red wine inhibit low density lipoprotein oxidation in vitro. **Atherosclerosis**, v. 135, n. 1, p. 93-102, 1997. ISSN 0021-9150.

KHALIFA, T. I.; MUHTADI, F. J.; HASSAN, M. M. Rutin. **Analytical profiles of drug substances**, v. 12, p. 623-681, 1983. ISSN 0099-5428.

KOLACZKOWSKA, E.; KUBES, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. **Nat Rev Immunol**, v. 13, n. 3, p. 159-75, Mar 2013. ISSN 1474-1741 (Electronic)

1474-1733 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23435331> >.

KORKMAZ, A.; KOLANKAYA, D. Protective effect of rutin on the ischemia/reperfusion induced damage in rat kidney. **Journal of Surgical Research**, v. 164, n. 2, p. 309-315, 2010. ISSN 0022-4804.

KOSTYUK, V. A. et al. Myeloperoxidase/nitrite-mediated lipid peroxidation of low-density lipoprotein as modulated by flavonoids. **FEBS letters**, v. 537, n. 1-3, p. 146-150, 2003. ISSN 1873-3468.

KRUGER, P. et al. Neutrophils: Between host defence, immune modulation, and tissue injury. **PLoS Pathog**, v. 11, n. 3, p. e1004651, Mar 2015. ISSN 1553-7374 (Electronic)

1553-7366 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25764063> >.

KUMAR, S.; PANDEY, A. K. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. **ScientificWorldJournal**, v. 2013, p. 162750, 2013. ISSN 1537-744X (Electronic)

1537-744X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24470791> >.

LA CASA, C. et al. Evidence for protective and antioxidant properties of rutin, a natural flavone, against ethanol induced gastric lesions. **Journal of ethnopharmacology**, v. 71, n. 1, p. 45-53, 2000. ISSN 0378-8741.

LAMARTINIERE, C. A. et al. Genistein suppresses mammary cancer in rats. **Carcinogenesis**, v. 16, n. 11, p. 2833-2840, 1995. ISSN 0143-3334.

LEE, W.; KU, S.-K.; BAE, J.-S. Barrier protective effects of rutin in LPS-induced inflammation in vitro and in vivo. **Food and chemical toxicology**, v. 50, n. 9, p. 3048-3055, 2012. ISSN 0278-6915.

LEITE, P. E. et al. Anti-inflammatory activity of *Eugenia punicifolia* extract on muscular lesion of mdx dystrophic mice. **J Cell Biochem**, v. 111, n. 6, p. 1652-60, Dec 15 2010. ISSN 1097-4644 (Electronic)

0730-2312 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21053281> >.

LUCISANO, Y. M.; MANTOVANI, B. Lysosomal enzyme release from polymorphonuclear leukocytes induced by immune complexes of IgM and of IgG. **J Immunol**, v. 132, n. 4, p. 2015-20, Apr 1984. ISSN 0022-1767 (Print)

0022-1767 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6699405> >.

MAHMOUD, A. M. Influence of rutin on biochemical alterations in hyperammonemia in rats. **Experimental and toxicologic pathology**, v. 64, n. 7, p. 783-789, 2012. ISSN 0940-2993.

MASENENI, S. et al. Toxicity of thienopyridines on human neutrophil granulocytes and lymphocytes. **Toxicology**, v. 308, p. 11-19, 2013. ISSN 0300-483X.

MASHIMO, M. et al. Cytosolic PLA₂ activation in Purkinje neurons and its role in AMPA-receptor trafficking. **Journal of Cell Science**, v. 121, n. 18, p. 3015-3024, 2008.

MATTOS, C. et al. Multiple solvent crystal structures: probing binding sites, plasticity and hydration. **Journal of molecular biology**, v. 357, n. 5, p. 1471-1482, 2006. ISSN 0022-2836.

METZLER, K. D. et al. Myeloperoxidase is required for neutrophil extracellular trap formation: implications for innate immunity. **Blood**, v. 117, n. 3, p. 953-959, 2011. ISSN 0006-4971.

MIDDLETON, E.; KANDASWAMI, C. Effects of flavonoids on immune and inflammatory cell functions. **Biochemical pharmacology**, v. 43, n. 6, p. 1167-1179, 1992. ISSN 0006-2952.

MIDDLETON JR, E. Effect of plant flavonoids on immune and inflammatory cell function. In: (Ed.). **Flavonoids in the Living System**: Springer, 1998. p.175-182.

MINGUET, G. et al. Sevoflurane inhibits equine myeloperoxidase release and activity in vitro. **Veterinary anaesthesia and analgesia**, v. 40, n. 2, p. 166-175, 2013. ISSN 1467-2995.

MIYATA, T.; FAN, X. A second hit for TMA. **Blood**, v. 120, n. 6, p. 1152-1154, 2012. Disponível em: < <http://www.bloodjournal.org/content/bloodjournal/120/6/1152.full.pdf> >.

MORI, S.; NISHIZAWA, N. Methionine as a dominant precursor of phytosiderophores in Gramineae plants. **Plant and Cell Physiology**, v. 28, n. 6, p. 1081-1092, 1987. ISSN 0032-0781.

PAN, M.-H.; LAI, C.-S.; HO, C.-T. Anti-inflammatory activity of natural dietary flavonoids. **Food & function**, v. 1, n. 1, p. 15-31, 2010.

PANNALA, A. S. et al. Flavonoid B-ring chemistry and antioxidant activity: fast reaction kinetics. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 282, n. 5, p. 1161-1168, 2001. ISSN 0006-291X.

PAPAYANNOPOULOS, V. et al. Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. **The Journal of Cell Biology**, v. 191, n. 3, p. 677-691, 2010.

PATEL, S. et al. Nitric oxide donors release extracellular traps from human neutrophils by augmenting free radical generation. **Nitric Oxide**, v. 22, n. 3, p. 226-234, 2010. ISSN 1089-8603.

PETTERSEN, E. F. et al. UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. **Journal of computational chemistry**, v. 25, n. 13, p. 1605-1612, 2004. ISSN 1096-987X.

PINCEMAIL, J. et al. Human myeloperoxidase activity is inhibited in vitro by quercetin. Comparison with three related compounds. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 44, n. 5, p. 450-453, 1988. ISSN 1420-682X.

RATTY, A.; DAS, N. Effects of flavonoids on nonenzymatic lipid peroxidation: structure-activity relationship. **Biochemical medicine and metabolic biology**, v. 39, n. 1, p. 69-79, 1988. ISSN 0885-4505.

REGASINI, L. O. et al. Flavonols from *Pterogyne nitens* and their evaluation as myeloperoxidase inhibitors. **Phytochemistry**, v. 69, n. 8, p. 1739-1744, 2008. ISSN 0031-9422.

REPINE, J. E. et al. The influence of phorbol myristate acetate on oxygen consumption by polymorphonuclear leukocytes. **J Lab Clin Med**, v. 83, n. 6, p. 911-920, 1974. ISSN 0022-2143.

RIBEIRO, D. et al. Proinflammatory Pathways: The Modulation by Flavonoids. **Medicinal Research Reviews**, v. 35, n. 5, p. 877-936, 2015. ISSN 1098-1128. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/med.21347> >.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free radical biology and medicine**, v. 20, n. 7, p. 933-956, 1996. ISSN 0891-5849.

RIZVI, S. I.; MISHRA, N. Traditional Indian medicines used for the management of diabetes mellitus. **J Diabetes Res**, v. 2013, p. 712092, 2013. ISSN 2314-6745 (Print). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23841105> >.

SALLER, R.; MEIER, R.; BRIGNOLI, R. The use of silymarin in the treatment of liver diseases. **Drugs**, v. 61, n. 14, p. 2035-2063, 2001. ISSN 0012-6667.

SHEN, S.-C. et al. In vitro and in vivo inhibitory activities of rutin, wogonin, and quercetin on lipopolysaccharide-induced nitric oxide and prostaglandin E₂ production. **European journal of pharmacology**, v. 446, n. 1, p. 187-194, 2002. ISSN 0014-2999.

SHIBA, Y. et al. Flavonoids as substrates and inhibitors of myeloperoxidase: molecular actions of aglycone and metabolites. **Chemical Research in Toxicology**, v. 21, n. 8, p. 1600-1609, 2008. ISSN 0893-228X.

SINGHAL, R. L. et al. Quercetin down-regulates signal transduction in human breast carcinoma cells. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 208, n. 1, p. 425-431, 1995. ISSN 0006-291X.

SON, E.-W. et al. Effect of Rutin on Adhesion Molecules Expression and NO Production Induced by γ -irradiation in Human Endothelial cells. **Biomolecules and Therapeutics**, v. 9, n. 3, p. 156-161, 2001. ISSN 1976-9148.

SOUTO, F. O. et al. Quercetin reduces neutrophil recruitment induced by CXCL8, LTB₄, and fMLP: inhibition of actin polymerization. **J Nat Prod**, v. 74, n. 2, p. 113-8, Feb 25 2011. ISSN 1520-6025 (Electronic)

0163-3864 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21275387> >.

STEWART, A. J. et al. Occurrence of flavonols in tomatoes and tomato-based products. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 48, n. 7, p. 2663-2669, 2000. ISSN 0021-8561.

SUYENAGA, E. S. et al. Beyond organoleptic characteristics: the pharmacological potential of flavonoids and their role in leukocyte migration and in L-selectin and beta2-integrin expression during inflammation. **Phytother Res**, v. 28, n. 9, p. 1406-11, Sep 2014. ISSN 1099-1573 (Electronic)

0951-418X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24619567> >.

TAYLOR, L. P.; GROTEWOLD, E. Flavonoids as developmental regulators. **Current opinion in plant biology**, v. 8, n. 3, p. 317-323, 2005. ISSN 1369-5266.

TENFEN, A. et al. Chemical composition and evaluation of the antimicrobial activity of the essential oil from leaves of *Eugenia platysema*. **Nat Prod Res**, p. 1-5, Nov 23 2015. ISSN 1478-6427 (Electronic)

1478-6419 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26595394> >.

THOMPSON, M.; COHN, L.; JORDAN, R. Use of rutin for medical management of idiopathic chylothorax in four cats. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 215, n. 3, p. 345-8, 339, 1999. ISSN 0003-1488.

TROTT, O.; OLSON, A. J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **Journal of computational chemistry**, v. 31, n. 2, p. 455-461, 2010. ISSN 1096-987X.

TUNON, M. et al. Potential of flavonoids as anti-inflammatory agents: modulation of pro-inflammatory gene expression and signal transduction pathways. **Current drug metabolism**, v. 10, n. 3, p. 256-271, 2009. ISSN 1389-2002.

VAN ACKER, S. A. et al. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 20, n. 3, p. 331-342, 1996. ISSN 0891-5849.

VERMA, A. K. et al. Inhibition of 7, 12-dimethylbenz (a) anthracene-and N-nitrosomethylurea-induced rat mammary cancer by dietary flavonol quercetin. **Cancer research**, v. 48, n. 20, p. 5754-5758, 1988. ISSN 0008-5472.

VON NUSSBAUM, F. et al. Potent and Selective Human Neutrophil Elastase Inhibitors with Novel Equatorial Ring Topology: in vivo Efficacy of the Polar Pyrimidopyridazine BAY-8040 in a Pulmonary Arterial Hypertension Rat Model. **ChemMedChem**, v. 11, n. 2, p. 199-206, 2016. ISSN 1860-7187. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/cmdc.201500269> >.

VRIJSEN, R.; EVERAERT, L.; BOEYÉ, A. Antiviral activity of flavones and potentiation by ascorbate. **Journal of General Virology**, v. 69, n. 7, p. 1749-1751, 1988. ISSN 1465-2099.

WILLIAMS, M. R. et al. Emerging mechanisms of neutrophil recruitment across endothelium. **Trends in immunology**, v. 32, n. 10, p. 461-469, 2011. ISSN 1471-4906.

WU-ZHANG, ALYSSA X.; NEWTON, ALEXANDRA C. Protein kinase C pharmacology: refining the toolbox. **Biochemical Journal**, v. 452, n. 2, p. 195-209, 2013.

XU, J. et al. Divergent signals and cytoskeletal assemblies regulate self-organizing polarity in neutrophils. **Cell**, v. 114, n. 2, p. 201-214, 2003. ISSN 0092-8674.

YANG, J.; GUO, J.; YUAN, J. In vitro antioxidant properties of rutin. **LWT-Food Science and Technology**, v. 41, n. 6, p. 1060-1066, 2008. ISSN 0023-6438.

YUAN, S. Y. et al. Neutrophil transmigration, focal adhesion kinase and endothelial barrier function. **Microvascular research**, v. 83, n. 1, p. 82-88, 2012. ISSN 0026-2862.