



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

CECÍLIA SOUTO SEGUIN

INFLUÊNCIA DA HIDROXIURÉIA NAS PROPRIEDADES ADESIVAS DE
NEUTRÓFILOS E PLAQUETAS

CAMPINAS

2017

CECÍLIA SOUTO SEGUIN

A INFLUÊNCIA DA HIDROXIURÉIA NAS PROPRIEDADES ADESIVAS DE
NEUTRÓFILOS E PLAQUETAS

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos
exigidos para a obtenção do título de Mestra em Ciências.

ORIENTADORA: NICOLA AMANDA CONRAN ZORZETTO

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA
ALUNA CECÍLIA SOUTO SEGUIN, E ORIENTADA PELA
PROF^ª. DR^ª NICOLA AMANDA CONRAN ZORZETTO

CAMPINAS

2017

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): Não se aplica.

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

Se39i Seguin, Cecília Souto, 1990-
Influência da hidroxiuréia nas propriedades adesivas de neutrófilos e plaquetas / Cecília Souto Seguin. – Campinas, SP : [s.n.], 2017.

Orientador: Nicola Amanda Conran Zorzetto.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Inflamação. 2. Neutrófilos. 3. Plaquetas. 4. Óxido nítrico. 5. Hidroxiuréia.
I. Zorzetto, Nicola Amanda Conran, 1972-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Influence of hydroxyurea on the adhesive properties of neutrophils and platelets

Palavras-chave em inglês:

Inflammation
Neutrophils
Blood platelets
Nitric oxide
Hydroxyurea

Área de concentração: Fisiopatologia Médica

Titulação: Mestra em Ciências

Banca examinadora:

Nicola Amanda Conran Zorzetto [Orientador]
Margareth Castro Ozello
Mário Ângelo Claudino

Data de defesa: 08-02-2017

Programa de Pós-Graduação: Fisiopatologia Médica

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

CECÍLIA SOUTO SEGUIN

ORIENTADOR: NICOLA AMANDA CONRAN ZORZETTO

MEMBROS:

1. PROF. DRA. NICOLA AMANDA CONRAN ZORZETTO

2. PROF. DRA. MARGARETH CASTRO OZELLO

3. PROF. DR. MÁRIO ÂNGELO CLAUDINO

Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros da banca examinadora encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

Data: DATA DA DEFESA 08/02/2017

Aos meus pais Paulo e Fátima, meus exemplos, por acreditarem em mim e em meus sonhos, pela paciência, amor e carinho, por estarem ao meu lado em todos os momentos da
minha vida.

É saber se sentir infinito
Num universo tão vasto e bonito
É saber sonhar
E, então, fazer valer a pena cada verso
Daquele poema sobre acreditar
Não é sobre chegar no topo do mundo
E saber que venceu
É sobre escalar e sentir
Que o caminho te fortaleceu

Trem bala – Ana Vilela

Agradecimentos,

Primeiramente a **Deus** por ter trilhado meu caminho, por ter me capacitado e me dado sabedoria e perseverança para chegar até aqui;

A minha orientadora **Dr^a Nicola Conran**, pela oportunidade de fazer parte do seu grupo de pesquisa e por todo aprendizado;

Aos meus pais **Paulo** e **Fatima** por tudo que fizeram e fazem por mim, pelo incentivo durante todas as etapas da minha vida, por acreditarem em mim e me ajudarem a realizar os meus sonhos, a minha irmã Carolina e minha prima Flavia pelo companheirismo e amizade,

As que me incentivaram a entrar no mestrado: **Adriana** exemplo de pesquisadora, a **Daiana Vital**, minha veterana da faculdade que me abriu as portas da Unicamp, e sempre esteve disposta e acessível em me ajudar durante todo o projeto e a **Angélica** que esteve comigo, me dando conselhos, ensinando técnicas, compartilhando experiências de vida e profissionais,

Aos que me acompanharam durante todos os dias dividindo experiências, companheiros de risadas, desabafos, almoços, congressos e tantos outros momentos, minha caminhada até aqui só foi mais fácil por que vocês fizeram parte dela: **Carol Japa, Hannan, Wilson, Lediana, Pamela, Leticia, Felipe, Lidiane, Selma, Regiane, Carol, Atos, Fernanda, Flavia Garcia, Juliete, Marina, Érica, Leticia, Ana Paula,**

A **Rafaela** que esteve comigo desde inicio desse projeto, obrigada pela amizade, pela ajuda, pelo apoio, por inúmeras vezes ter ouvido meus desabafos e choros, pelas crises de risos, pela companhia em congressos e aulas, pelos conselhos, pela cumplicidade, obrigado por estar comigo até aqui,

A **Cristiane** que apesar de pouco tempo parece que nos conhecemos há anos, obrigada pela convivência impar, pelos conselhos, pelo incentivo e amizade,

A técnica de laboratório **Priscila**, obrigada por todos os reagentes, vidrarias, auxílio na sala de cultura, que além de funcionária se tornou minha amiga, obrigada por todos momentos compartilhados durante esse tempo,

A **Flavia Leonardo** pelo todo apoio durante o mestrado por me ajudar a procurar soluções durante os imprevistos, pelos intermináveis ensaios de adesão em fluxo, obrigada pela paciência, companheirismo e toda ajuda,

Aos que mesmo de longe sempre se fizeram presentes: **Priscila, Caroline, Juliana e Jonas**, obrigada por todo incentivo e apoio;

Aos funcionários do hemocentro: **Irene, Ana Leda, Carolina Lanaro, Simone Ucha, Lena, Audrey, Dilmara, Dani, Maristela, Rose** sempre dispostas a ajudar no que fosse preciso, obrigada pela agradável convivência;

Aos doadores de sangue do Hemocentro da Unicamp, a equipe de enfermagem pelo acolhimento e pela ajuda na aquisição das amostras,

A CAPES e FAPESP pelo auxílio financeiro.

RESUMO

A inflamação é a resposta fisiológica normal à ação invasiva de patógenos ou lesão tecidual, a qual desencadeia uma rápida resposta inflamatória, representada pelo recrutamento de células, como leucócitos especialmente neutrófilos, que deixam a circulação e migram em direção ao local inflamado. As células endoteliais participam neste processo, pois são ativadas frente estímulos inflamatórios e atraem os leucócitos ao endotélio, aonde são induzidos ao rolamento, firme adesão e posteriormente diapedese, a fim de fagocitar o invasor. Evidências sugerem que além dos neutrófilos, as plaquetas possuem importante papel na inflamação, quando ativadas expressam e secretam mediadores inflamatórios, induzindo uma resposta inflamatória em leucócitos e células endoteliais. A resposta inflamatória, quando desregulada, ocasiona danos teciduais e as interações de leucócitos e plaquetas com a parede vascular tem uma importante contribuição para as doenças inflamatórias crônicas, como a anemia falciforme (AF), a aterosclerose, a artrite reumatoide, entre outras. A hidroxiuréia (HU) é um quimioterápico usado no tratamento de carcinoma de cabeça/pescoço/ovário/cervix, melanoma, leucemia mielóide crônica, policitemia vera e AF. A HU atua principalmente interrompendo o ciclo celular, mas dados recentes indicam que HU talvez possua efeitos anti-inflamatórios e a capacidade de doar óxido nítrico (NO). Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi avaliar se a HU é capaz de alterar as propriedades adesivas de neutrófilos e plaquetas (obtidas de sangue humano) *in vitro*. A fim de avaliar esses efeitos, foram realizados ensaios de adesão estática e de adesão em sistema microfluídico, utilizando a plataforma CellixVenaflux®. Neutrófilos de indivíduos saudáveis foram pré-tratados com HU (100 a 1000 μM) antes de receberem um estímulo de TNF- α ; em seguida a adesão destas células à vários ligantes foi avaliada. Plaquetas foram pré-incubadas com HU (10 a 100 μM) e ativadas por adenosina difosfato (ADP) 20 μM ou trombina (TB) 50U, e a sua adesão ao fibrinogênio avaliada. A HU foi capaz de diminuir a adesão dos neutrófilos (1000 μM) e plaquetas (100 μM). Posteriormente, foram utilizadas ferramentas farmacológicas, PTIO (2-phenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide; um sequestrador de NO) e ODQ (1H-[1, 2, 4] oxadiazolo [4,3-a] quinoxalin-1-one; um inibidor de guanilato ciclase soluvel), para avaliar a participação da via dependente de NO e de guanosina monofosfato cíclico nos efeitos da HU. Nos neutrófilos estimulados por TNF- α , dados indicam que estes efeitos, aparentemente são mediados parcialmente pela propriedade desta droga de liberar NO, quando em solução. A expressão das moléculas de adesão, LFA-1/Mac-1, na sua conformação ativada ou não ativada na superfície dos neutrófilos e da P-selectina, integrina $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ na sua conformação de alta afinidade, e a glicoproteína GPIb/IX/V na superfície das plaquetas foram analisadas através da citometria

de fluxo. Nos dados obtidos, TNF- α não aumentou a ativação da integrina LFA-1 nos neutrófilos; em contraste a ativação da integrina Mac-1 apresentou um aumento significativo. No entanto, a presença de HU não alterou o efeito do TNF- α em Mac-1. Plaquetas ativadas por TB demonstraram aumento significativo da expressão da integrina α IIb β 3 na sua conformação de alta afinidade e da glicoproteína GPIb/IX/V. A HU nas concentrações de 10, 100 e 500 μ M, preveniu parcialmente o aumento da expressão da integrina α IIb β 3 na sua conformação de alta afinidade. Assim sendo, o nosso trabalho indica que o uso da HU como uma abordagem anti-inflamatória deve ser estudado em pacientes com doenças inflamatórias.

Palavras chave: Inflamação; neutrófilo; plaqueta; adesão celular; óxido nítrico; hidroxauréia.

ABSTRACT

Inflammation is a normal physiological response to the invasive action of pathogens or tissue injury, which trigger a rapid inflammatory response initiated by the recruitment of cells, such as leukocytes, especially neutrophils, which leave the circulation and migrate towards the site of inflammation. In order for this to happen, endothelial cells become activated and attract neutrophils to the endothelium where they then roll and firmly adhere to the vessel wall before migrating to the site of pathogen invasion. The sterile inflammatory response to tissue lesions and cell death is required for normal healing; however, deregulated sterile inflammation causes tissue damage, giving rise to several chronic inflammatory diseases, including metabolic diseases, syndromes, and autoimmune diseases that can cause loss of organ function. Currently, evidence suggests that besides the neutrophils and leukocytes, platelets play an important role in inflammation when they are activated, by expressing and secreting inflammatory mediators that induce an inflammatory response in leukocytes and endothelial cells that produce a series of mediators that are capable of activating platelets. The interactions of leukocytes, and platelets, with the vascular wall make an important contribution to chronic inflammatory diseases, such as sickle cell disease (SCD), atherosclerosis, and rheumatoid arthritis among others. Hydroxyurea (HU) is a chemotherapeutic drug used in the treatment of head/neck/ovarian/cervix carcinoma, melanoma, chronic myeloid leukemia, polycythemia vera and SCD. HU works mainly by disrupting the cell cycle, but recent data indicate that HU may have anti-inflammatory effects and the ability to donate nitric oxide (NO). Thus, the aim of this study was to evaluate, *in vitro*, whether HU is able to alter the adhesive properties of neutrophils and platelets. In order to evaluate these effects, *in vitro* static adhesion and microfluidic adhesion assays were performed using the CellixVenaflux® platform. Neutrophils were pretreated with HU (100-1000 μ m) and received a TNF- α stimuli, and the adhesion of these cells to various ligands was evaluated. Platelets were preincubated with 10 -1000 μ m HU and activated with adenosine diphosphate (ADP) or thrombin (TB) and their adhesion to fibrinogen evaluated. HU was able to decrease neutrophil and platelet adhesion. The pharmacological tools, PTIO (2-phenyl 4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide and ODQ (1H-[1, 2, 4] oxadiazolo [4,3-a] quinoxalin-1-one), were used to evaluate the role of NO generation and cyclic guanosine monophosphate in the effects of HU. We observed a possible role of this pathway in the effects mediated by HU. The expression of the LFA-1/Mac-1 molecules in their activated conformations on the surface of neutrophils was analyzed by flow cytometry. Additionally, the expressions of P-selectin, integrin α IIb β 3 in its high affinity conformation, and glycoprotein GPIb/IX/V on the platelet surface were determined. TNF- α did not increase

neutrophil LFA-1 integrin activation. In contrast, activated Mac-1 integrin expression was significantly increased by TNF- α ; however, the presence of HU did not alter the effect of TNF- α on Mac-1. TB-activated platelets demonstrated a significant increase in the expression of the integrin α IIb β 3 in its high affinity conformation and glycoprotein GPIb/IX/V. HU, at concentrations of 10, 100 and 500 μ M, partially prevented the increase in activation of the integrin α IIb β 3 that was induced by TB, but not by ADP. Therefore, our study indicates that HU has direct effects on the adhesive properties of leukocytes and platelets when activated. These effects, apparently in leukocytes, are intermediated partly by the property of this drug to release the anti-inflammatory molecule NO when in solution. The use of HU as an anti-inflammatory should be studied in patients with inflammatory diseases.

Key Words: Inflammation; neutrophils; platelets; cell adhesion; nitric oxide; hydroxyurea.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1. Evolução da Inflamação.** Resultados da inflamação aguda e crônica. (Adaptado do Kumar *et al.*⁸, 2005). 22
- Figura 2. Neutrófilos no processo inflamatório.** Após o reconhecimento da presença de uma citocina, neutrófilos migram ao endotélio ativado rolando sobre ele por intermédio de selectinas. Quimiocinas ativam integrinas como LFA-1 e MAC-1 ocasionando a firme adesão seguida de diapedese. Adaptado de Elsevier. Abbas *et al.*, Cellular and molecular Immunology. 6e- www.studentconsult.com 26
- Figura 3. Estrutura da hidroxiuréia.** (Adaptado: Spivack & Hasselbach 2011) 30
- Figura 4. Biochips para ensaios de adesão em fluxo utilizados na Plataforma VenaFluxTM® (Cellix, Irlanda).** Biochip no microscópio acoplado a bomba que mimetiza a circulação sanguínea. Imagem do site: <http://being-bioreactive.com/2014/04/17/2nd-workshop-dedicated-to-venaflex-june-5th-6th/> 35
- Figura 5. Efeito da hidroxiuréia na adesão de neutrófilos em diferentes ligantes: Ensaio de adesão estática.** Neutrófilos 2×10^6 cls/mL foram pré-tratados com HU (100, 500 e $1000 \mu\text{M}$) por 15 minutos e após esse período receberam o estímulo por TNF- α por 5 minutos. (A) Neutrófilos (2×10^6 cls/mL) foram permitidos aderir a FN ($20 \mu\text{g/mL}$) por 30 minutos (37°C , 5% CO_2). N=12. (B) Neutrófilos (2×10^6 cls/mL) foram permitidos aderir ao ICAM-1 ($10 \mu\text{g/mL}$) por 30 minutos (37°C , 5% CO_2). N=13 (C) Neutrófilos (2×10^6 cls/mL) foram permitidos a aderir ao ICAM-1 ($10 \mu\text{g/mL}$) e Selectina $1 \mu\text{g/ml}$ por 30 minutos (37°C , 5% CO_2). N=8. Resultados expressos em média \pm erro da média. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ comparado ao Basal, determinado por *test t* pareado e # $p < 0.05$ comparado ao TNF- α determinado por ANOVA seguido de Bonferroni..... 40
- Figura 6. Efeito da HU na adesão de neutrófilos: Ensaio microfluídico de adesão.** Neutrófilos (5×10^6 cls/mL) submetidos ao ensaio microfluídico e observado a adesão à FN ($20 \mu\text{g/mL}$) por 3 minutos (37°C), sob força de cisalhamento de $0,5 \text{ d/cm}^2$. Os neutrófilos foram pré-tratados com HU por 15 minutos e estimulados com TNF- α por 5 minutos N=15. (A) Neutrófilos sem estímulo. (B) Neutrófilos estimulados com TNF- α . (C) Neutrófilos incubados com HU $100 \mu\text{M}$ e estimulados por TNF- α . Resultados expressos em média \pm erro da média. *** $p < 0.001$ comparado ao Basal, determinado por *test t* pareado e # $p < 0.05$ comparado ao TNF- α , determinado por ANOVA seguido de Bonferroni. Foi determinado o número de células aderidas num campo de visão de 0.08 m^2 43
- Figura 7. Adesão de neutrófilos pré-tratados simultaneamente com PTIO e HU e sob estímulo inflamatório de TNF- α . Ensaio de adesão estática.** Neutrófilos (2×10^6 cls/mL) foram permitidos a aderir à FN ($20 \mu\text{g/mL}$) por 30 minutos (37°C , 5% CO_2). (A) Neutrófilos pré-tratados com HU $1000 \mu\text{M}$ e PTIO por 15 minutos (37°C , 5% CO_2) e depois estimulados com TNF- α durante 5 minutos N=15. (B) Neutrófilos pré-tratados com HU $500 \mu\text{M}$ e PTIO por 15 minutos (37°C , 5% CO_2) e depois estimulados com TNF- α durante 5 minutos N=11 Resultados expressos em média \pm erro da média. *** $p < 0.001$ comparado ao Basal, determinado por *test t* pareado, ## $p < 0,01$, # $p < 0.05$ comparado ao TNF- α , $p < 0.05$ comparado ao tratamento apenas com HU, determinado por ANOVA seguido de Bonferroni. 47
- Figura 8. Adesão de neutrófilos pré-tratados simultaneamente com PTIO e HU e sob estímulo inflamatório de TNF- α . Ensaio microfluídico de adesão.** Neutrófilos (5×10^6 cls/mL) foram permitidos aderir à FN ($20 \mu\text{g/mL}$) por 3 minutos (37°C), sob força de cisalhamento de $0,5 \text{ d/cm}^2$. Neutrófilos foram pré-tratados com/sem HU $100 \mu\text{M}$ e PTIO por 15 minutos (37°C , 5% CO_2) e depois estimulados com TNF- α durante 5 minutos N=12. Resultados expressos em média \pm erro da média e * $p < 0.05$ comparado ao Basal,

determinado por *test t* pareado e ### $p < 0.001$; comparado ao TNF- α determinado por ANOVA seguido de Bonferroni.48

Figura 9. Adesão de neutrófilos pré-tratados simultaneamente com ODQ e HU e sob estímulo inflamatório de TNF- α . Ensaio de adesão estática. Neutrófilos (2×10^6 cls/mL) foram permitidos a aderir à FN (20 μ g/mL) por 30 minutos (37°C, 5% CO₂). (A) Neutrófilos pré-tratados com HU 1000 μ M e ODQ por 15 minutos (37°C, 5% CO₂) e depois estimulados com TNF- α durante 5 minutos N=15. (B) Neutrófilos pré-tratados com HU 500 μ M e ODQ por 15 minutos (37°C, 5% CO₂) e depois estimulados com TNF- α durante 5 minutos N=11. Resultados expressos em média \pm erro da média. *** $p < 0.001$ comparado ao Basal, determinado por *test t* pareado, ## $p < 0,01$, # $p < 0.05$ comparado ao TNF- α , • $p < 0.05$ comparado ao tratamento apenas com HU, determinado por ANOVA seguido de Bonferroni.50

Figura 10. Adesão de neutrófilos pré-tratados simultaneamente com ODQ e HU e sob estímulo inflamatório de TNF- α . Neutrófilos (5×10^6 cls/mL) foram permitidos aderir à FN (20 μ g/mL) por 3 minutos (37°C), sob força de cisalhamento de 0,5 d/cm². Os neutrófilos foram pré-tratados com HU por 15 minutos e estimulados com TNF- α por 5 minutos, N=16. Resultados expressos em média \pm erro da média. ** $p < 0.01$ comparado ao Basal, determinado por *test t* pareado ### $p < 0.001$; comparado ao TNF- α e • $p < 0,05$ comparado ao tratamento de HU com TNF- α ; determinado por ANOVA seguido de Bonferroni. Foi determinado o número de células aderidas num campo de visão de 0,08 mm².51

Figura 11. Efeito da HU na adesão de plaquetas. Plaquetas (1×10^8 cls/mL) foram pré-tratadas com HU por 15 minutos e ativadas por TB por 15 minutos (37°C), em seguida foram submetidas ao ensaio microfluídico utilizando FB (50 μ g/mL) como ligante (2 minutos, 37°C, 0,3 d/cm²), N=8. Resultados expressos em média \pm erro da média. * $p < 0,05$ comparado ao basal, ## $p < 0.01$, # $p < 0.05$ comparado ao TB determinado por ANOVA seguido de Bonferroni. Foi determinado o número de células aderidas em um campo de visão de 0,064 mm².52

Figura 12. Efeito da HU na adesão de plaquetas. Plaquetas (1×10^8 cls/mL) foram pré-tratadas com HU por 15 minutos e ativadas por ADP por 15 minutos (37°C), em seguida foram submetidas ao ensaio microfluídico utilizando FB (50 μ g/mL) como ligante (2 minutos, 37°C, 0,3 d/cm²), N=6. Resultados expressos em média \pm erro da média. *** $p < 0.001$ comparado ao Basal, determinado por *test t* pareado e # $P < 0.05$ comparado ao TNF- α determinado por ANOVA seguido de Bonferroni. Foi determinado o número de células aderidas num campo de visão de 0,064 mm².53

Figura 13. O efeito do PTIO na adesão de plaquetas incubadas com hidroxiuréia e depois ativadas por ADP ou TB. Plaquetas (1×10^8 cls/mL) foram submetidas ao ensaio microfluídico utilizando FB (20 μ g/mL) como ligante (2 minutos, 37°C, força de cisalhamento 0,3 d/cm²). (A) As plaquetas foram pré-tratadas com HU e PTIO por 15 minutos e ativadas com ADP (20 μ M) por 15 minutos, N=6. (B) As plaquetas foram pré-tratadas com HU e PTIO por 15 minutos e ativadas com TB (50 U) por 15 minutos, N=6. Resultados expressos em média \pm erro da média. *** $p < 0.001$ e ** $p < 0,01$ comparado ao Basal, ## $p < 0.01$ comparado ao TNF- α determinado por ANOVA seguido de Bonferroni. Foi determinado o número de células aderidas num campo de visão de 0,064 mm².55

Figura 14. O efeito do ODQ na adesão de plaquetas incubadas com hidroxiuréia e depois ativadas por ADP ou TB. Plaquetas (1×10^8 cls/mL) foram submetidas ao ensaio microfluídico utilizando FB (20 μ g/mL) como ligante (2 minutos, 37°C, sob força de cisalhamento de 0,3 d/cm²). (A) As plaquetas foram pré-tratadas com HU e ODQ por 15 minutos e ativadas com ADP (20 μ M) por 15 minutos N.10. (B) As plaquetas foram pré-

tratadas com HU e ODQ por 15 minutos e ativadas com TB (50 U) por 15 minutos N=6. Resultados expressos em média \pm erro da média. *** $p < 0.001$ comparado ao Basal, determinado por *test t* pareado e ## $P < 0.01$ comparado ao TNF- α determinado por ANOVA seguido de Bonferroni. Foi determinado o número de células aderidas num campo de visão de 0,064 mm².57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Efeito de diferentes concentrações da hidroxiuréia, PTIO e ODQ na viabilidade de neutrófilos, de acordo com ensaio de MTT.....	40
Tabela 2. Efeito da hidroxiuréia na expressão das moléculas de adesão L-selectina, LFA-1 e Mac-1 na superfície dos neutrófilos estimulados com TNF- α	44
Tabela 3. Efeito da hidroxiuréia na expressão das moléculas de adesão LFA-1 e Mac-1 na sua conformação ativada na superfície dos neutrófilos estimulados com TNF- α	45
Tabela 4. Expressão da P-selectina (CD62P), integrina α IIb β 3 na sua conformação de alta afinidade e da glicoproteína GPIb/IX/V (CD42b) em plaquetas ativadas por ADP	58
Tabela 5. Expressão da P-selectina (CD62P), integrina α IIb β 3 na sua conformação de alta afinidade e da glicoproteína GPIb/IX/V (CD42b) em plaquetas ativadas por TB	59

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

ACD - Ácido Cítrico Dextrose

ADP- Adenosina difosfato

AF - Anemia falciforme

ANOVA - Análise de variância

ATP - Adenosina trifosfato

BSA - *Bovine Serum Albumin* (soro albumina bovina)

CD11a - Subunidade α da integrina LFA-1

CD11b - Subunidade α da integrina Mac-1

CD40L- Ligante para o CD40

CD42b - Proteína do complexo GP IIb/IIIa

CD62L- L-selectina

CD62P - P-selectina

d – *dynes* (dina - unidade de medida de força em fluídos)

DMSO - Sulfóxido de dimetilo

EPM - Erro padrão da média

FAP - Fator ativador plaquetário

FB - Fibrinogênio

FBS - *Fetal bovine serum* (soro bovino fetal)

FITC - *Fluorescein Isothiocyanate*

FN – Fibronectina

FSC - *Forward scatter*

FvW - Fator de von Willebrand

GC_s - Guanilil ciclase solúvel

GM - CFS - Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos

GMP - Guanosina monofosfato

GMP_c - Guanilil monofosfato cíclica

GTP - Guanosina trifosfato

HbF - Hemoglobina fetal

HbS - Hemoglobina S

HTAB - hexadeciltrimetil de amônio bromida

HU - Hidroxiuréia

ICAM - Molécula de adesão intercelular

IL-1 β - Interleucina 1 beta

IL-6 - Interleucina 6

IL-8 - Interleucina 8

LFA -1 - Antígeno-1 associado à função linfocitária

Mac -1 - Antígeno de macrófago 1

MIF - Média de intensidade de fluorescência

MIF - Média de intensidade de fluorescência

MPO - Mieloperoxidase

MTT - *3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide;Thiazolyl blue*

NOS - Óxido nítrico sintase

NO - Óxido nítrico

ODQ - 1H-[1, 2, 4] oxadiazolo [4,3-a] quinoxalin-1-one

PBS - *Phosphate Buffered Saline* (solução salina tamponada com fosfato)

PE - *Phycoerythin*

PKG - Proteína Kinase

Plq - Plaquetas

PRP - Plasma Rico em Plaquetas

PSGL -1 - Ligante de P-selectina 1

PTIO - 2-phenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide

SDS - Dodecil sulfato de sódio

SSC - *Side Scatter*

TA - Temperatura Ambiente

TB - Trombina

TNF- α - Fator de Necrose Tumoral alfa

TNF- β - Fator de Necrose Tumoral beta

VCAM - Molécula de Adesão Vascular

VLA-4 - Antígeno de expressão tardia 4

α IIb β 3 - Integrina alfa IIb beta 3 (GPIIb/IIIa, receptor para fibrinogênio)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
1.1. Inflamação	21
1.2. Doenças Inflamatórias	22
1.3. Resposta inflamatória	24
1.4. Neutrófilos na inflamação	25
1.5. Plaquetas	26
1.6. Ativação e adesão plaquetária	27
1.7. Plaquetas na inflamação	28
1.8. Óxido Nítrico	29
1.9. Hidroxuréia	30
2. OBJETIVOS	31
2.1. Objetivo geral	31
2.2. Objetivos específicos	31
3. JUSTIFICATIVA	31
4. MATERIAIS E MÉTODOS	32
4.1. Voluntários	32
4.2. Aspectos éticos de pesquisa	32
4.3. Neutrófilos	32
4.3.1. Separação de Neutrófilos	32
4.3.2. Tratamentos de neutrófilos com hidroxuréia ou agentes farmacológicos	33
4.3.3. Ensaio de adesão estática de neutrófilos	33
4.3.4. Preparo dos biochips <i>Vena8 Fluoro+</i> TM	34
4.3.5. Ensaio de adesão em fluxo em plataforma microfluídica <i>VenaFlux</i> [®]	34
4.3.6. Citometria de fluxo de neutrófilos	35
4.3.7. Ensaio de viabilidade celular (MTT)	36
4.4. Plaquetas	36
4.4.1. Separação de plasma rico em plaquetas (PRP)	36
4.4.2. Preparo dos biochips <i>Vena8 Fluoro+</i> TM	37
4.4.3. Ensaio de adesão em fluxo em plataforma microfluídica <i>VenaFlux</i> [®]	37
4.4.4. Citometria de fluxo: plaquetas	37
4.4.5. Tratamentos utilizados para plaquetas	38

4.5.	Reagentes e proteínas recombinantes utilizados nos ensaios de adesão	38
4.6.	Análise estatística	39
5.	RESULTADOS	40
5.1.	Ensaio de citotoxicidade MTT em neutrófilos.....	40
5.2.	Ensaio de adesão estática: A HU diminui a indução da adesão de neutrófilos pelo estímulo inflamatório TNF- α	41
5.3.	Ensaio de adesão em fluxo: Tratamento de neutrófilos com HU diminui a sua adesão após estímulo inflamatório com TNF- α	43
5.4.	Avaliação do efeito da HU na expressão das moléculas de adesão, LFA-1 e Mac-1 na superfície de neutrófilos	44
5.5.	Efeito da HU na ativação das integrinas LFA-1 e MAC-1 em neutrófilos estimulados com TNF- α	45
5.6.	Ensaio de adesão estática: O efeito da HU associada com PTIO na adesão de neutrófilos estimulados com TNF- α	46
5.7.	Ensaio de adesão em fluxo: O efeito da HU associada com PTIO na adesão de neutrófilos estimulados com TNF- α	48
5.8.	Ensaio de adesão estática: O efeito da HU associada com ODQ na adesão de neutrófilos estimulados com TNF- α	49
5.9.	Ensaio de adesão em fluxo: ODQ reverte parcialmente o efeito da HU sob a adesão de neutrófilos estimulados com TNF- α	51
5.10.	Ensaio de adesão em fluxo: A HU diminui a adesão de plaquetas ativadas por trombina	52
5.11.	Ensaio de adesão em fluxo: A HU diminui a adesão de plaquetas ativadas por ADP	53
5.12.	Ensaio microfluidico de adesão: O efeito de PTIO na adesão de plaquetas incubadas com HU e ativadas por ADP ou TB.....	54
5.13.	Ensaio microfluidico de adesão: O efeito da HU associada com ODQ na adesão de plaquetas ativadas por ADP ou TB.....	56
5.14.	Citometria de fluxo: O efeito da HU sobre a expressão da P-selectina, integrina α IIb β 3 na sua conformação de alta afinidade e da glicoproteína GPIb/IX/V em plaquetas ativadas por ADP	58
5.15.	Citometria de fluxo: O efeito da HU na expressão das moléculas de adesão P-selectina, integrina α IIb β 3 na sua conformação de alta afinidade e da glicoproteína GPIb/IX/V em em plaquetas ativadas por TB.....	59
6.	DISCUSSÃO	60
7.	CONCLUSÕES	65
8.	REFERÊNCIAS	66

1. INTRODUÇÃO

1.1. Inflamação

A inflamação é uma resposta imunológica essencial que permite a sobrevivência durante a infecção ou uma lesão mantendo a homeostase do tecido sob uma variedade de condições nocivas ¹. Quando um dano vascular é detectado, uma rápida resposta é montada envolvendo células endoteliais, plaquetas e leucócitos². Dependendo do tempo de duração, a inflamação pode ser classificada em aguda ou crônica. Quando aguda, a inflamação pode durar de horas a até poucos dias, apresentando predominantemente fenômenos exsudativos ^{3,4}; sendo principalmente caracterizada pela presença de neutrófilos, que são leucócitos altamente móveis, capazes de migrar rapidamente para o local da lesão ou infecção ⁵.

Quando os processos inflamatórios persistem por períodos de meses ou até mesmo anos, a inflamação é classificada como crônica, sendo uma resposta que se estende continuamente, com um processo ativo, destruição dos tecidos e reparação dos mesmos (Figura 1). Muitas das células imunes, incluindo macrófagos, neutrófilos e eosinófilos, estão envolvidas de forma direta ou através da produção de citocinas inflamatórias, sendo a marca deste estado crônico a descontrolada e excessiva migração de leucócitos do sangue periférico para os tecidos ^{3,4}. Todos estes mecanismos ocorrem simultaneamente e envolvem o influxo de outros leucócitos, como os monócitos do sangue, macrófagos teciduais e linfócitos⁶.

No entanto, a inflamação não controlada ou não-resolvida pode levar a lesões teciduais, dando origem a uma infinidade de doenças inflamatórias crônicas, incluindo síndromes metabólicas e patologias auto-imunes com eventual perda de função orgânica⁷.

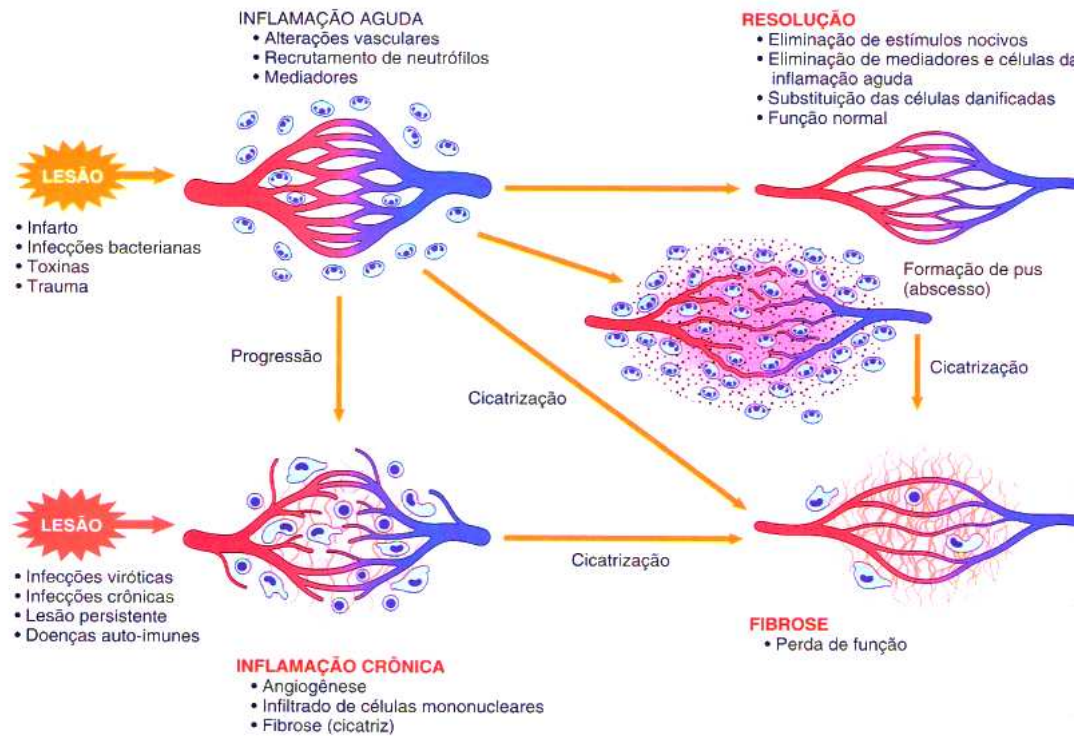


Figura 1. Evolução da Inflamação. Resultados da inflamação aguda e crônica. (Adaptado do Kumar *et al.*⁸, 2005).

1.2. Doenças Inflamatórias

A resposta inflamatória estéril (quando não ocorre infecção) a lesões de tecido e a morte celular é necessária para a cicatrização normal. No entanto sinais de inflamação persistentes ou não resolvidas não são características apenas de doenças inflamatórias clássicas⁸, mas também de doenças como Alzheimer¹⁰, Aterosclerose¹¹, doenças cardíacas¹², e câncer¹³.

Na artrite reumatoide, ocorre uma inflamação nas articulações através do infiltrado de células inflamatórias (macrófagos, linfócitos, neutrófilos, fibroblastos, células endoteliais). Os neutrófilos, que estão predominantemente no fluido sinovial, fagocitam complexos imunes e liberaram proteases potencialmente citotóxicas, além de serem capazes de se comunicar com outros tipos celulares e regularem as suas funções^{14, 15, 16}. Células inflamatórias são recrutadas para o tecido sinovial, onde elas aderem às células endoteliais e transmigram através da subcamada sinovial, formando complexos que irão produzir citocinas inflamatórias, quimiocinas, ativação de células B com produção de autoanticorpos, formação de imunocomplexos e fatores de crescimento que vão contribuir para a hiperplasia

da camada sinovial e estimular os sinoviócitos a produzirem mais citocinas e enzimas capazes de degradar a matriz óssea, provocando a destruição das articulações afetadas ^{17, 18}.

Anemia falciforme (AF) é uma doença genética que causa a produção da hemoglobina anômala, hemoglobina S (HbS). Quando herdado em homozigose a HbS tem a propensão a polimerizar sob baixas concentrações de oxigênio, ocasionando a polimerização das hemácias, as quais adquirem um formato de foice com aspecto rígido. As alterações nas hemácias podem resultar na ativação do endotélio e das células inflamatórias e, conseqüentemente, aumentar a adesão de células sanguíneas à parede do vaso, induzindo processos vaso-oclusivos. As plaquetas de indivíduos com AF apresentam propriedades inflamatórias, pois liberam altos níveis de fatores inflamatórios potentes, incluindo as citocinas LIGHT e CD40L ¹⁹. Proença *et al.*²⁰ demonstraram *in vitro* que as plaquetas de pacientes com AF apresentam maior capacidade de adesão aos componentes da matriz extracelular e à parede vascular, sugerindo que estas células podem contribuir com os processos vaso-oclusivos devido à produção e liberação de fatores inflamatórios no local. A produção contínua de citocinas, quimiocinas e outros mediadores inflamatórios pelo endotélio e células inflamatórias, perpetua o estado inflamatório crônico na AF ^{21, 22, 23,24}. Neutrófilos estão elevados em AF ²⁵ e desempenham uma importante função na fisiopatologia da doença. Evidências sugerem a participação dessas células desde o início até a propagação das crises vaso-oclusivas ^{26, 27}, pois leucócitos são relativamente grandes e rígidos, fazendo com que seu recrutamento para a microcirculação reduza o fluxo sanguíneo dos vasos ^{28, 29}. Várias características típicas da biologia da inflamação ocorrem na anemia falciforme, como ativação da cascata de coagulação, níveis elevados de molécula de adesão vascular (VCAM-1) solúvel e, algumas vezes, contagem elevada de plaquetas ^{30, 31}. Além disso, os níveis de alguns mediadores inflamatórios encontram-se elevados na AF, como por exemplo, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina 6 (IL-6), interleucina 1 beta (IL-1 β) e interleucina 8 (IL-8) ^{32, 33}.

Aterosclerose é uma doença inflamatória crônica multifatorial, provavelmente iniciada por disfunção endotelial, ocasionando uma resposta inflamatória, que estimula a migração e a proliferação de células musculares lisas, as quais agregam à área de inflamação, formando uma lesão mais complexa. As moléculas de adesão podem ser candidatas para adesão precoce de leucócitos no endotélio arterial em sítios de ateromas iniciais, destacando-se a ICAM-1 e a VCAM-1 ³⁴. Leucócitos são recrutados e ocorre a adesão de plaquetas ao endotélio na região da placa de ateroma. A resposta inflamatória é mediada por macrófagos e subtipos específicos de linfócitos, sendo que esses dois tipos

celulares se multiplicam no local da lesão, e quando ativados liberam enzimas hidrolíticas, citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento, que geram danos posteriores ³⁵. Com a progressão da doença, a artéria pode não conseguir compensar os danos sofridos, e assim ocasionar o rompimento da cápsula fibrosa que irá acarretar diversas doenças como, por exemplo, a trombose ou infarto do miocárdio ³⁶. Dados recentes propõem que alguns subtipos específicos de leucócitos têm maior valor preditivo na avaliação do risco cardiovascular, sendo ainda maior valor quando se emprega a razão entre o número total de neutrófilos e linfócitos ³⁷.

1.3. Resposta inflamatória

Uma das principais características da resposta inflamatória é representada pelo recrutamento de células, como os leucócitos especialmente os neutrófilos, os quais deixam a circulação e migram em direção ao local da inflamação; para isso acontecer, eles aderem ao endotélio vascular ativado. O recrutamento dos neutrófilos até o local da inflamação é mediado por uma cascata de eventos adesivos que incluem a captura, rolamento, adesão e a transmigração dos neutrófilos através das células endoteliais. Diversas citocinas e quimiocinas presentes em níveis alterados no plasma influenciam o desenrolar de todas essas etapas. Já os eventos adesivos são regulados pela expressão de diversas famílias das moléculas de adesão presentes tanto nos leucócitos como nas células endoteliais ^{38, 39}.

Durante uma inflamação sem infecção, quimiocinas, como TNF- α , interleucinas e fator de agregação plaquetária (PAF), são liberadas pelos tecidos e leucócitos após injúrias teciduais, ocasionando a quimiotaxia dos leucócitos e a liberação dos grânulos sem a fagocitose. No processo inflamatório, o equilíbrio entre recrutamento, liberação de substâncias tóxicas e apoptose dos neutrófilos é de fundamental importância para que o agente inflamatório seja erradicado e a resposta seja gradualmente interrompida ⁴⁰.

As principais citocinas mediadoras do processo inflamatório são: TNF- α e TNF- β , IL-1, e a família da IL-8 ⁴¹. O TNF- α é uma proteína sintetizada principalmente por macrófagos, monócitos, linfócitos e neutrófilos ^{42, 43}, exercendo efeitos pró-inflamatórios aumentando as propriedades quimiotáticas, aumentando a aderência de neutrófilos ao endotélio vascular devido à indução da expressão e função das moléculas de adesão e também estimula a produção de radicais livres, e a síntese de outros mediadores inflamatórios como IL-1 e PGE₂ (prostanglandina) ⁴⁴.

1.4. Neutrófilos na inflamação

Os neutrófilos representam 70% das células de defesa do nosso organismo e possuem uma meia vida curta (6-8h) na circulação periférica. Estas células participam da resposta primária a inflamação aguda e chegam ao local de inflamação por deixar a circulação, aderir ao endotélio vascular ativado, migrando em direção ao tecido inflamado ⁴⁵.

Em indivíduos adultos saudáveis, os neutrófilos estão em estado de repouso, para que seu conteúdo intracelular tóxico não seja liberado acidentalmente e conseqüentemente provocar danos aos tecidos em redor. Os neutrófilos são ativados quando há a presença de produtos microbianos, citocinas ou quimiocinas, tais como: fator de TNF- α , GM-CSF, interleucina-1 (IL-1), IL-6, IL-8 e interferon γ ou outras substâncias liberadas pelas células do tecido lesado, depois de ativados, os neutrófilos migram para o local inflamado ^{1, 46, 47}.

O deslocamento destas células para o local da inflamação inicia por sua captura e, em seguida, rolamento ao longo das vênulas nos leitos vasculares periféricos e isto é mediado primeiramente pelas selectinas, que são constituídas de três tipos, L, E e P-selectinas ^{48, 49}. As células endoteliais quando ativadas causam aumento da expressão das selectinas, as quais são responsáveis pelo primeiro contato entre células do endotélio e os neutrófilos. Este contato inicial é mediado pelas E-Selectina e P-Selectina expressas no endotélio e por PSGL-1 e L-Selectina (CD62L) expressas pelos neutrófilos ^{50, 51, 52, 53, 54, 55}. Esta etapa faz com que os neutrófilos em circulação sejam capturados pelas células do endotélio próximas da área inflamada. As mesmas moléculas medeiam o rolamento de neutrófilos através do endotélio. A L-Selectina é expressa constitutivamente na membrana dos neutrófilos e, depois de mediar esta primeira etapa do processo de adesão, é eliminada e entra na circulação sanguínea ⁵⁶. Os neutrófilos em rolamento detectam quimiocinas imobilizadas na membrana das células endoteliais ativadas, o que causa alterações conformacionais nas integrinas da superfície dos neutrófilos para estados de elevada afinidade ^{50, 55, 57}. As integrinas- β 2 LFA-1 (CD11a/CD18) e Mac-1 (CD11b/CD18), quando ativadas, intermediam a adesão firme de neutrófilos a células do endotélio através da ligação às integrinas ICAM-1 e ICAM-2 na superfície do endotélio ^{50, 52, 58}.

Posteriormente, os leucócitos podem migrar por diapedese através da monocamada endotelial e da membrana basal para os tecidos. Esta etapa é complexa e pouco compreendida e envolve extensos mecanismos moleculares. Após esta migração transendotelial e extravasamento dentro dos tecidos, os leucócitos recebem novos sinais, frequentemente na forma de gradientes de quimiocinas, para continuar o processo de recrutamento para o local de inflamação ^{59, 60}, evitando assim, que a infecção se propague enquanto uma resposta imune é montada ⁶¹.

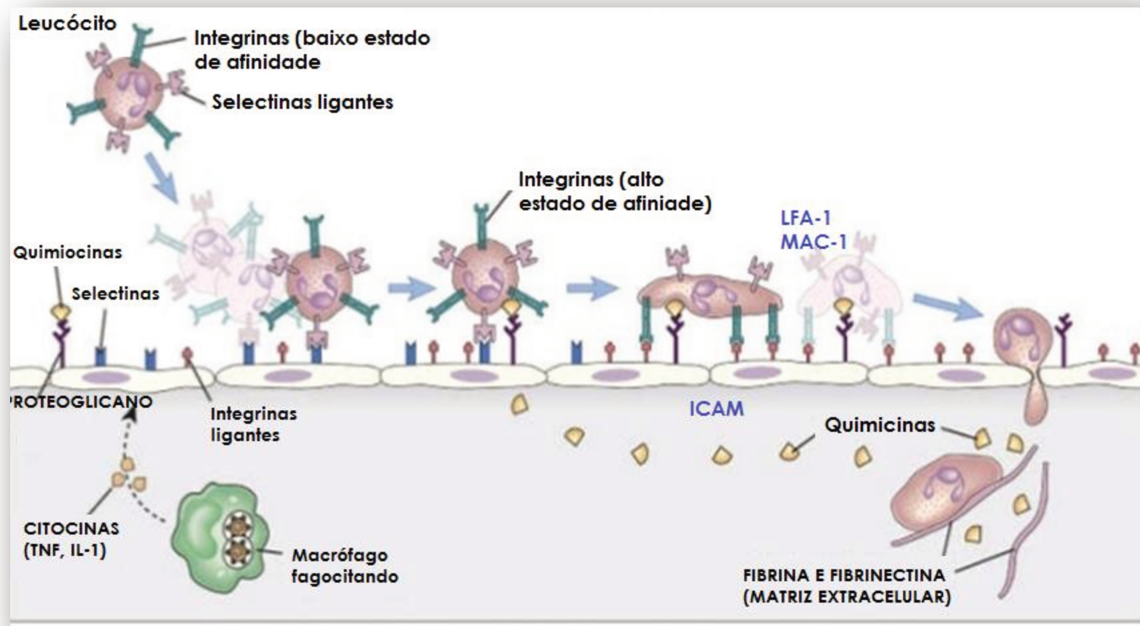


Figura 2. Neutrófilos no processo inflamatório. Após o reconhecimento da presença de uma citocina, neutrófilos migram ao endotélio ativado rolando sobre ele por intermédio de selectinas. Quimiocinas ativam integrinas como LFA-1 e MAC-1 ocasionando a firme adesão seguida de diapedese. Adaptado de Elsevier. Abbas *et al.*, Cellular and molecular Immunology. 6e- www.studentconsult.com

1.5. Plaquetas

Plaquetas são pequenos fragmentos celulares anucleados derivados do citoplasma com estrutura discoide complexas, produzidas na medula óssea a partir dos megacariócitos⁶³. Apesar de não possuírem núcleo e não poderem se reproduzir, as plaquetas apresentam muitas características funcionais de células completas⁶⁴. Do total de plaquetas presentes no organismo, 70% estão na circulação sanguínea e 30% no baço. Indivíduos saudáveis apresentam a concentração de plaquetas 150 a 400x10³ por µL de sangue as quais permanecem na circulação de 7 a 10 dias⁶⁵ e após esse período são retiradas através do baço e fígado⁶⁶.

Em condições fisiológicas normais plaquetas circulam próximo o endotélio, quando ocorre uma injúria vascular, plaquetas aderem rapidamente aos locais onde há rupturas endoteliais formando um tampão hemostático a fim de evitar o excesso da perda de sangue, esse processo é criticamente dependente da adesão de plaquetas à matriz subendotelial e assim como a capacidade das plaquetas de sofrerem alterações bioquímicas e morfológicas rápidas que suportam a agregação e ativação localizada da cascata de coagulação⁶⁷.

As membranas plasmáticas das plaquetas possuem receptores como glicoproteínas da família das integrinas com domínios extracelulares transmembrana e citoplásmico que permitem a sua ativação durante a agregação, ocasionando a mudança da sua forma discóide para projeções da membrana plasmática e liberação do conteúdo dos grânulos intraplaquetários. As plaquetas apresentam dois tipos diferentes de grânulos, os grânulos alfa que contêm fibrinogênio, fibronectina, fator de crescimento e os grânulos densos ou corpúsculos eletrodensos, os quais armazenam adenosina difosfato (ADP), adenosina trifosfato (ATP), cálcio ionizado, histamina, serotonina e adrenalina ⁶⁸.

1.6. Ativação e adesão plaquetária

As plaquetas circulam normalmente através dos vasos sanguíneos na forma inativa e não adesiva, porém expressam glicoproteínas de superfície (GP) as quais se ligam aos receptores de plasma e/ou proteínas adesivas da matriz extracelular, tais como: colágeno, Fator de Von Willebrand (VWF) e fibrinogênio ⁶⁹. Em condições de repouso o endotélio libera prostaciclina e óxido nítrico, o qual inibe a ativação e agregação plaquetária ⁷⁰. Entretanto, em resposta a um dano endotelial, infecção por bactéria ou alteração do fluxo sanguíneo normal, turbulência ou taxas de cisalhamento, fazem com que as plaquetas fiquem mais lentas e capazes de rolar sobre o endotélio lesado fazendo uma firme adesão sobre o mesmo ^{71, 72}.

A adesão de plaquetas envolve varias etapas de ativação intracelular, alterações morfológicas, alterações das propriedades da membrana plasmática, desgranulação e liberação de mediadores solúveis que amplificam a ativação ^{73, 74}.

Quando presentes no local da lesão vascular, as plaquetas formam uma adesão estável com o colágeno e outras macromoléculas da matriz subendotelial. A ligação das plaquetas com o colágeno é mediada pela glicoproteína GPVI ⁷⁵ e pela integrina $\alpha_2\beta_1$, enquanto as integrinas $\alpha_5\beta_1$ e $\alpha_6\beta_1$ se ligam a fibronectina e laminina, respectivamente ⁷⁶. Após a sua adesão, as plaquetas sofrem uma série de alterações bioquímicas e morfológicas complexas que ocasionam a liberação de grânulos e regulação da função da integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$, a qual é responsável por recrutar plaquetas adicionais culminando na regulação positiva do receptor de fibrinogênio ($\alpha_{IIb}\beta_3$) ^{73, 74}.

Quando $\alpha_{IIb}\beta_3$ está ativada liga-se a VWF, fibrinogênio, fibrina e fibronectina, sendo também indispensável para a formação de agregados plaquetários estáveis ⁶³. Plaquetas ativadas liberam mediadores tais como ADP e serotonina, e também mediadores de plasma

como a epinefrina e a trombina ativando as proteínas G das plaquetas acopladas aos seus receptores. Estes eventos aumentam os níveis de cálcio citosólico e ativa as vias de sinalização específicas, resultando na alteração da forma das plaquetas e ativação das integrinas que também promovem a firme adesão. Após a ativação, as plaquetas liberam o conteúdo α e seus grânulos densos, o qual é responsável pela liberação do ADP que atua sobre o receptor P2Y₁ das plaquetas e ao receptor P2Y₁₂ acoplado a proteína G, o que desencadeia ainda mais a ativação plaquetária e a liberação de ADP. O receptor P2Y₁₂ mantém a ativação plaquetária em resposta ao ADP, tendo um papel central no processo de amplificação ⁷⁷.

1.7. Plaquetas na inflamação

A função das plaquetas como mediadoras da hemostasia e trombose é bastante conhecida e documentada, entretanto atualmente várias evidências têm sugerido um importante papel delas na inflamação ⁷⁸. As plaquetas quando ativadas expressam e secretam mediadores inflamatórios capazes de induzir uma resposta inflamatória em leucócitos e células endoteliais, estas células, por sua vez, também produzem uma série de mediadores que ativam as plaquetas ^{79, 80}.

Durante a resposta inflamatória, neutrófilos são recrutados e perdem sua morfologia simétrica, tornando-se polarizados com a apresentação de diferentes proteínas na sua superfície, como a PSGL-1 (ligante para P-selectina). Por sua vez, a interação destas células com plaquetas e a formação de agregados parece ser essencial para o início do processo inflamatório ⁸¹. A expressão de P-selectina nas plaquetas e a subsequente formação de agregados de leucócitos e plaquetas aumentam as funções pró-inflamatórias dos leucócitos. Além disso, os grânulos α de plaquetas contêm uma ampla gama de citocinas as quais possuem efeito predominantemente pró-inflamatórios ⁸². No entanto, a interação P-selectina / PSGL-1 tem um papel importante no rolamento de leucócitos e adesão a plaquetas e ao endotélio, que são passos críticos no processo de extravasamento de leucócitos durante a inflamação ⁸³.

1.8. Óxido Nítrico

O óxido nítrico (NO) é um gás e um radical livre muito reativo que atua como molécula de sinalização celular; é também um dos maiores reguladores do tônus vascular, especificamente arteriolar além de ser responsável por varias funções fisiológicas⁸⁴. É um agente fisiológico de vida curta, *in vitro* e meia vida de aproximadamente 1 minuto em hemoglobina livre, enquanto que no sangue total torna-se imensurável devido ao rápido metabolismo pelas células vermelhas⁸⁵.

NO é sintetizado a partir da L-arginina através das óxido nítrico sintases (NOS). Existem três isoformas de enzimas que produzem NO: as eNOS expressa principalmente no endotélio, a nNOS expressas no cérebro e a iNOS que são enzimas induzida. O NO expresso principalmente pelo endotélio (eNOS) é responsável por manter o baixo tônus vascular, inibir a adesão dos leucócitos e a agregação plaquetária^{86, 87}. O NO formado constitutivamente pelo neurônio (nNOS) atua como um neuro-modulador ou neuro-mediador em alguns neurônios centrais e periféricos. O NO formado pela iNOS, presente em macrófagos e em outras células, tem papel múltiplo na resposta inflamatória⁸⁸.

A enzima guanilil ciclase solúvel (GCs) possui um importante papel na sinalização do NO⁸⁶. GCs é uma enzima heterodimérica com um grupo prostético contendo heme, cuja função é aumentar os níveis intracelulares de GMPc. A sinalização NO-GCs-GMPc pode ser prejudicada com a baixa disponibilidade de óxido nítrico quanto pelo estado ferro-oxidado da GCs, que se torna refrataria ao sGC catalisando a conversão de GTP em GMPc o segundo mensageiro. Os efeitos celulares e fisiológicos de GMPc, inclui: vasodilatação, inibição da proliferação de células do músculo liso, prevenção da fibrose, efeitos antitrombóticos e anti-inflamatórios, são mediados por três principais alvos celulares: proteína quinase dependente (PKG), canais de cátions (PKA), e fosfodiesterases^{89, 90, 91}.

A ativação da guanilato ciclase leva ao aumento intracelular de GMPc, o qual torna ativada a quinase dependente de GMPc que media a ação de NO, incluindo o vaso-relaxamento, aumento da permeabilidade vascular, bem como os efeitos antiproliferativos, anti-plaquetários e antioxidantes do NO⁹².

1.9. Hidroxuréia

A hidroxuréia (HU, Figura 3) tem sido alvo de interesse científico há mais de 100 anos, é amplamente utilizada no tratamento de várias doenças mieloproliferativas e neoplásicas. A fácil administração e a baixa toxicidade, bem como o baixo custo e os múltiplos benefícios de ordem clínica, garantem à hidroxuréia lugar de destaque em vários esquemas terapêuticos⁹³.

HU é absorvida pelo trato gastrointestinal, e após 1h 30 minutos da ingestão atinge picos sanguíneos tendo disponibilidade de quase 100%⁹⁴, possui solubilidade em água e entra na célula por meio de difusão passiva, possui uma meia vida de 3 á 4 horas no organismo sendo excretado via sistema renal⁹⁵.

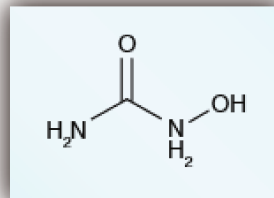


Figura 3. Estrutura da hidroxuréia. (Adaptado: Spivack & Hasselbach⁹⁵ 2011)

Desde 1960 a HU vem sendo aplicada, na medicina, para o tratamento de várias doenças⁹⁷, entre elas incluem-se especialmente neoplasias, como a leucemia mielóide crônica, policitemia vera, carcinoma de cabeça e pescoço, ovário e cervix, e melanoma^{98, 99, 100}. Com o tempo, vários outros efeitos benéficos foram sendo atribuídos a essa droga, e agora a HU é utilizado como terapia para o tratamento dos sintomas de anemia falciforme (AF), agindo principalmente, por aumentar a produção de hemoglobina fetal que por sua vez inibe a polimerização da hemoglobina S anormal destes indivíduos. Adicionalmente, em pacientes portadores de AF em uso de HU, foi observada uma diminuição na contagem de plaquetas e leucócitos, uma redução da ativação do endotélio^{101, 102}, mudanças na expressão de moléculas de adesão^{23, 103, 104} e a geração de óxido nítrico¹⁰⁵. Em infarto agudo do miocárdio, a terapia com HU em modelo animal diminui a contagem de leucócitos, e reduziu de forma significativa à reação inflamatória, melhorando as funções cardíacas após o infarto¹⁰⁶. Nos últimos anos, foi verificado que a HU também atua como um doador de NO, o qual tem um papel importante na manutenção do fluxo e da pressão sanguínea normal, representando um provável mecanismo importante pelo qual a HU age *in vivo*^{107, 108}.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Investigar o efeito *in vitro* da hidróxiureia nas propriedades adesivas dos neutrófilos e plaquetas sob estímulo inflamatório ou de ativação, e investigar a participação da via dependente de óxido nítrico nesses efeitos.

2.2. Objetivos específicos

1. Avaliar as propriedades adesivas dos neutrófilos e plaquetas em condições de ativação celular;
2. Avaliar o efeito da hidroxauréia nas propriedades adesivas dos neutrófilos e plaquetas em condições inflamatórias ou de ativação, através das técnicas de adesão estática e adesão em plataforma microfluídica;
3. Investigar o mecanismo celular pelo qual a hidróxiureia age para inibir a adesão de neutrófilos em condições inflamatórias;
4. Avaliar o efeito da hidroxauréia na expressão e atividade das moléculas de adesão e a participação da via dependente de óxido nítrico nesta atividade e expressão.

3. JUSTIFICATIVA

Os neutrófilos são as primeiras células inflamatórias a chegarem aos sítios de inflamados e aderirem ao endotélio ativado, levando a eventos fisiopatológicos que podem alterar o fluxo sanguíneo. Atualmente várias evidências têm sugerido um importante papel das plaquetas na inflamação. Entretanto, pouco se sabe sobre os mecanismos intracelulares que regulam a expressão e função das moléculas de adesão na superfície de neutrófilos durante o processo adesivo destas células na presença de estímulos inflamatórios, sendo necessárias novas abordagens farmacológicas potenciais para minimizar o recrutamento de neutrófilos e plaquetas durante a inflamação. HU é uma droga amplamente utilizada como quimioterápico e também no tratamento de AF. Sabe-se que a HU possui efeitos anti-inflamatórios, que podem ser mediados pela propriedade da droga de doar NO *in vitro*¹⁰⁷. Dados previamente obtidos em nosso laboratório demonstraram que plaquetas de pacientes com AF (modelo de doença inflamatória crônica) apresentam uma maior capacidade de adesão às células endoteliais e componentes da parede vascular e que as plaquetas destes pacientes tem a capacidade de ativar o endotélio *in vitro*^{20, 109}; há também

evidências de que a quantidade de plaquetas nesses pacientes seja maior e que estas plaquetas liberam moléculas inflamatórias potentes como TNFSF14 (LIGHT) e CD42L¹¹⁰, outros dados indicam que vias de sinalização dependente de NO podem modular a capacidade adesiva de leucócitos humanos^{111,112}. Almeida *et al.*, 2015¹⁰⁸, constatou *in vivo* (camundongos saudáveis) que o efeito doador de óxido nítrico da HU pode ser benéfico para combater a inflamação decorrente do processo hemolítico. Os efeitos benéficos da HU podem ser mediados por uma via dependente de NO e deste modo, torna-se interessante o estudo dos efeitos da HU nas propriedades adesivas de neutrófilos quando estes recebem um estímulo inflamatório e plaquetas ativadas e ainda investigar se este efeito é intermediado por uma via de sinalização dependente em óxido nítrico.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Voluntários

O sangue total utilizado para separação dos neutrófilos e plaquetas foi obtido de indivíduos saudáveis voluntários com idade entre 18 e 60 anos, compreendendo doadores de sangue do Hemocentro da UNICAMP, alunos e funcionários. Todos os participantes estavam sem uso de medicações anti-inflamatórias, analgésicas ou anticoagulantes. Esses indivíduos não receberam nenhuma compensação financeira.

4.2. Aspectos éticos de pesquisa

Este estudo foi aprovado em 16/07/2015 pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, parecer nº 1.145.426, conforme previsto na resolução nº. 196/96 do Conselho Nacional de Saúde (CNS). Todos os participantes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido, previamente aprovados pelo CEP.

4.3. Neutrófilos

4.3.1. Separação de Neutrófilos

Foram coletadas amostras de sangue periférico (7 ml) em tubos contendo citrato de sódio (3,2%), o qual foi submetido ao gradiente de densidade Ficoll-paque®, foram feitas duas camadas com densidades iguais a 1.119g/L e 1.077g/L, respectivamente, e posteriormente adicionado o sangue sobre elas. O gradiente foi então centrifugado a 700g por 30 minutos à temperatura ambiente para obter a camada de células granulocíticas, a qual foi separada, transferida e lavada com PBS (salina tamponada fosfatada) 1X (pH=7,4). Após isso, a camada de granulócitos foi submetida à lise hipotônica (solução de amônia -

155mM NH₄CL, 10mM KHCO₃) a fim de romper hemácias contaminantes. As células foram novamente lavadas com PBS 1x, e posteriormente foram ressuspensas em meio RPMI 1640 (pH=7,2) de acordo com a concentração celular necessária para cada experimento realizado.

4.3.2. Tratamentos de neutrófilos com hidroxiuréia ou agentes farmacológicos

Suspensões de neutrófilos em concentrações de 2×10^6 cel/ml foram co-incubadas (37°C, 5% CO₂) com hidroxiuréia (100, 500 e 1000µM) (Sigma) e com o estímulo inflamatório TNF-α (200ng/ml) (R&D Systems). Os neutrófilos foram co-incubados com a hidroxiuréia primeiramente por 15 minutos (37°C, 5% CO₂), após isso foi adicionado o TNF-α e co-incubado por mais 5 minutos nas mesmas condições. Em seguida, as células foram utilizadas nos ensaios de adesão. Para citometria de fluxo, os neutrófilos foram pré-tratados com HU e incubados por 15 minutos (37°C, 5% CO₂), após esse período de foi adicionado o TNF-α por mais 15 minutos nas mesmas condições anteriores.

Para avaliar se a HU age como uma doadora de NO nestas condições, as células (2×10^6 cel/ml) foram co-incubadas (37°C, 5% CO₂) com hidroxiuréia (500 - 1000µM) (Sigma) juntamente com PTIO (2-fenilo-4,4,5,5-tetrametilimidazolina-1-oxilo-3-óxido) nas concentrações de 1000, 500, 250, 50 e 5µM ou ODQ (1H-[1, 2, 4] oxadiazolo [4,3-a] quinoxalina-1-um) nas concentrações 0,1, 1 e 10µM por 15 minutos e em seguida para induzir o estímulo inflamatório, foram co-incubadas por 5 minutos com TNF-α (200ng/ml) (R&D Systems). Depois de incubados as células foram submetidas aos ensaios de adesão.

4.3.3. Ensaio de adesão estática de neutrófilos

Para avaliar as propriedades adesivas de neutrofilos sob estímulo inflamatório, foram realizados ensaios de adesão estática. Para isso, placas contendo 96 poços foram previamente preparadas por *coating* individual, onde cada poço recebeu 60µl do ligante desejado (fibronectina 20µg/mL, ICAM 10µg/mL ou E-selectina 1µg/mL) por 16 a 20 horas, 4°C. Após esse período os poços foram lavados três vezes com 160µl de PBS 1x. Posteriormente foram adicionados 100µl PBS/BSA (Soro albumina bovina) 0,5% (v/v) e incubados por 90 minutos à 37°C, afim de bloquear os sítios não específicos. Mais duas lavagens foram feitas com 160 µl PBS 1x e após secar a placa, os neutrófilos (2×10^6 células/ml) foram adicionados num volume de 50 µl/poço. Após a incubação por 30 minutos (37°C, 5% CO₂), as células não aderidas foram removidas com 2 lavagens de 160 µl PBS 1x. Para que as células aderidas não sofressem desidratação foram adicionados 50µl de meio RPMI. Uma curva padrão foi construída para cada amostra através de diluições

seriadas da suspensão original de neutrófilos. As placas foram congeladas por pelo menos 12 horas antes de medir o conteúdo de Mieloperoxidase (MPO) tanto das células da curva padrão como nas do ensaio. Posteriormente a placa foi descongelada e então adicionada em cada poço 100µl de HTAB (hexadeciltrimetil de amônio bromida 0,5%) depois de homogeneizado 20µl da solução foi pipetado para uma nova placa e adicionado a 200µl de solução de o-dianisidina (*o-dianisidine dihydrochlorido* 0,167mg/ml, peroxidase de hidrogênio 0,0005% em tampão de fosfato de potássio, 50 mM, pH 6.0), e após cinco minutos foi mensurada a absorvância utilizando o leitor de ELISA (Versa Max tunable microplatereader, EUA) num comprimento de onda igual a 492nm, que quantifica reação do substrato de o-dianisidina na presença de peróxido de hidrogênio com o conteúdo da mieloperoxidase, enzima presente nos grânulos dos neutrófilos e comparada a curva padrão de cada indivíduo.

4.3.4. Preparo dos biochips *Vena8 Fluoro+*TM

Os biochips foram preparados com 10µl de fibronectina 20µg/mL para cada canal, de forma a preenchê-lo completamente e, em seguida, este chip foi incubado em câmara úmida à temperatura ambiente *overnight*. Após a incubação, cada canal do biochip foi bloqueado com BSA 1% (v/v) durante 30 min, para evitar as ligações inespecíficas e, depois desse período, os canais foram lavados duas vezes com PBS.

4.3.5. Ensaio de adesão em fluxo em plataforma microfluídica VenaFlux[®]

Para os ensaios de adesão em fluxo, foi utilizado o equipamento VenaFlux (Cellix Ltd.), um sistema automatizado baseado no fluxo fisiológico, o qual consiste em uma bomba de fluxo MirusTM nanopump 2.0 Evo que promove forças de cisalhamento ou *shear stress* (força exercida pelo fluxo sanguíneo em cada unidade de área de superfície endotelial - Toetsch *et al.*, 2009) controladas por um computador que utiliza o software Vennaflux Assay específico para esta plataforma. A bomba promove um fluxo contínuo que desloca suspensões celulares aos microcanais de biochips desenvolvidos para uso neste sistema. O biochip fica acoplado a uma plataforma conectada a um microscópio óptico invertido (Carl Zeiss Axiovert CFL, Alemanha) e este microscópio possui uma câmera digital (DeltaPix Camera, Denmark) que adquire e transmite as imagens simultaneamente ao computador.

Os biochips utilizados na plataforma são feitos de plástico de alta qualidade. Para os ensaios realizados foram utilizados os biochips, *Vena8 Fluoro+*TM, que possuem capilares

nas dimensões de 400 μm (L) x 100 μm (D) x 20mm (C), onde células purificadas ou amostras sanguíneas podem fluir sobre moléculas de adesão (*Vena8 Fluoro+*TM) (Figura 4).

Para esses experimentos os neutrófilos depois de serem incubados, foram dispensados nos canais do biochip com um *shear stress* de 0,5d/cm² por 3 minutos para que fosse possível aderir aos microcanais. A quantificação da adesão foi realizada através da contagem de células estáticas nas imagens adquiridas nos primeiros 10 segundos e após 2 minutos e 40 segundos de fluxo das células. A análise e quantificação das adesões foram feitas, posteriormente, através da visualização das 42 imagens adquiridas por canal. O número de células aderidas foi avaliado visualmente em 3 diferentes posições do canal em um campo de 0,08 mm² e as imagens adquiridas pela câmera utilizando uma objetiva com magnificação de 40X para os experimentos de adesão. Um neutrófilo foi considerado como aderido quando permaneceu nas imagens por 30s ou mais. Este tempo foi considerado baseado em publicações prévias em Finnegan *et. al.*, 2007¹¹³ e Dominical *et. al.*, 2014¹¹⁴.

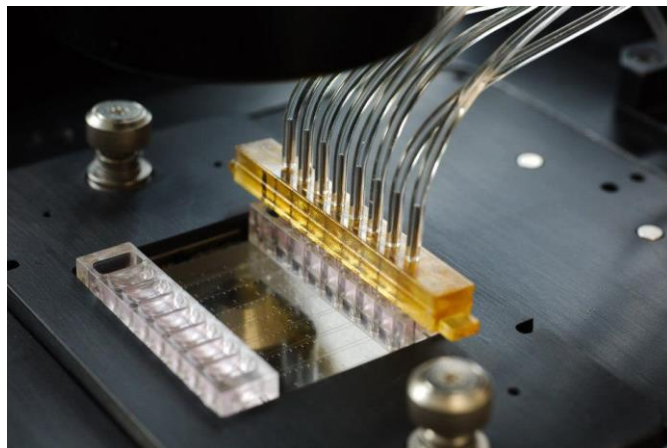


Figura 4. Biochips para ensaios de adesão em fluxo utilizados na Plataforma VenaFluxTM® (Cellix, Irlanda). Biochip no microscópio acoplado a bomba que mimetiza a circulação sanguínea. Imagem do site: <http://being-bioreactive.com/2014/04/17/2nd-workshop-dedicated-to-venaflex-june-5th-6th/>

4.3.6. Citometria de fluxo de neutrófilos

A expressão das moléculas de adesão na superfície dos neutrófilos foram detectadas através da citometria de fluxo. Após o tratamento 100 μl das células foram incubadas com a concentração de saturação de anticorpo monoclonal anti-CD62L conjugado ao fluorocromo PE, anti-CD11a conjugado ao fluorocromo FITC e o anti-CD11b conjugado ao fluorocromo PE-Cy7 (BD PharmingenTM California, USA). Após incubar as células com os anticorpos por 30 minutos, 4°C e protegido da luz, foram adicionados 500 μL de PBS em cada tubo e em seguida as células foram centrifugadas (700g por 5 minutos). O sobrenadante foi removido

após a centrifugação e as células foram ressuspendidas em 300 µL de PSB. 10 000 células foram adquiradas utilizando um FACScalibur (Becton-Dickinson), laser 488 nm SSC/FSC (*side scatter/forward scatter*); *dot plots* foram usados para identificar a população de neutrófilos.

4.3.7. Ensaio de viabilidade celular (MTT)

Este método foi originalmente descrito por Mosman em 1983, e pode ser utilizado para medir citotoxicidade, proliferação e ativação celular. É um ensaio colorimétrico que se baseia na redução do MTT (*3-[4,5-dimetiltiazol-2-yl]-2,5-difeniltetrazolio bromida; Tiazolilo azul*), pelas desidrogenases mitocondriais de células vivas e tem sido usado como uma alternativa para as técnicas radioativas. A reação produz o sal formazan que é insolúvel em água, mas solúvel em solventes orgânicos.

Para esse ensaio após o tratamento das células (2×10^6 cel/mL) com agentes farmacológicos (como descrito anteriormente), as amostras foram centrifugadas (10 min; 500xg; 4°C) e os sobrenadantes desprezados para que a droga fosse retirada do meio e não provocasse oxidação. Os *pellets* foram ressuspendidos em volume igual do meio. Como controle positivo, foi utilizada uma suspensão celular viável sem o efeito da hidroxureia, e como controle negativo (células não viáveis), uma suspensão celular lisada por congelamento à -80°C.

Em seguida 100µL das amostras e 10µL de MTT (5mg/mL em PBS; concentração inicial; 1 parte para cada 9 partes da suspensão celular; filtrado em filtro 0,22µm; protegido da luz), foram adicionados em triplicata, a uma placa de 96 poços (placa comum de ELISA). Essa placa foi incubada por 3 horas à 37°C, 5% CO₂, ar úmido, após a qual foi adicionado 100µL de SDS 10% em HCl 0,01M para lisar as células.

Após a adição de SDS 10% (dodecil sulfato de sódio) uma incubação de 18 horas à 37°C, 5% CO₂, foi feita e no final desta, foi realizado a leitura por um espectrofotômetro (Multiscan MS, Labsystems, EUA) a 540 nm (baseado na publicação de Guerreiro *et al.*¹¹⁵, 2007) e os resultados expressos através da leitura da absorbância.

4.4. Plaquetas

4.4.1. Separação de plasma rico em plaquetas (PRP)

Foram coletadas amostras de sangue periférico (8 ml) em tubo contendo Citrato Dextrose; essas amostras foram centrifugadas a 200g/24°C por 15 minutos para a obtenção do plasma rico em plaquetas (PRP). Em seguida, a contagem de plaquetas foi realizada no

contador automático AcT Diff™ (Beckman & Coulter) e as plaquetas ressuspendidas em Krebs (118 mM NaCl / 25 mM NaHCO₃ / 1.2 mM KH₂PO₄ / 1.7 mM MgSO₄ / 5.6 mM glicose, pH=7,4). A concentração final de plaquetas foram ajustadas de acordo com o experimento a ser realizado.

4.4.2. Preparo dos biochips *Vena8 Fluoro+*™

Para os ensaios de adesão em fluxo, foi utilizado o equipamento VenaFlux (Cellix Ltd.), com os biochips, *Vena8 Fluoro+*™, que possuem capilares nas dimensões de 400 µm (L) x 100 µm (D) x 20mm (C) e 800 µm (L) x 120 µm (D) x 20mm (C), respectivamente. Os chips foram preparados com 10µl de fibrinogênio 50µg/mL para cada canal, de forma a preenchê-lo completamente e, em seguida, este chip foi incubado em câmara úmida à temperatura ambiente *overnight*. Após a incubação, cada canal do biochip foi bloqueado com BSA 1% (v/v) durante 30 min, para evitar as ligações inespecíficas e, depois desse período, os canais foram lavados duas vezes com PBS.

4.4.3. Ensaios de adesão em fluxo em plataforma microfluidica VenaFlux®

Nesses experimentos as plaquetas depois de serem incubados com HU, ODQ ou PTIO e ativadas com ADP ou TB foram incubadas com 30µl de *Rhodamine 6G Chloride* 0,1µg/ml (*Enzo life Sciences*) para que fosse possível visualiza-lás. Após isso foram dispensadas imediatamente nos canais do biochip com um *shear stress* de 0,3d/cm² por aproximadamente 2 minutos para aderir aos microcanais. A quantificação da adesão foi realizada através da contagem das plaquetas em um video adquirido após um minuto de fluxo. O número de plaquetas aderidas foi avaliado visualmente em um campo de 0,064 mm² e as imagens adquiridas pela câmera utilizando uma objetiva com aumento de 60X para os experimentos de adesão.

4.4.4. Citometria de fluxo: plaquetas

As expressões das moléculas de adesão na superfície das plaquetas foram determinadas através da citometria de fluxo. As moléculas P-selectina (anti-CD62P– FITC; clone AK6) e a integrina αIIbβ3 na sua conformação de alta afinidade (utilizando o PAC-1– FITC, que reconhece a integrina αIIbβ3 quando ativada) e da glicoproteína GPIb/IX/V (anti-CD42b-APC; clone Psel.K02.3), receptor de superfície do vWF foram analisadas. Os anticorpos foram adquiridos da Becton Dickinson, San Jose, CA, USA. Amostras de PRP de plaquetas foram obtidas, e, depois de centrifugada por 20min, 200g, 21°C. As plaquetas

(1×10^8) foram fixadas em 200 μ L de solução de PBS com 1% de paraformaldeído (10min, TA) e lavadas com 2 mL de PBS e centrifugadas por 15min a 800g (21°C). O sobrenadante foi descartado e os *pellets* de plaquetas ressuspensos com 45 μ L de PBS e anticorpos correspondentes adicionados e incubados por 20min, protegido da luz, TA. Após a marcação com os anticorpos, seguida de uma nova lavagem como descrito anteriormente. Ao final, o sobrenadante foi desprezado e as plaquetas foram ressuspensas em 300 μ L de PBS. As amostras foram analisadas a 488 nm no equipamento FACScalibur (Becton-Dickinson, San Jose, CA, USA). Foram obtidos 10000 eventos para cada amostra. Histogramas de SSC/FSC (side scatter/forward scatter) foram utilizados para a identificação das populações de plaquetas.

4.4.5. Tratamentos utilizados para plaquetas

Suspensões de plaquetas em concentrações de 1×10^8 cel/ml foram co-incubados (37°C, 5% CO₂) com hidroxipuréia (10 μ M, 100 μ M e 1000 μ M) (Sigma) por 15 minutos e, em seguida, para ativá-las, foram co-incubadas por 5 minutos com ADP (20 μ M) ou trombina (TB) (50UM) (R&D Systems) e posteriormente incubados por 5 minutos (37°C, 5% CO₂), em seguida foram submetidos ao biochip para que pudessem aderir durante o fluxo.

Para avaliar o efeito que a HU exerce sobre plaquetas foram utilizadas plaquetas em concentrações de 1×10^8 cel/ml que foram co-incubados (37°C, 5% CO₂) com hidroxipuréia (10 μ M) (Sigma) junto com ODQ (0.1 e 10 μ M) ou PTIO (5 e 10 μ M) por 15 minutos e, em seguida, para ativa-las, foram co-incubadas por 5 minutos com ADP (20 μ M) ou trombina (TB) (50UM) (R&D Systems) e posteriormente incubados por 5 minutos (37°C, 5% CO₂), em seguida submetidas ao biochip para que pudessem aderir durante o fluxo.

4.5. Reagentes e proteínas recombinantes utilizados nos ensaios de adesão

ADP (Adenosine 5'-diphosphate sodium salt, Sigma - A2754-100-100mg), utilizado na concentração de 20 μ M para ativação plaquetária.

Fibronectina (obtida de plasma humano solução a 0,1% testado em cultura celular, Sigma – F0895 – 2mg), utilizada na concentração de 20 μ g/mL para promoção da adesão em ensaios de adesão estática e em fluxo de neutrófilos.

Fibrinogênio (fraction I, from human plasma, Sigma –F-4883-500mg) utilizado na concentração de 50 μ g/mL para promover a adesão em fluxo de plaquetas;

ICAM-1/CD54 recombinante humano, Cat N. ADP4, *R&D systems, Minneapolis, MN, USA* – concentração de 10µg/mL utilizada para promoção da adesão estática de neutrófilos;

E-selectina recombinante humano, Cat N. ADP1, *R&D systems, Minneapolis, MN, USA* – concentração de 1µg/mL utilizada para promoção da adesão estática de neutrófilos;

Hidroxiuréia (H8627-10G, Sigma), utilizada nas concentrações de 10µM 100µM, 500µM e 1000µM para adesão estática de neutrófilos, adesão em fluxo e citometria de neutrófilos e plaquetas.

Trombina (bovine Cat N. 128680, HemosIL), utilizado na concentração de 50 UM para ativar plaquetas;

TNF-α/TNFSF1A recombinante humano, *Cat N. 210-TA, R&D systems, Minneapolis, MN, USA* - concentração de 200ng/mL, para indução do estímulo inflamatório em neutrófilos;

ODQ (1H-[1, 2, 4] oxadiazolo [4,3-a] quinoxalin-1-one, CAS Number 41443-28-1, Sigma), utilizado nas concentrações 10 µM, 1 µM e 0.1 µM para inibir a via guanilil ciclase em ensaios de adesão estática de neutrófilos e adesão em fluxo de neutrófilos e plaquetas.

PTIO (2-phenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide, CAS Number 18390-00-6, Sigma), utilizado nas concentrações de 1000µM, 500 µM, 250µM, 50 µM e 5µM utilizado como sequestrador de NO em ensaios de adesão estática de neutrófilos e adesão em fluxo de neutrófilos e plaquetas.

Rhodamine 6G Chloride (CAS Number 989-38-1, Enzo Life Sciences), utilizado na concentração de 0,1 µg/µl como fluorescência para plaquetas em ensaios de adesão em fluxo.

4.6. Análise estatística

Os dados foram analisados pelo software GraphPad Prism version 5. Para as análises estatísticas, foram feitos testes paramétricos quando a distribuição foi normal (ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni). Os resultados foram expressos como média ± erro da média. Valores de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

5. RESULTADOS

5.1. Ensaio de citotoxicidade MTT em neutrófilos

Neutrófilos de indivíduos saudáveis foram coletados e isolados para realização dos ensaios. Foi avaliado em ensaio de redução do MTT para verificar se as diferentes concentrações de HU (100 - 1000 μM), PTIO (5-1000 μM) e ODQ (0,1 -10 μM) e DMSO (veículo utilizado para a diluição de PTIO e ODQ) afetariam a viabilidade dos neutrófilos durante 30 minutos de incubação à 37°C, 5% CO_2 . Como pode ser observado na Tabela 1, não houve nenhum efeito tóxico desses compostos nos neutrófilos, quando comparado aos neutrófilos que não receberam tratamento.

Tabela 1. Efeito de diferentes concentrações da hidroxiuréia, PTIO e ODQ na viabilidade de neutrófilos, de acordo com ensaio de MTT

Células/tratamento	Concentração	"Redução de MTT" (OD/2×10⁶ cel.ml⁻¹)
Neutrófilos viáveis		0.231±0.051
Neutrófilos não viáveis		0.060±0.001
HU	100 μM	0.245±0.077
HU	500 μM	0.268±0.078
HU	1000 μM	0.266±0.077
PTIO	5 μM	0.257±0.074
PTIO	50 μM	0.263±0.124
PTIO	250 μM	0.145±0.046
PTIO	1000 μM	0.258±0.041
ODQ	0.1 μM	0.223±0.056
ODQ	1 μM	0.231±0.051
ODQ	10 μM	0.223±0.056
DMSO	1%	0.242±0.074

Dados representam média dos valores \pm EPM de 4 experimentos (cada um em triplicata). Dados determinado por ANOVA (*repeated measures*) seguido de *Bonferroni Multiple Comparisons Test* comparado aos neutrófilos viáveis.

5.2. Ensaio de adesão estática: A HU diminui a indução da adesão de neutrófilos pelo estímulo inflamatório TNF- α

As propriedades adesivas dos neutrófilos de indivíduos saudáveis foram avaliadas *in vitro* através do ensaio de adesão celular estática, utilizando as moléculas de adesão: fibronectina 20 μ g/mL (Figura 5A), ICAM-1 recombinante 10 μ g/mL (Figura 5B) e ICAM-1 10 μ g/mL/E-Selectina 1 μ g/ml (Figura 5C) como ligantes. Neutrófilos isolados (2x10⁶/ml) foram pré- incubados com HU (100, 500 e 1000 μ M) por 15 minutos (37°C) e após com TNF- α (200ng/ml, 37°C) durante 5 minutos. A citocina TNF- α foi capaz de induzir a adesão dos neutrófilos aos ligantes fibronectina e ICAM-1 e a combinação dos dois ligantes (Figura 5). Por sua vez a pré-incubação dos neutrófilos com HU na concentração de 1000 μ M foi capaz de prevenir as alterações celulares induzidas pelo TNF- α , diminuindo a sua adesão. Assim ficou estabelecido que essa concentração fosse utilizada nos próximos experimentos com HU e com o ligante FN uma vez que esse apresentou melhores resultados sendo financeiramente inviável testar as três moléculas em ensaio microfluídico de adesão.

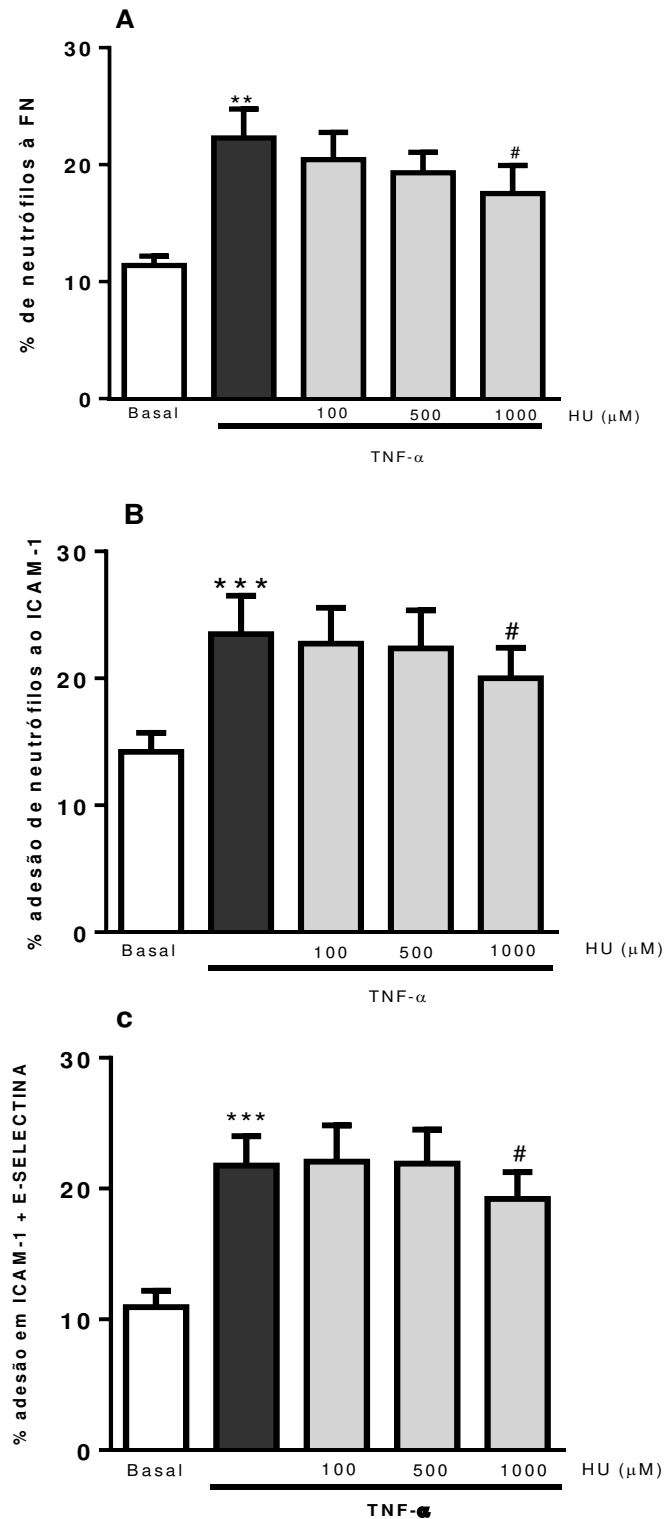


Figura 5. Efeito da hidroxiur3eia na ades3o de neutr3filos em diferentes ligantes: Ensaio de ades3o est3tica. Neutr3filos 2×10^6 cls/mL foram pr3-tratados com HU (100, 500 e 1000 μ M) por 15 minutos e ap3s desse per3odo receberam o est3mulo por TNF- α por 5 minutos. (A) Neutr3filos (2×10^6 cls/mL) foram permitidos aderir a FN (20 μ g/mL) por 30 minutos (37°C, 5% CO₂). N=12. (B) Neutr3filos (2×10^6 cls/mL) foram permitidos aderir ao ICAM-1 (10 μ g/mL) por 30 minutos (37°C, 5% CO₂). N=13 (C) Neutr3filos (2×10^6 cls/mL) foram permitidos a aderir ao ICAM-1 (10 μ g/mL) e Selectina 1 μ g/ml por 30 minutos (37°C, 5% CO₂). N=8. Resultados expressos em m3dia \pm erro da m3dia. *** p<0.001, ** p<0.01 comparado ao Basal, determinado por *test t* pareado e # p<0.05 comparado ao TNF- α determinado por ANOVA seguido de Bonferroni.

5.3. Ensaio de adesão em fluxo: Tratamento de neutrófilos com HU diminui a sua adesão após estímulo inflamatório com TNF- α

O equipamento VenaFlux (Cellix Ltd.) é um sistema automatizado baseado no fluxo fisiológico. Este sistema microfluídico permite analisar a adesão celular em tempo real, simulando um fluxo sanguíneo, dessa forma tornou-se importante utilizar essa tecnologia a fim de observar o efeito anti-inflamatório da HU. Os neutrófilos de indivíduos saudáveis (5×10^6 células/mL) foram pré-tratados com HU nas concentrações de 100, 500 e 1000 μM por 15 minutos e após isso receberam estímulo inflamatório por TNF- α (200ng/mL) por 5 minutos. Posteriormente, os neutrófilos foram submetidos à plataforma utilizando a fibronectina (20 $\mu\text{g/mL}$) como ligante e sob fluxo de $0,5 \text{ d/cm}^2$, por 3 minutos. Com isso foi possível observar (Figura 6) que o TNF- α exerce poder inflamatório nos neutrófilos e que a HU foi capaz de diminuir significativamente a adesão em fluxo nas concentrações de HU de 100 e 1000 μM .

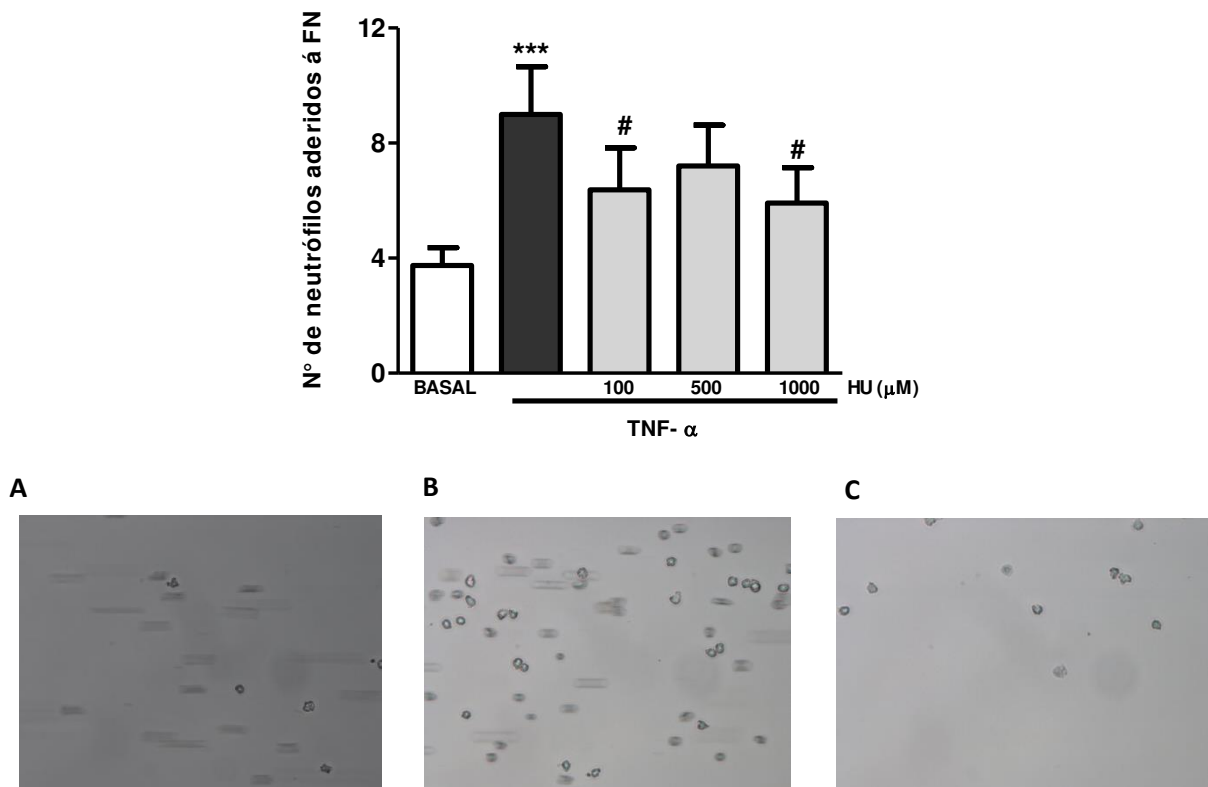


Figura 6. Efeito da HU na adesão de neutrófilos: Ensaio microfluídico de adesão. Neutrófilos (5×10^6 cels/mL) submetidos ao ensaio microfluídico e observado a adesão à FN (20 $\mu\text{g/mL}$) por 3 minutos (37°C), sob força de cisalhamento de $0,5 \text{ d/cm}^2$. Os neutrófilos foram pré-tratados com HU por 15 minutos e estimulados com TNF- α por 5 minutos N=15. (A) Neutrófilos sem estímulo. (B) Neutrófilos estimulados com TNF- α . (C) Neutrófilos incubados com HU 100 μM e estimulados por TNF- α . Resultados expressos em média \pm erro da média. *** $p < 0.001$ comparado ao Basal, determinado por *test t* pareado e # $p < 0.05$ comparado ao TNF- α , determinado por ANOVA seguido de Bonferroni. Foi determinado o número de células aderidas num campo de visão de 0.08 m^2 .

5.4. Avaliação do efeito da HU na expressão das moléculas de adesão, LFA-1 e Mac-1 na superfície de neutrófilos

A expressão das L-selectinas e das subunidades alfa das integrinas LFA-1 (CD11a) e Mac-1 (CD11b), na superfície de neutrófilos, foram determinadas por citometria de fluxo. Para esses experimentos os neutrófilos foram pré-tratados com HU 100, 500 e 1000 μ M, e incubados por 15 minutos a 37°C, antes de receberem o estímulo inflamatório com TNF- α (mais 15 minutos a 37°C). A expressão das subunidades da selectina e das integrinas está descrito na Tabela 2 como média de intensidade de fluorescência (MIF) dos neutrófilos positivos para o marcador fluorescente destas proteínas. Nos dados obtidos foi possível observar que o TNF- α aumentou as expressões de CD11a e CD11b na superfície de cada célula (expresso como MIF), entretanto o tratamento com HU não foi capaz de alterar a expressão das moléculas analisadas, a redução da expressão de L-selectina após a incubação com TNF- α se comparada a níveis basais não foi estatisticamente significativa.

Tabela 2. Efeito da hidroxiuréia na expressão das moléculas de adesão L-selectina, LFA-1 e Mac-1 na superfície dos neutrófilos estimulados com TNF- α

Molécula	CD11a (LFA-1)	CD11b (MAC-1)	CD62L (L-selectina)
Tratamento	MIF\pmEMP	MIF\pmEMP	MIF\pmEMP
Basal	58,36 \pm 1,9	286 \pm 34,30	96,24 \pm 16,18
HU (1000 μM)	58,35 \pm 2,4	313 \pm 4,93	106,8 \pm 20,27
TNF-α	64,21 \pm 2,4 ***	501,9 \pm 64,16 ***	32,89 \pm 4,1
TNF-α + HU (100 μM)	61,96 \pm 3,2	480,6 \pm 78,09	34,41 \pm 4,9
TNF-α + HU (500 μM)	63,03 \pm 3.3	497,2 \pm 75,91	32,56 \pm 4.6
TNF-α + HU (1000 μM)	63,94 \pm 3,3	510,8 \pm 74,45	34,41 \pm 4,7

Os resultados da expressão das moléculas de adesão estão representados como média de intensidade de fluorescência (MIF) de anticorpo ligado para cada neutrófilo \pm erro médio padrão (EMP).

5.5. Efeito da HU na ativação das integrinas LFA-1 e MAC-1 em neutrófilos estimulados com TNF- α

As integrinas se apresentam nas conformações “não ativadas” e “ativadas”, e é possível observar se a integrina se encontra na sua conformação ativada pelo uso de anticorpos que reconhecem as integrinas na sua conformação ativada. A expressão das subunidades das moléculas de adesão LFA-1 e Mac-1 (CD11a e CD11b, respectivamente) na suas conformações ativadas foram avaliadas nas superfície dos neutrófilos, antes e depois de tratamento com TNF- α , utilizando a citometria de fluxo. Para os experimentos os neutrófilos foram pré-incubados com HU por 15 min e em seguida receberam o estímulo inflamatório TNF- α (200ng/mL, 15 min). Os dados observados na Tabela 3 mostram que o TNF- α não aumentou a ativação da integrina LFA-1 de forma significativa. Em contraste a ativação da integrina MAC-1 (subunidade CD11b) na superfície dos neutrófilos sob estímulo de TNF- α apresentou um aumento significativo, no entanto, a presença de HU não alterou o efeito do TNF- α em MAC-1.

Tabela 3. Efeito da hidroxiuréia na expressão das moléculas de adesão LFA-1 e Mac-1 na sua conformação ativada na superfície dos neutrófilos estimulados com TNF- α

Molécula	CD11a (LFA-1)	CD11b (MAC-1)
Tratamento	MIF\pmEMP	MIF\pmEMP
Basal	64,45 \pm 6,63	190 \pm 30,63
HU(1000 μM)	64.03 \pm 6,1	220,5 \pm 39,88
TNF-α	75,28 \pm 7,2	311 \pm 64,84 ***
TNF-α + HU (100 μM)	74,17 \pm 6,4	301,3 \pm 44,89
TNF-α + HU (500 μM)	74,52 \pm 6,8	305,5 \pm 53,09
TNF-α + HU (1000 μM)	75,92 \pm 7,6	313,7 \pm 59,63

Os resultados da expressão das moléculas de adesão na sua conformação ativada estão representados como média de intensidade de fluorescência (MIF) de anticorpo ligado para cada neutrófilo \pm erro médio padrão (EMP).

5.6. Ensaio de adesão estática: O efeito da HU associada com PTIO na adesão de neutrófilos estimulados com TNF- α

Existem evidências que a HU tem a capacidade de doar NO. Para analisar essa propriedade, utilizamos nos ensaios de adesão estática o PTIO, o qual tem a função de sequestrar o NO, inibindo as atividades do mesmo. Para esse ensaio, neutrófilos na concentração 2×10^6 c/s/mL foram pré-incubadas com HU nas concentrações de 500 e 1000 μ M na presença ou ausência de PTIO por 15 minutos nas concentrações de 5, 50, 250 e 1000 μ M. Após essa incubação os neutrófilos receberam um estímulo inflamatório com TNF- α (200ng/mL) durante 5 minutos (37°C), e então foram permitidos aderir a FN (20 μ g/mL) por 30 minutos (37°C, 5% CO₂). Nossos dados demonstraram que nas concentrações de 50, 250 e 1000 μ M o PTIO reverte o efeito da HU 1000 μ M na adesão estimulada por TNF- α (Figura 7A). O PTIO na concentração de 500 μ M reverteu o efeito do HU 500 μ M na adesão de neutrófilos estimulados por TNF- α , Figura 7B.

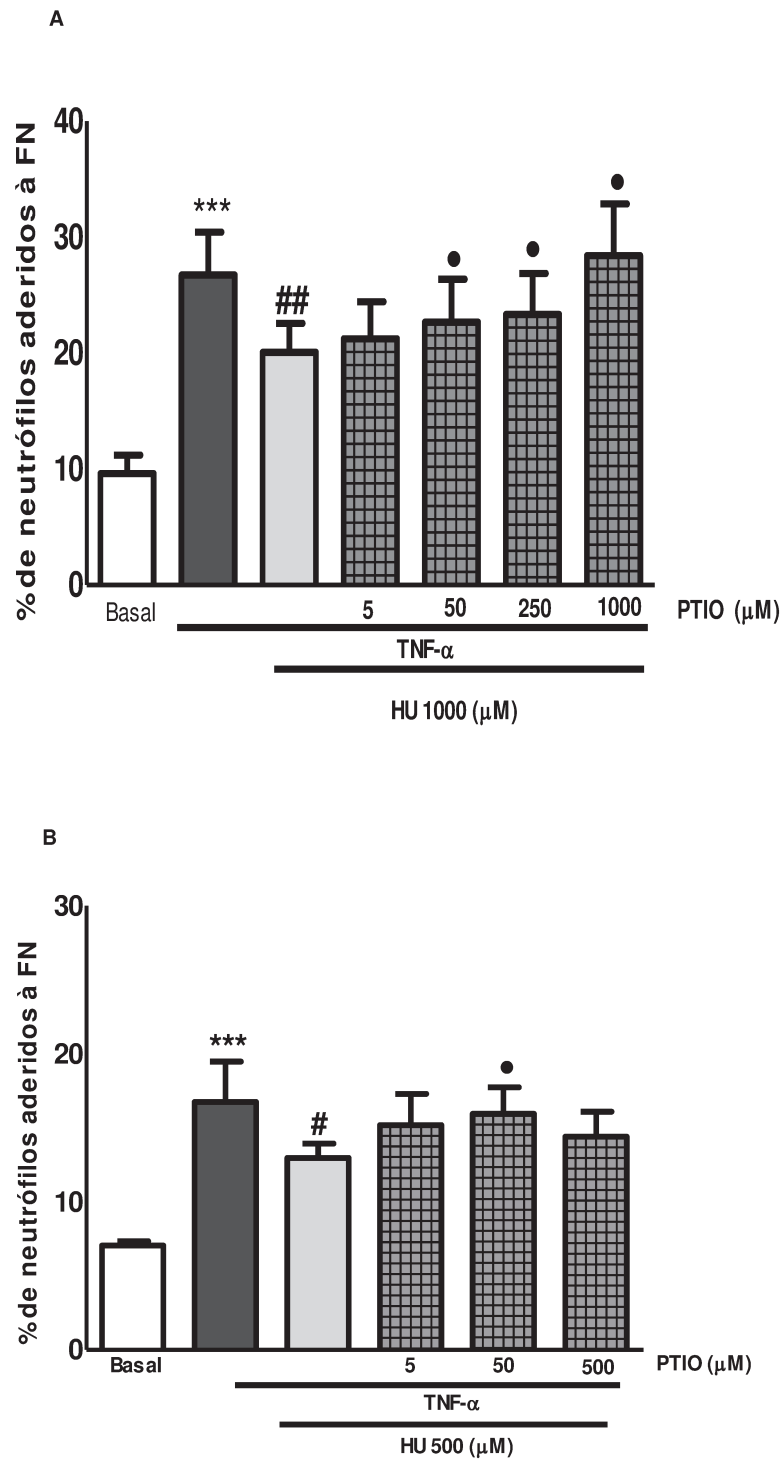


Figura 7. Adesão de neutrófilos pré-tratados simultaneamente com PTIO e HU e sob estímulo inflamatório de TNF- α . Ensaio de adesão estática. Neutrófilos (2×10^6 cls/mL) foram permitidos a aderir à FN ($20 \mu\text{g/mL}$) por 30 minutos (37°C , 5% CO_2). (A) Neutrófilos pré-tratados com HU $1000 \mu\text{M}$ e PTIO por 15 minutos (37°C , 5% CO_2) e depois estimulados com TNF- α durante 5 minutos $N=15$. (B) Neutrófilos pré-tratados com HU $500 \mu\text{M}$ e PTIO por 15 minutos (37°C , 5% CO_2) e depois estimulados com TNF- α durante 5 minutos $N=11$. Resultados expressos em média \pm erro da média. *** $p < 0.001$ comparado ao Basal, determinado por *test t* pareado, ## $p < 0,01$, # $p < 0.05$ comparado ao TNF- α , • $p < 0.05$ comparado ao tratamento apenas com HU, determinado por ANOVA seguido de Bonferroni.

5.7. Ensaios de adesão em fluxo: O efeito da HU associada com PTIO na adesão de neutrófilos estimulados com TNF- α

Nos ensaios de adesão em fluxo, foi utilizado HU 100 μM e PTIO nas concentrações de 5 e 50 μM . Para esse ensaio os neutrófilos foram pré-tratados com HU e PTIO simultaneamente, e depois incubados a 37°C, 5% CO₂ por 15 minutos. Após este período, as células receberam estímulo inflamatório por TNF- α (200ng/mL) e foram incubados por mais 5 minutos nas mesmas condições descritas anteriormente. Em contraste ao observado nos ensaios de adesão estática, a incubação das células com PTIO junto ao HU não alterou a adesão dos neutrófilos, quando comparado com o tratamento somente com HU, conforme observado na Figura 8.

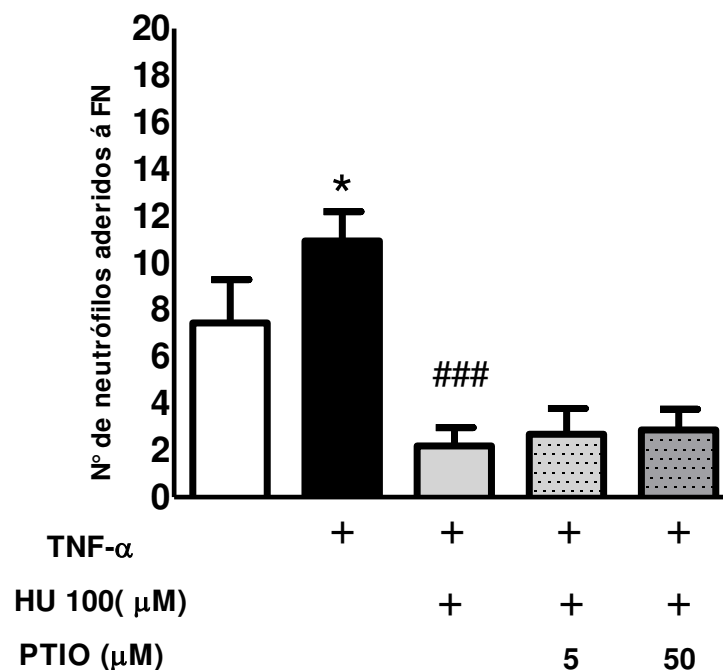


Figura 8. Adesão de neutrófilos pré-tratados simultaneamente com PTIO e HU e sob estímulo inflamatório de TNF- α . Ensaio microfluídico de adesão. Neutrófilos (5×10^6 cels/mL) foram permitidos aderir à FN (20 $\mu\text{g/mL}$) por 3 minutos (37°C), sob força de cisalhamento de 0,5 d/cm². Neutrófilos foram pré-tratados com/sem HU 100 μM e PTIO por 15 minutos (37°C, 5% CO₂) e depois estimulados com TNF- α durante 5 minutos N=12. Resultados expressos em média \pm erro da média e *p<0.05 comparado ao Basal, determinado por *test t* pareado e ###p<0.001; comparado ao TNF- α determinado por ANOVA seguido de Bonferroni.

5.8. Ensaio de adesão estática: O efeito da HU associada com ODQ na adesão de neutrófilos estimulados com TNF- α

Para analisar se a HU age na via dependente de NO, pela via guanilil ciclase solúvel (GCs), utilizamos o ODQ, o qual é uma droga que inibe a enzima GCs. Para os ensaios de adesão estática foram utilizados dois tratamentos distintos, no primeiro deles os neutrófilos foram pré-tratados simultaneamente com HU 1000 μ M e ODQ nas concentrações de 0.1, 1 e 10 μ M e foram incubados a 37°C, 5% CO₂ durante 15 minutos. Após esse tempo as células foram estimuladas com TNF- α (200ng/mL) e incubados por mais 5 minutos nas mesmas condições (Figura 9A). No segundo tratamento os neutrófilos foram pré-tratados simultaneamente com HU 500 μ M e ODQ nas concentrações de 0.1, 1 e 10 μ M e incubados a 37°C, 5% CO₂ por 15 minutos. Após essa incubação, os neutrófilos foram estimulados com TNF- α (200ng/mL) durante 5 minutos e incubados nas mesmas condições (Figura 9B). Após as incubações, a adesão dos neutrófilos à FN foi determinada durante 30 minutos (37°C). Nos resultados obtidos foi possível observar que o ODQ apresenta uma tendência em reverter o efeito da HU 1000 μ M sob a quantidade de neutrófilos aderidos, no entanto este efeito não foi significativo.

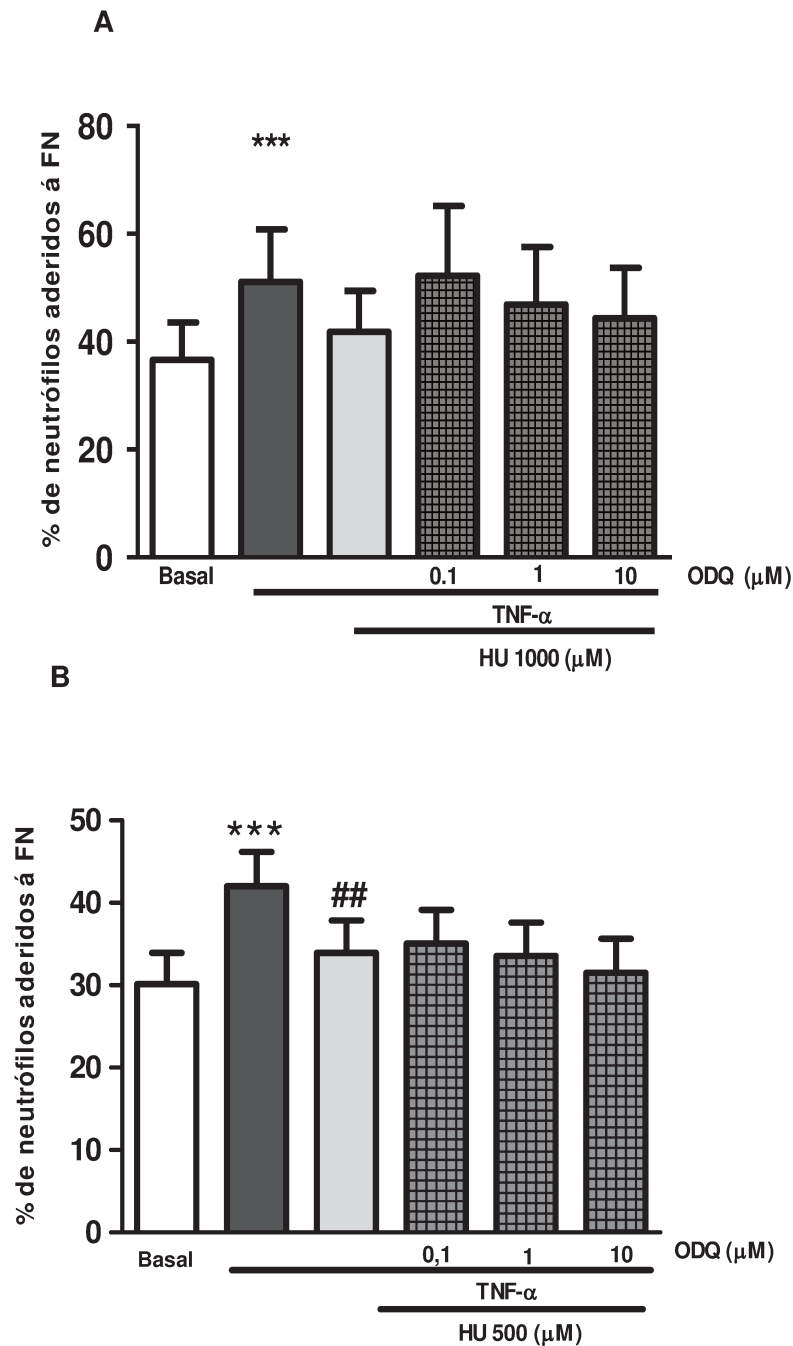


Figura 9. Adesão de neutrófilos pré-tratados simultaneamente com ODQ e HU e sob estímulo inflamatório de TNF- α . Ensaio de adesão estática. Neutrófilos (2×10^6 cels/mL) foram permitidos a aderir à FN ($20 \mu\text{g/mL}$) por 30 minutos (37°C , $5\% \text{CO}_2$). (A) Neutrófilos pré-tratados com HU $1000 \mu\text{M}$ e ODQ por 15 minutos (37°C , $5\% \text{CO}_2$) e depois estimulados com TNF- α durante 5 minutos $N=15$. (B) Neutrófilos pré-tratados com HU $500 \mu\text{M}$ e ODQ por 15 minutos (37°C , $5\% \text{CO}_2$) e depois estimulados com TNF- α durante 5 minutos $N=11$. Resultados expressos em média \pm erro da média. *** $p < 0.001$ comparado ao Basal, determinado por *test t* pareado, ## $p < 0,01$, # $p < 0.05$ comparado ao TNF- α , * $p < 0.05$ comparado ao tratamento apenas com HU, determinado por ANOVA seguido de Bonferroni.

5.9. Ensaio de adesão em fluxo: ODQ reverte parcialmente o efeito da HU sob a adesão de neutrófilos estimulados com TNF- α

Nos ensaios de adesão em fluxo, foram utilizados HU 100 μ M e ODQ nas concentrações de 0,1 e 10 μ M. Para esse ensaio os neutrófilos foram pré-tratados com HU e ODQ simultaneamente e incubados a 37°C, 5% CO₂ por 15 minutos. Após este período, as células receberam estímulo inflamatório por TNF- α e foram incubados por mais 5 minutos nas mesmas condições anteriores. O uso de ODQ 0,1 μ M, junto com HU, reverteu parcialmente o efeito da HU na adesão dos neutrófilos estimulados com TNF- α (200ng/mL) como demonstrado na Figura 10.

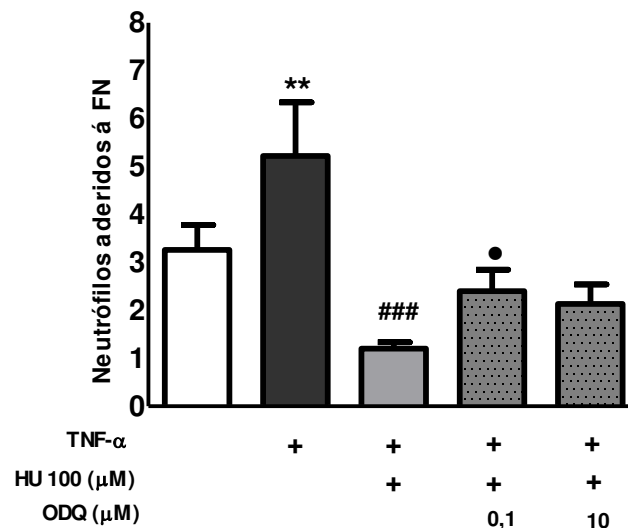


Figura 10. Adesão de neutrófilos pré-tratados simultaneamente com ODQ e HU e sob estímulo inflamatório de TNF- α . Neutrófilos (5×10^6 cls/mL) foram permitidos aderir à FN (20 μ g/mL) por 3 minutos (37°C), sob força de cisalhamento de 0,5 d/cm². Os neutrófilos foram pré-tratados com HU por 15 minutos e estimulados com TNF- α por 5 minutos, N=16. Resultados expressos em média \pm erro da média. ** p<0.01 comparado ao Basal, determinado por *test t* pareado ### p<0.001; comparado ao TNF- α e •p<0,05 comparado ao tratamento de HU com TNF- α ; determinado por ANOVA seguido de Bonferroni. Foi determinado o número de células aderidas num campo de visão de 0,08 mm².

5.10. Ensaio de adesão em fluxo: A HU diminui a adesão de plaquetas ativadas por trombina

A fim de investigar o efeito que a HU possui sobre a adesão de plaquetas ativadas, foi utilizado o ensaio de adesão em fluxo. As plaquetas (1×10^8 pts/mL) de indivíduos saudáveis foram pré-tratadas com HU nas concentrações de 10, 100 e $1000 \mu\text{M}$ durante 15 minutos e após isso foram ativadas com TB (50U) por 15 minutos. Em seguida as plaquetas foram submetidas ao ensaio de adesão em fluxo, utilizando fibrinogênio ($50 \mu\text{g/mL}$) como ligante e sob fluxo de $0,3 \text{ d/cm}^2$, por aproximadamente 2 minutos. A Figura 11 demonstra que o TB é capaz de ativar as plaquetas provocando aumento na adesão quando comparada a níveis basais. A HU, por sua vez, nas concentrações de 10, 100 e $1000 \mu\text{M}$ reduziu significativamente a adesão das plaquetas quando comparado à adesão das plaquetas ativadas somente por TB.

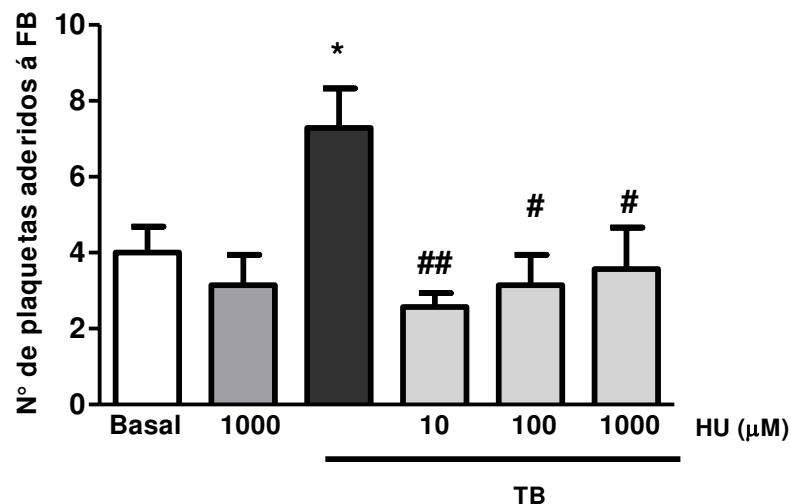


Figura 11. Efeito da HU na adesão de plaquetas. Plaquetas (1×10^8 cts/mL) foram pré-tratadas com HU por 15 minutos e ativadas por TB por 15 minutos (37°C), em seguida foram submetidas ao ensaio microfluídico utilizando FB ($50 \mu\text{g/mL}$) como ligante (2 minutos, 37°C , $0,3 \text{ d/cm}^2$), $N=8$. Resultados expressos em média \pm erro da média. * $p < 0,05$ comparado ao basal, ## $p < 0,01$, # $p < 0,05$ comparado ao TB determinado por ANOVA seguido de Bonferroni. Foi determinado o número de células aderidas em um campo de visão de $0,064 \text{ mm}^2$.

5.11. Ensaio de adesão em fluxo: A HU diminui a adesão de plaquetas ativadas por ADP

Para avaliar o efeito da HU sobre a adesão de plaquetas ativadas por ADP, foi realizado o ensaio de adesão em fluxo, onde plaquetas (1×10^8 pqtts/mL) de indivíduos saudáveis foram pré-tratados com HU nas concentrações de 10, 100 e $1000 \mu\text{M}$ durante 15 minutos e depois de ativadas com ADP ($20 \mu\text{M}$) por 15 minutos. Em seguida foi realizado o ensaio de adesão utilizando o fibrinogênio ($50 \mu\text{g/mL}$) como ligante e sob fluxo de $0,3 \text{d/cm}^2$, por 2 minutos. Nos dados obtidos (Figura 12) é possível observar que o ADP ativa as plaquetas provocando um aumento na adesão quando comparada a níveis basais. A HU, por sua vez, nas concentrações de 10 e $1000 \mu\text{M}$ causou um efeito protetor nas plaquetas, reduzindo significativamente a adesão em fluxo quando comparado a plaquetas ativadas por ADP.

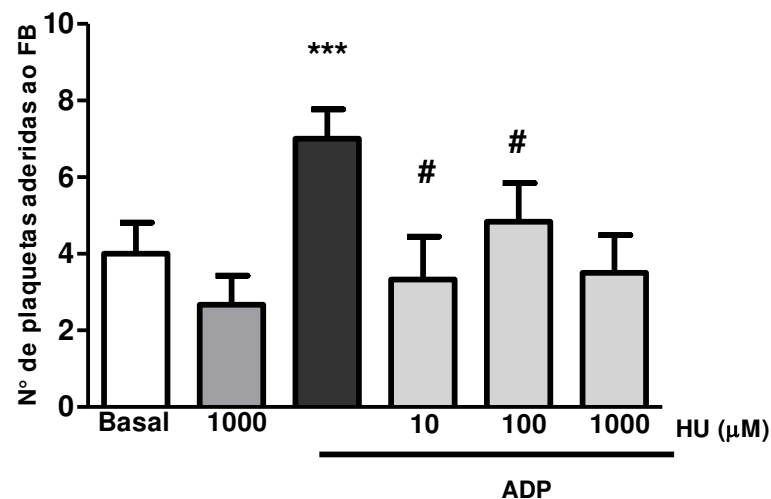


Figura 12. Efeito da HU na adesão de plaquetas. Plaquetas (1×10^8 cls/mL) foram pré-tratadas com HU por 15 minutos e ativadas por ADP por 15 minutos (37°C), em seguida foram submetidas ao ensaio microfluídico utilizando FB ($50 \mu\text{g/mL}$) como ligante (2 minutos, 37°C , $0,3 \text{d/cm}^2$), $N=6$. Resultados expressos em média \pm erro da média. *** $p < 0.001$ comparado ao Basal, determinado por *test t* pareado e # $P < 0.05$ comparado ao TNF- α determinado por ANOVA seguido de Bonferroni. Foi determinado o número de células aderidas num campo de visão de $0,064 \text{mm}^2$.

5.12. Ensaio microfluidico de adesão: O efeito de PTIO na adesão de plaquetas incubadas com HU e ativadas por ADP ou TB

Para analisar se os efeitos protetores de HU são intermediados pela liberação de NO, as plaquetas (1×10^8) foram pré-tratadas com HU ($10 \mu\text{M}$) e simultaneamente com PTIO (5 ou $50 \mu\text{M}$), e então foram incubadas a 37°C , 5% CO_2 por 15 minutos. Em seguida as plaquetas foram incubadas com ADP ($20 \mu\text{M}$) (Figura 13A) ou com TB (50U) (Figura 13B) durante 15 minutos, em seguida foram aplicadas a plataforma microfluidica utilizando fibrinogênio ($50 \mu\text{g}/\text{mL}$) como ligante e sob fluxo de $0,3 \text{d}/\text{cm}^2$, por aproximadamente 2 minutos. A ativação das plaquetas com ADP causou um aumento significativo na adesão quando comparado a níveis basais (Figura 13A). Por sua vez, a HU ($10 \mu\text{M}$) foi capaz de inibir essa adesão. Quando as plaquetas foram incubadas com HU ($10 \mu\text{M}$) na presença de PTIO (5 e $50 \mu\text{M}$), esse composto não alterou o efeito da HU em plaquetas ativadas.

As plaquetas ativadas por TB (50U) apresentaram uma maior adesão quando comparado a níveis basais, a HU ($10 \mu\text{M}$) por sua vez, reduziu parcialmente a adesão e o PTIO não interferiu de maneira significativa sob o efeito da HU nas plaquetas ativadas por TB (Figura 13B).

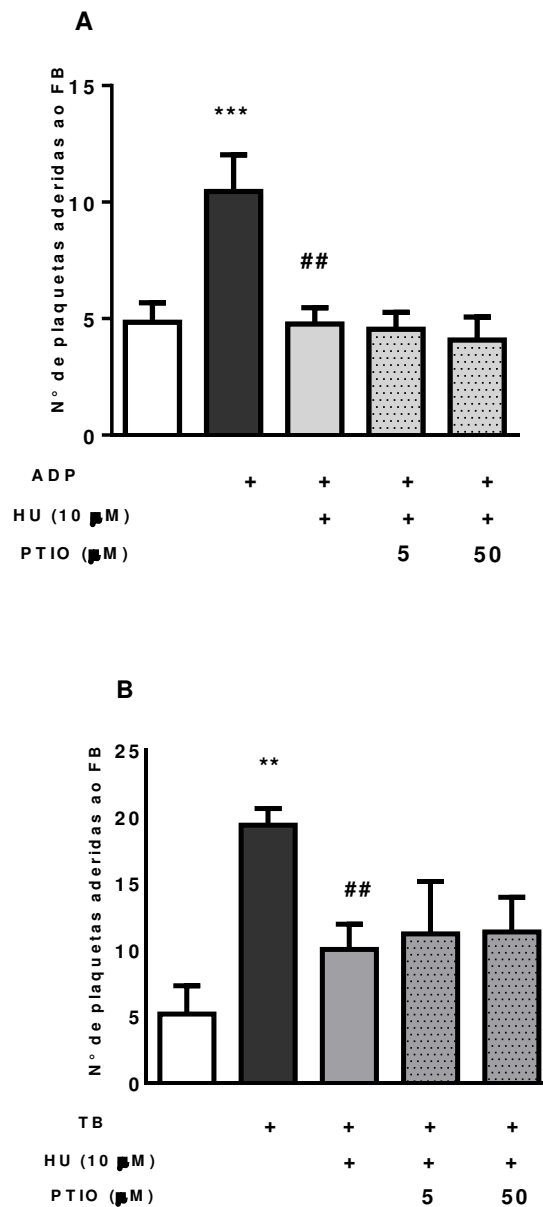


Figura 13. O efeito do PTIO na adesão de plaquetas incubadas com hidroxuréia e depois ativadas por ADP ou TB. Plaquetas (1×10^8 cels/mL) foram submetidas ao ensaio microfluídico utilizando FB ($20 \mu\text{g/mL}$) como ligante (2 minutos, 37°C , força de cisalhamento $0,3 \text{ d/cm}^2$). (A) As plaquetas foram pré-tratadas com HU e PTIO por 15 minutos e ativadas com ADP ($20 \mu\text{M}$) por 15 minutos, $N=6$. (B) As plaquetas foram pré-tratadas com HU e PTIO por 15 minutos e ativadas com TB (50 U) por 15 minutos, $N=6$. Resultados expressos em média \pm erro da média. *** $p < 0.001$ e ** $p < 0,01$ comparado ao Basal, ## $p < 0.01$ comparado ao TNF- α determinado por ANOVA seguido de Bonferroni. Foi determinado o número de células aderidas num campo de visão de $0,064 \text{ mm}^2$.

5.13. Ensaio microfluidico de adesão: O efeito da HU associada com ODQ na adesão de plaquetas ativadas por ADP ou TB

Para analisar se os efeitos protetores de HU são intermediados pela liberação de NO, as plaquetas (1×10^8) foram pré-tratadas com HU ($10 \mu\text{M}$) e simultaneamente com ODQ (0.1 ou $10 \mu\text{M}$), e então foram incubadas a 37°C , $5\% \text{CO}_2$ por 15 minutos. Em seguida as plaquetas foram incubadas com ADP ($20 \mu\text{M}$) (Figura 14A) ou com TB (50U) (Figura 14B) durante 15 minutos, em seguida foram aplicadas à plataforma microfluídica utilizando fibrinogênio ($50 \mu\text{g/mL}$) como ligante e sob fluxo de $0,3 \text{d/cm}^2$, por aproximadamente 2 minutos. Os dados obtidos (Figura 14) demonstram que o ADP ativa as plaquetas causando um aumento significativo da adesão quando comparado aos níveis basais, a HU ($10 \mu\text{M}$) foi capaz de inibir essa adesão, entretanto quando utilizamos o ODQ (0.1 e $10 \mu\text{M}$) simultaneamente com a HU ($10 \mu\text{M}$) observamos que o ODQ apresenta tendência em reverter parcialmente o efeito da HU (Figura 14A). As plaquetas ativadas por TB (50U) apresentaram uma maior adesão quando comparado aos níveis basais, a HU ($10 \mu\text{M}$) reduziu parcialmente essa adesão e o ODQ não interferiu sob o efeito da HU nas plaquetas ativadas por TB (Figura 14B), no entanto esse dado não foi estatisticamente significativo.

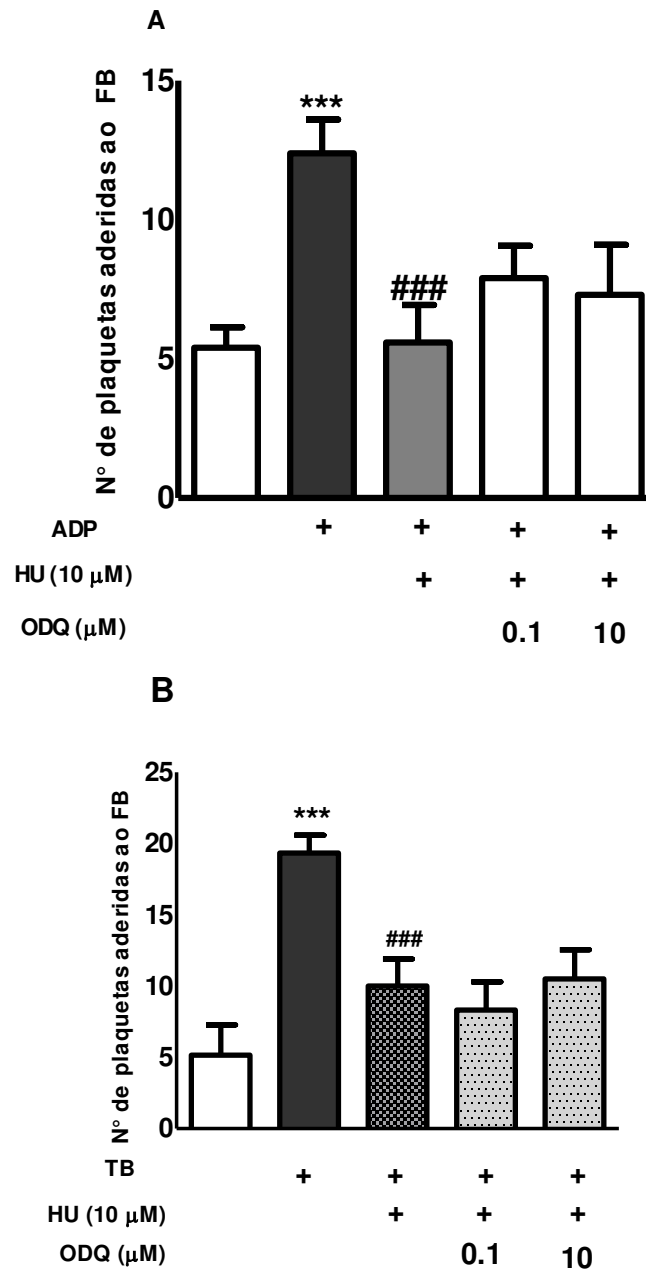


Figura 14. O efeito do ODQ na adesão de plaquetas incubadas com hidroxiuréia e depois ativadas por ADP ou TB. Plaquetas (1×10^8 cels/mL) foram submetidas ao ensaio microfluídico utilizando FB (20μg/mL) como ligante (2 minutos, 37°C, sob força de cisalhamento de 0,3 d/cm²). (A) As plaquetas foram pré-tratadas com HU e ODQ por 15 minutos e ativadas com ADP (20μM) por 15 minutos N.10. (B) As plaquetas foram pré-tratadas com HU e ODQ por 15 minutos e ativadas com TB (50 U) por 15 minutos N=6. Resultados expressos em média \pm erro da média. *** $p < 0.001$ comparado ao Basal, determinado por *test t* pareado e ## $P < 0.01$ comparado ao TNF- α determinado por ANOVA seguido de Bonferroni. Foi determinado o número de células aderidas num campo de visão de 0,064 mm².

5.14. Citometria de fluxo: O efeito da HU sobre a expressão da P-selectina, integrina $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ na sua conformação de alta afinidade e da glicoproteína GPIb/IX/V em plaquetas ativadas por ADP

Plaquetas (1×10^8) foram pré-tratadas com HU nas concentrações de 10, 100, 500 e 1000 μM e incubadas como descrito acima, a fim de analisar se a HU exerce algum efeito sobre a expressão da molécula P-selectina, integrina $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ na sua conformação de alta afinidade e da glicoproteína GPIb/IX/V quando ativadas por ADP, para isso foi realizado a técnica citometria de fluxo utilizando os anticorpos anti-CD62P- FITC (clone AK6), PAC-1- FITC (reconhece a integrina $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ quando ativada) e anti-CD42b- APC (clone Psel.K02.3), receptor de superfície do vWF. Nos resultados obtidos (Tabela 4) foi possível observar que as plaquetas ativadas por ADP demonstraram aumento significativo da expressão da glicoproteína GPIb/IX/V (CD42b), quando comparada a níveis basais.

Tabela 4. Expressão da P-selectina (CD62P), integrina $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ na sua conformação de alta afinidade e da glicoproteína GPIb/IX/V (CD42b) em plaquetas ativadas por ADP

Molécula	CD62P	$\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ (conformação ativada)	CD42b
Tratamento	MIF\pmEMP	MIF\pmEMP	MIF\pmEMP
Basal	357 \pm 68	6 \pm 0.9	27 \pm 2
HU (1000 μM)	362 \pm 55	5 \pm 0.8	30 \pm 6
ADP	224 \pm 41	7 \pm 0.9	162 \pm 19 ***
ADP+ HU (10 μM)	327 \pm 59	6 \pm 0.5	160 \pm 22
ADP+HU (100 μM)	226 \pm 36	7 \pm 2	161 \pm 22
ADP+HU (500 μM)	313 \pm 64	7 \pm 2	158 \pm 21
ADP+HU (1000 μM)	338 \pm 44	8 \pm 2	157 \pm 20

Os dados estão representados como média de intensidade de fluorescência (MIF) de anticorpo ligado para cada plaqueta \pm erro médio padrão (EMP). Foram adquiridos 10.000 eventos. $P < 0.0001$.

5.15. Citometria de fluxo: O efeito da HU na expressão das moléculas de adesão P-selectina, integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ na sua conformação de alta afinidade e da glicoproteína GPIb/IX/V em em plaquetas ativadas por TB

Para analisar se a HU exerce algum efeito sobre a expressão da molécula P-selectina, integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ na sua conformação de alta afinidade (e da glicoproteína GPIb/IX/V, receptor de superfície do vWF, foi realizado a técnica citometria de fluxo utilizando os anticorpos anti-CD62P– FITC (clone AK6), PAC-1–FITC (reconhece a integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ quando ativada) e anti-CD42b-APC (clone Psel K02.3). Para isso plaquetas (1×10^8) foram pré tratadas com HU nas concentrações de 10, 100, 500 e $1000 \mu\text{M}$ (37°C por 15 minutos) e incubadas com TB (50U) por mais 15 minutos nas mesmas condições. Nos resultados obtidos (Tabela 5) foi possível observar que as plaquetas ativadas por TB demonstraram aumento significativo da expressão da integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ na sua conformação de alta afinidade e da glicoproteína GPIb/IX/V (CD42b), quando comparada a níveis basais. A HU, nas concentrações de 10, 100 $500 \mu\text{M}$, preveniu parcialmente o aumento da expressão da integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ na sua conformação de alta afinidade.

Tabela 5. Expressão da P-selectina (CD62P), integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ na sua conformação de alta afinidade e da glicoproteína GPIb/IX/V (CD42b) em plaquetas ativadas por TB

Molécula	CD62P	$\alpha_{IIb}\beta_3$ (conformação ativada)	CD42b
Tratamento	MIF\pmEMP	MIF\pmEMP	MIF\pmEMP
Basal	323 \pm 82	6.3 \pm 1,1	43 \pm 17
HU (1000 μM)	321 \pm 74	6.9 \pm 1.9	40.5 \pm 17
TB	244 \pm 74	125 \pm 19 ***	253 \pm 61 ***
TB+ HU10 μM	218 \pm 76	85.5 \pm 13,12 #	284 \pm 51
TB+ (HU100 μM)	252 \pm 111	79 \pm 9.3 ##	290 \pm 53
TB + (HU500 μM)	252 \pm 81	77 \pm 19.3 ##	208 \pm 63
TB + HU (1000 μM)	180 \pm 25	107 \pm 13.5	242 \pm 36

Os dados estão representados como média de intensidade de fluorescência (MIF) de anticorpo ligado para cada plaqueta \pm erro médio padrão (EMP). Foram adquiridos 10.000 eventos.

6. DISCUSSÃO

A inflamação é um conjunto complexo de interações de fatores solúveis e celulares que ocorrem nos tecidos em resposta a processos traumáticos, infecciosos, lesivos ou autoimunes, levando a uma reação de defesa do organismo ¹¹⁶. A resposta inflamatória é caracterizada pelo recrutamento extracelular de células inflamatórias, alterações vasculares, aumento da permeabilidade vascular, e fenômenos celulares como a infiltração celular, que decorrem da liberação local de mediadores químicos formados e liberados no local da lesão tecidual, como por exemplo, citocinas, prostaglandinas e histamina entre outros ¹¹⁷. Os neutrófilos são os leucócitos mais abundantes do sistema imune e possuem um papel crucial como primeira linha de defesa em processos infecciosos e inflamatórios ⁵³, quando são ativados por produtos bacterianos, citocinas ou quimiocinas, como por exemplo: TNF- α , GM-CSF, IL-1, IL-6, IL-8 e IFN- γ , esses fatores ativam células endoteliais ocasionando o aumento da expressão de selectinas, como PSGL-1 e L-Selectinas, responsáveis pelo primeiro contato entre células do endotélio e os neutrófilos ^{50, 51, 55}.

O TNF- α possui efeitos pró-inflamatórios, aumentando as propriedades quimiotáticas dos leucócitos e aumentando a adesão de neutrófilos ao endotélio, devido à indução da expressão e função das moléculas de adesão ⁴⁴. Nos ensaios de adesão estática e em todas as condições testadas e com diferentes ligantes, foi possível observar que o TNF- α possui a capacidade de aumentar as propriedades adesivas dos neutrófilos de forma significativa quando comparada aos não estimulados, como já observado por Miguel ¹¹⁸ *et al.*, 2011 e Canalli ²³ *et al.*, 2008, esse efeito também se repetiu nos ensaios de adesão em fluxo com a molécula de adesão fibronectina. A presença de TNF- α , faz com que os neutrófilos sejam atraídos por células endoteliais próximas da área inflamada, dando início ao processo de rolamento na membrana das células endoteliais ativadas, provocando alterações conformacionais nas integrinas da superfície dos neutrófilos para estados de elevada afinidade ^{50, 55, 57}. A ativação das integrinas- β 2 LFA-1 (CD11a/CD18) e Mac-1 (CD11b/CD18) permite a adesão firme de neutrófilos a células do endotélio através da ligação das integrinas ICAM-1 e ICAM-2 na superfície do endotélio ^{50, 52, 53, 58}. As integrinas se apresentam nas conformações “não ativadas” e “ativadas”, e é possível observar se a integrina se encontra na sua conformação ativada pelo uso de anticorpos que reconhecem as integrinas na sua conformação ativada, através de citometria de fluxo. A expressão das subunidades das moléculas de adesão L-Selectina (CD62P), LFA-1 e Mac-1 (CD11a e CD11b, respectivamente) na superfície dos neutrófilos, antes e depois do tratamento com TNF- α , foram avaliadas, demonstrando que o estímulo inflamatório causado por TNF- α

ocasionou um aumento na expressão de MAC-1 e LFA-1 na sua superfície, porém não foi capaz de alterar a expressão de L-Selectina. Adicionalmente, foi constatado que o TNF- α aumenta a atividade da subunidade CD11b na superfície dos neutrófilos, indicando uma alteração da integrina Mac-1 para a sua conformação de alta afinidade. Durante a resposta inflamatória, a interação dos neutrófilos com plaquetas e a formação de agregados heterocelulares parece ser essencial para o início do processo inflamatório^{77, 81}. Em doenças caracterizadas por inflamação vascular crônica, como anemia falciforme e aterosclerose, a adesão dos leucócitos a parede vascular desencadeiam efeitos significativos como o início de processos vaso-oclusivos que tem papel importante em ambos as doenças^{27, 35}.

Doenças inflamatórias crônicas acometem milhões de pessoas pelo mundo, por esse motivo é importante estudar e identificar drogas que possuem efeitos anti-inflamatórios. Na AF, a HU tem vários efeitos, sendo um dos mais importantes à elevação da hemoglobina fetal a qual possui a capacidade de inibir a polimerização da hemoglobina S, e, portanto, diminuindo a falcização das hemácias em pacientes. No entanto, alguns estudos demonstraram que a HU também pode beneficiar os pacientes portadores de anemia falciforme através de efeitos anti-inflamatórios. A terapia com HU está associada à diminuição da expressão de moléculas de adesão na superfície das hemácias¹⁰⁴, plaquetas²⁰, e leucócitos²⁶ de pacientes com anemia falciforme, além de reduzir a contagem de neutrófilos e eosinófilos^{38, 119} nesses indivíduos. No entanto, não está claro se a HU exerce estes efeitos por uma via direta ou indireta, sendo que na doença falciforme, acredita-se que estes efeitos são secundários ao efeito da droga no ciclo celular das células hematopoiéticas.

Quando analisamos os efeitos da HU nas propriedades adesivas dos neutrófilos em condições estáticas e em fluxo (sob estímulo inflamatório de TNF- α), encontramos evidências que a HU possui um efeito direto e anti-inflamatório nos neutrófilos. Na concentração de 1000 μ M, a HU inibiu a adesão dos neutrófilos sob condições estáticas; em condições de fluxo que se aproximam mais às ações fisiológicas a HU teve um efeito anti-adesivo em concentrações mais baixas (100 μ M). A HU chega a ter concentrações séricas máximas de 290-380 μ M (descrito em crianças portadoras de AF recebendo dose de 20 μ g/kg HU; Ware¹²⁰ *et al.*, 2011). Assim a dose de 1000 μ M utilizado nos ensaios é uma concentração elevada de HU, sem tanta relevância clínica. Em contraste as concentrações de 100-500 μ M HU foram capazes de diminuir a adesão de neutrófilos sob condições de fluxo, sendo mais fisiologicamente relevante e com implicações interessantes na AF.

Estudos publicados anteriormente demonstram que a HU possui a propriedade de doar NO *in vivo*¹⁰⁷, induzindo a atividade da enzima óxido nítrico síntase (NOS) e a

produção de NO pelas células endoteliais ¹⁰⁷. Para entender se a HU pode intermediar os efeitos observados pela sua capacidade de doar NO, foi utilizado o ODQ, uma droga que inibe a enzima GCs (enzima intracelular alvo de NO, interferindo na via de GMPc) e também o PTIO, o qual tem a função de sequestrar o NO. As concentrações testadas foram determinadas através de dados da literatura, o uso de 1000 e 500 μM de HU com PTIO ou ODQ foi para que ambas estivessem nas mesmas condições. Nos resultados obtidos em adesão estática podemos observar que ODQ, junto com HU (500 e 1000 μM) apresenta uma tendência porém não significativa, em reverter o efeito da HU, entretanto na adesão em fluxo a presença de ODQ (0.1 e 10 μM) reverte o efeito da HU (10 μM) na adesão de neutrófilos, implicando em um papel para a enzima GCs neste efeito. Quando utilizado HU (10 μM) e PTIO (5 e 50 μM) juntos em adesão em fluxo não observamos diferenças significativas sob o efeito da HU, entretanto em adesão estática com HU (500 μM e 1000 μM), e PTIO (50, 250 e 1000 μM) observamos que o sequestro de NO por este composto reverte parcialmente os efeitos da HU, sugerindo que os efeitos benéficos da HU nesta situação são mediados pela liberação de NO durante a incubação com as células.

A análise das proteínas na superfície dos neutrófilos foi realizada através de citometria de fluxo, investigando as subunidades alfa das integrinas LFA-1 (CD11a) e Mac-1 (CD11b), que estão envolvidas principalmente no processo de adesão firme do leucócito ao endotélio ¹²¹, os dados obtidos demonstraram um aumento significativo na expressão após o estímulo com TNF- α . Entretanto, a expressão da L-selectina, molécula envolvida no rolamento inicial do processo de adesão leucocitária ¹²², apresentou-se reduzida na presença de TNF- α . Já é bem descrito que a L-selectina é liberada da superfície dos neutrófilos para a circulação após a sua ativação, indicando assim que provavelmente o TNF- α ative as células resultando num aumento na expressão de integrinas na membrana e na liberação da L-selectina ¹²³. A incubação dos neutrófilos com HU não demonstrou diferenças significativas na expressão de L-selectina, MAC-1 e LFA-1 e não alterou a expressão das integrinas na sua conformação ativada.

As plaquetas possuem diversos receptores de adesão, entre eles o complexo glicoprotéico (glicoproteína [Gp]) Ib/IX-V e GpVI, que se ligam respectivamente ao FvW e ao colágeno, uma proteína importante da matriz extracelular ¹²⁴. Essas moléculas são consideradas responsáveis pela regulação primária da adesão plaquetária que pode ser induzida pelo colágeno ou por outros agonistas, como trombina, PAF e ADP, ocorre a secreção dos grânulos e a exposição da glicoproteína IIb/IIIa (GpIIb/IIIa) ^{63, 125}. A fim de analisar as propriedades adesivas das plaquetas durante o processo de ativação, utilizamos ensaios de adesão em fluxo, pois o mesmo simula o processo fisiológico que ocorre nos vasos sanguíneos. Nossos dados demonstraram que plaquetas incubadas com ADP e TB

aumentam as propriedades adesivas de plaquetas de uma maneira significativa. De forma surpreendente, a HU (10 e 1000 μM) foi capaz de reduzir a adesão provocada por ADP o que também ocorreu quando as plaquetas foram ativadas por trombina (HU 10,100 e 1000 μM). Para avaliarmos o mecanismo do efeito da HU em plaquetas em ensaios de adesão em fluxo, utilizamos PTIO (5 e 50 μM) para sequestrar NO após liberação da HU (10 μM). No entanto, esse composto não foi capaz de reverter o efeito da HU. De forma similar, quando analisado o efeito de HU (10 μM) junto com ODQ (0.1 e 10 μM), este não reverteu significativamente o efeito da HU em ambas as condições testadas.

A molécula de adesão, P-selectina está presente nos α -grânulos de plaquetas e é expressa na superfície de plaquetas quando ativadas ¹²⁶. A P-selectina se liga ao PSGL-1 expresso por leucócitos, podendo resultar em interações heterocelulares ¹²⁷. No entanto, em nossos resultados, obtidos por citometria de fluxo, não observamos aumento significativo da expressão de P-selectina quando as plaquetas foram ativadas por ADP e TB. Os contrareceptores para P-selectina incluem GPIb α , que suportam a adesão e o rolamento sob o endotélio inflamado. O mecanismo que intermedia a adesão plaquetária estável ao endotélio ativado ainda possui algumas incertezas, modelos *in vivo* e *in vitro* sugerem que a ligação do $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ ao fibrinogênio ligado ao $\alpha_v\beta_3$ ou ICAM-1 facilita a firme adesão e ativação plaquetária ^{128,129}. As plaquetas, na anemia falciforme, possuem uma capacidade aumentada de aderirem aos componentes da parede vascular e o contato físico entre essas células, *in vitro*, promove a expressão de moléculas de adesão e a produção de citocinas inflamatórias nas células endoteliais ^{20, 109}. Através de Citometria de fluxo, observamos que plaquetas ativadas por ADP apresentam aumento significativo da expressão de GPIb α , porém a expressão de P-selectina e $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ não apresentaram diferenças significativas. Quando as plaquetas foram incubadas com HU e depois ativadas com ADP não houve diferenças na expressão de P-selectina, GPIb α /IX/V e $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$. Em contraste, quando as plaquetas foram ativadas por TB, as expressões da GPIb (CD42) e da integrina $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ estavam significativamente aumentadas, quando comparadas a níveis basais, porém a expressão de P-selectina não apresentou diferenças. Plaquetas incubadas com HU (10-1000 μM) e ativadas com TB demonstraram uma redução significativa na expressão da integrina $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$, o que não foi visto na expressão de P-selectina e GPIb. Pacientes com AF apresentam aumento da expressão da integrina $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ ¹³⁰; Proença²⁰ e colaboradores (2010) demonstraram que a expressão dessa integrina está reduzida em pacientes em uso de HU e que a expressão da molécula de adesão de P-selectina (CD62P) também está aumentada na superfície das plaquetas desses pacientes.

A ativação plaquetária é considerada um processo fisiológico fundamental para a manutenção da homeostase ¹³¹. As plaquetas desempenham um importante papel na patogênese dos eventos vasculares agudos, como no infarto do miocárdio e no acidente vascular cerebral (AVC) ⁶⁸. Quando ocorre uma desestabilização no fluxo sanguíneo, as moléculas de adesão plaquetária (integrinas e selectinas) são ativadas, promovendo a adesão às células endoteliais ⁶⁸. As plaquetas de indivíduos com AF apresentam propriedades inflamatórias, liberando altos níveis de fatores inflamatórios potentes, incluindo as citocinas LIGHT e CD40L ¹⁹. Proença e colaboradores (2010) ²⁰ demonstraram *in vitro* que as plaquetas de pacientes com AF apresentam maior capacidade de adesão aos componentes da matriz extracelular e à parede vascular, sugerindo que estas células podem contribuir com os processos vaso-oclusivos devido à produção e liberação de fatores inflamatórios no local. Dados obtidos nesse trabalho demonstraram que o uso da HU (10 µM) é capaz de reduzir as propriedades adesivas das plaquetas ativadas por trombina ou ADP em ensaios de adesão em fluxo e também reduz a expressão da integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ o que sugere que o uso da HU como terapia para doenças inflamatórias crônicas deve ser melhor estudado, uma vez que a redução da plaquetas ativadas acarretaria benefícios para a fisiopatologia dessa doenças podendo ser capaz de diminuir algumas complicações clínicas causadas pela ativação plaquetária.

Assim sendo, o nosso trabalho indica que HU tem efeitos diretos nas propriedades adesivas dos leucócitos e plaquetas, quando ativados, diminuindo as suas propriedades adesivas. Estes efeitos, aparentemente, nos leucócitos, são mediados, parcialmente pela propriedade desta droga a liberar a molécula anti-inflamatória, NO, quando em solução. Outros trabalhos também demonstraram que o NO pode ter um papel regulador na função da integrina Mac-1, e nas propriedades adesivas de neutrófilos ^{112, 131}, sendo assim, os efeitos dependentes da HU nas propriedades adesivas de neutrófilos e plaquetas precisam ser melhor investigados com vista para o seu uso nas doenças inflamatórias crônicas, pois a mesma pode acarretar benefícios fisiopatológicos para indivíduos portadores dessas patologias.

7. CONCLUSÕES

- O tratamento com HU *in vitro* (em concentrações equivalentes aos observados em pacientes em tratamento com HU) diminui o efeito do TNF- α nas propriedades adesivas de neutrófilos sob condições de fluxo; este efeito aparentemente está parcialmente atribuído por uma via dependente em GMPc intracelular;
- A HU não exerce os seus efeitos nos neutrófilos por alteração na expressão ou função das integrinas Mac-1 ou LFA-1.
- O tratamento com HU *in vitro* (em concentrações equivalentes aos observados em pacientes em tratamento com HU) diminui o efeito da trombina e de ADP nas propriedades adesivas de plaquetas; este efeito aparentemente não depende da liberação de NO pela HU.
- Na presença de ADP, a HU exerce os seus efeitos nas plaquetas, pelo menos em parte, por inibir a expressão da integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ na sua conformação ativada.
- O uso de HU como uma abordagem anti-inflamatória deve ser estudado em pacientes com doenças inflamatórias.

8. REFERÊNCIAS

1. Medzhitov, R. Inflammation. New adventures of an old flame. *Cell*. 2010; 140 (6): 771-776.
2. Rondina MT, Weyrich AS, Zimmerman GA. Platelets as cellular effectors of inflammation in vascular diseases. *Circ Res*. 2013; 112: 1506-1519.
3. Lorenowicz MJ, Fernandez-Borja M, Hordijk PL. cAMP signaling in leukocyte transendothelial migration. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*. 2007; 27:1014-22.
4. Khansari N, Shakiba Y, Mahmoudi M. Chronic inflammation and oxidative stress as a major cause of age-related diseases and cancer. *Recent Patents on inflammation & allergy drug discovery*. 2009; 3(1): 73-80.
5. Nathan C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol*. 2006; 6(3):173–82.
6. Alcaide P, Auerbach S, Luscinskas FW. Neutrophil recruitment under shear flow: it's all about endothelial cell rings and gaps. *Microcirculation*. 2009; 16(1): 43–57.
7. Nathan C, Ding A. Nonresolving inflammation. *Cell*. 2010; 140 (6): 871–82.
8. Kummar V, Abbas AK, Fausto N. Bases patológicas das doenças. 7ª edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.
9. Serhan CN, Brain SD, Buckley CD, Gilroy DW, Haslett C, O'Neill LA, *et al*. Resolution of inflammation: state of the art, definitions and terms. *FASEB J*. 2007; 21(2):325–32.
10. Heppner FL, Ransohoff RM, Becher B. Immune attack: the role of inflammation in Alzheimer disease. *Nat Rev Neurosci*. 2015; 16(6): 358–72.
11. Viola J, Soehnlein O. Atherosclerosis – a matter of unresolved inflammation. *Semin Immunol*. 2015; 27(3):184–93.
12. Helgadóttir A, Manolescu A, Thorleifsson G, Gretarsdóttir S, Jonsdóttir H, Thorsteinsdóttir U, *et al*. The gene encoding 5-lipoxygenase activating protein confers risk of myocardial infarction and stroke. *Nat Genet*. 2004; 36(3): 233–9.
13. Erlinger TP, Platz EA, Rifai N, Helzlsouer K.J. C-reactive protein and the risk of incident colorectal cancer. *JAMA*. 2004; 291(5):585–90.
14. Bostan M, Constantin MC, Nicolau A, Hirt M, Galatiuc C, Matei I *et al*. Study of chemotactic activity developed by neutrophils from rheumatoid arthritis patients. *Roumanian archives of Microbiology and Immunology*. 2002; 61(4): 243-58.
15. Cross A, Bucknall RC, Cassatella MA, Edwards SW, Moots RJ. Synovial fluid neutrophils transcribe and express class II major histocompatibility complex molecules in rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism*. 2003; 48(10): 2797-806.

16. Cascão R, Rosário HS, Souto-Carneiro MM, Fonseca JE. Neutrophils in rheumatoid arthritis: More than simple final effectors. *Autoimmunity Reviews*. 2010; 9(8): 531-5.
17. Sweeney SE, Firestein GS. Rheumatoid arthritis: regulation of synovial inflammation. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2004; 36: 372-8.
18. Agarwal SK, Brenner MB. Role of adhesion molecules in synovial inflammation. *Curr Opin Rheumatol*. 2006; 18(3): 268-76.
19. Garrido VT, Proença-Ferreira R.; Dominical VM, Traina F.; Bezerra MAC, Mello MRB, *et. al.* Elevated plasma levels and platelet-associated expression of the pro-thrombotic and pro-inflammatory protein, TNFSF14 (LIGHT), in sickle cell disease. *British Journal of Haematology*. 2012; 158: 788-797.
20. Proença-Ferreira R, Franco-Penteado CF, Traina F, Saad STO, Costa FF, Conran N. "Increased adhesive properties of platelets in sickle cell disease: roles for $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ mediated ligand binding, diminished cAMP signalling and increased membrane phosphodiesterase 3A activity". *British Journal of Haematology*. 2010; 149: 280-288
21. Hebbel RP, Osarogiagbon R, Kaul D. The endothelial biology of sickle cell disease: inflammation and a chronic vasculopathy. *Microcirculation*. 2004; 11(2):129-5.
22. Assis A, Conran N, Canalli AA, Lorand-Metze I, Saad STO, Costa FF. Effect of cytokines and chemokines on sickle neutrophil adhesion to fibronectin. *Acta Haematologica*. 2005; 113(2): 130-6.
23. Canalli AA, Franco-Penteado CF, Saad ST, Conran N, Costa FF. Increased adhesive properties of neutrophils in sickle cell disease may be reversed by pharmacological nitric oxide donation. *Haematologica*. 2008; 93: 605-9.
24. Conran N, Costa FF. Hemoglobin disorders and endothelial cell interactions. *Clinical Biochemistry*. 2009; 42(18): 1824-38.
25. Miller ST, Sleeper LA, Pegelow CH, Enos LE, Wang WC, Weiner SJ, *et. al.* Prediction of adverse outcomes in children with sickle cell disease. *N Eng J Med*. 2000; 342(2): 83-9.
26. Okapla L, Ugochukwu CC, Tawil A, Greaves R. Steady-state plasma lactoferrin levels in relation to infections and complications of sickle cell disease. *Hematol J*. 2004; 5(4): 371-2.
27. Chiang EY, Frenette PS. Sickle cell vaso-occlusion. *Hematol- Oncol Clin North Am*. 2005;19: 771-84.
28. Frenette PS. Sickle cell vaso-occlusion: multistep and multicellular paradigm. *Curr Opin Hematol*. 2002; 9:101-106.
29. Turhan A, Jenab P, Bruhns P, Ravetch JV, Collier BS, Frenette PS. Intravenous immune globulin prevents venular vaso-occlusion in sickle cell mice by inhibiting

- leukocyte adhesion and the interactions between sickle erythrocytes and adherent leukocytes. *Blood*. 2004; 103:2397-400.
30. Francis RBJr, Hebbel RP. Hemostasis. In: *Sickle Cell Disease: Basic Principles and Clinical Practice* (SH Embury, RP Hebbel, MH Steinberg, and N Mohandas, Eds.) New York: Raven. 1994; 299–310.
 31. Duits AJ, Pieters RC, Saleh AW, van Rosmalen E, Katerberg H, Berend K, *et al.* Enhanced levels of soluble VCAM-1 in sickle cell patients and their specific increment during vasoocclusive crisis. *Clin Immunol Immunopathol*. 1996; 81:96–8.
 32. Hagar W, Vichinsk E. Advances in clinical research in sickle cell disease. *British Journal of Haematology*. 2008; 141:346–56.
 33. Lanaro C, Franco-Penteado CF, Albuquerque DM, Saad ST, Conran N, Costa FF. Altered levels of cytokines and inflammatory mediators in plasma and leukocytes of sickle cell anemia patients and effects of hydroxyurea therapy. *J Leukoc Biol*. 2009; 85: 235-42.
 34. Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation*. 2002; 105(9): 1135-1143.
 35. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012; 32(9):2045-51.
 36. Ross R. Atherosclerosis—an inflammatory disease. *N Engl J Med*. 1999; 340(2):115-26.
 37. Horne BD, Anderson JL, John JM, Weaver A, Bair TL, Jensen KR, *et al.* Which white blood cells subtypes predict increased cardiovascular risk? *J Am Coll Cardiol*. 2005; 45: 1638-43.
 38. Canalli AA, Conran N, Fattori A, Saad ST, Costa FF. Increased adhesive properties of eosinophils in sickle cell disease. *Exp Hematol*. 2004; 32 (8): 728-34.
 39. Mayadas TN, Cullere X, Lowell CA. The Multifaceted Functions of Neutrophils. *Annu. Rev. Pathol. Mech*. 2014; 9:181-218.
 40. Kuijpers T, Ross D. Neutrophils. *ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES*. Nature 2001.
 41. Conran R. S. *et al.* *Patologia estrutural e funcional*. 5ed, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p.45-83. 1996.
 42. Abbas AK, Janeway CA JR. Immunology: Improving on Nature in the Twenty-First Century. *Cell*. 2000; 100: 129-138.
 43. Clark IA. How TNF was recognized as a key mechanism of disease. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2007; 18: 335–343.

44. Lukacova V, Zhang Y, Kroll DM, Raha S, Comez D, Balaz SA. Comparison of the Binding Sites of Matrix Metalloproteinases and Tumor Necrosis Factor- α Converting Enzyme: Implications for Selectivity. *J. Med. Chem.* 2005; 48: 2361-2370.
45. Nacher M, Hidalgo A. Fire within the vessels: interactions between blood cells and inflammatory vascular injury. *Frontiers in bioscience.* 2011; 3:1089-100.
46. Wright HL, Robert J, Roger CB, Steven WE. Neutrophil function in inflammation and inflammatory diseases. *Rheumatology.* 2010, 49 (9): 1618-1631.
47. Okin D, Medzhitov R. Evaluation of Inflammatory Diseases. *Current Biology.* 2012; 22 (17): 733-740.
48. Issekutz AC, Adhesion molecules mediating neutrophil migration to arthritis in vivo and across endothelium and connective tissue barriers in vitro. *Inflammation research* 1998; 47(3): 123-32.
49. Hidalgo A, Peired AJ, Wild MK, Vestweber D, Frenette PS. Complete identification of E-selectin ligands on neutrophils reveals distinct functions of PSGL-1, ESL-1, and CD44. *Immunity.* 2007; 26: 477-89.
50. Phillipson M, Kubes P. The neutrophil in vascular inflammation. *Nature medicine.* 2011; 7;17(11):1381-90.
51. Sanz MJ, Kubes P. Neutrophil-active chemokines in in vivo imaging of neutrophil trafficking. *Eur J Immunol.* 2012; 42(2):278-83.
52. Borregaard, N. Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity.* 2010; 33(5):657–670.
53. Kobayashi SD, DeLeo FR. Role of neutrophils in innate immunity: a systems biology-level approach. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med.* 2009; 1: 309-333.
54. Sadik CD, Kim ND, Luster AD. Neutrophils cascading their way to inflammation. *Trends Immunol.* 2011; 32: 452-460.
55. Kolaczowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nature Reviews.* 2013; 13:159-175.
56. Oommen A, Patel R, Browning ME, Grigg J. Systemic neutrophil activation in acute preschool viral wheeze. *Arch Dis Child.* 2003; 88: 529-531.
57. McDonald B, Pittman K, Menezes GB, Hirota SA, Slaba I, Waterhouse CC, *et. al.* Intravascular danger signals guide neutrophils to sites of sterile inflammation. *Science.* 2010; 330, 362–366.
58. Lyck R, Enzmann G. The physiological roles of ICAM-1 and ICAM-2 in neutrophil migration into tissues. *Curr Opin Hematol.* 2015; 22(1):53-9.
59. Tarrant TK, Patel DD. Chemokines and leukocyte trafficking in rheumatoid arthritis. *Pathophysiology.* 2006; 13: 1-14.

60. Lorenowicz MJ, Fernandez-Borja M, Hordijk PL. cAMP signaling in leukocyte transendothelial migration. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*. 2007; 27:1014-22.
61. Scheiermann AC, Kunisaki Y, Jang JE, Frenette PS. Neutrophil microdomains: linking heterocellular interactions with vascular injury. *Current opinion in hematology*. 2010; 17:25-30.
62. Abbas AK, Andrew HH, Lichtman MD, Shiv P. *Cellular and Molecular Immunology*. 6 ed. Philadelphia: Elsevier, 2007, 572.
63. Andrews RK, Berndt MC. Platelet physiology and thrombosis. *Thromb Res*. 2004; 114: 447–453.
64. Guyton AC, Hall JE. *Tratado de Fisiologia Médica*; tradução Patrícia Lydie Voeux. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.
65. Kuter DJ. Milestones in understanding platelets production: a historical overview. *Brit J Hematol*. 2014; 165:248-258.
66. Varga-Szabo D, Pleines I, Nieswandt B. Arterioscle. Cell adhesion mechanism in platelets. *Thromb. Vasc. Biol*. 2008; 28: 403-412.
67. Kaplan KS, Jackson SP. The role of platelets in Antherothrombosis. *Hematology*. 2011; 51-61.
68. Levi, M. "Platelets". *Crit Care Méd*. 2005; 33(12): S523-25.
69. Gardiner EE, Andrews RK. Platelets receptor expression and shedding: Glycoprotein Ib-IX and VI. *Transf Med Rev*. 2014; (28): 56-60.
70. Furie BC. Thrombus formation in vivo. *J Clin Invest*. 2005; 115: 3355–3362.
71. Berndt MC, Metharom P, Andrews RK. Primary haemostasis: newer insights. *Haemophilia*. 2014; 20: 15–22.
72. Jackson SP, Nesbitt WS, Westein E. Dynamics of platelet thrombus formation. *J Thromb Haemost*. 2009; 7: 17–20- 15.
73. McFadyen JD, Jackson SP. Differentiating haemostasis from thrombosis for therapeutic benefit. *Thromb Haemostas*. 2013; 110: 859–867.
74. Boulaftali Y, Hess PR, Kahn ML, Bergmeier W. Platelet immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM) signaling and vascular integrity. *Circ Res*. 2014; 28; 114(7): 1174–1184.
75. Nieswandt B, Watson SP. Platelet-collagen interaction: is GPVI the central receptor? *Blood*. 2003; 102: 449–461.
76. Ruggeri ZM. Platelet adhesion under flow. *Microcirculation*. 2009; 16(1):58-83.

77. Storey RF, Sanderson MH, May JA, Cameron KE, Heptinstall S. The central role of the P (2T) receptor in amplification of human platelet activation, aggregation, secretion and procoagulant activity. *Br J Haematol.* 2000; 110: 925–934.
78. Klinger MH, Jelkmann W. Role of blood platelets in infection and inflammation. *J Interferon Cytokine Res.* 2002; 22(9):913-22.
79. Gawaz M, Neumann FJ, Dickfeld T, Koch W, Lauqwitz KL, Adelsberger H, *et al.* Activated platelets induce monocyte chemotactic protein-1 secretion and surface expression of intercellular adhesion molecule-1 on endothelial cells. *Circulation.* 1998; 98:1164-1171.
80. Srivastava R, Srimal RC. Amplification of platelet response during acute inflammation in rats. *Biochem Pharmacol.* 1990; 40:357-363.
81. Sreeramkumar V, Adrover JM, Ballesteros I, Cuartero ML, Rossaint J, Bilbao L, Nacher M, *et al.* Neutrophils scan for activated platelets to initiate inflammation. *Science.* 2014; 5; 346 (6214): 1234-8.
82. Caudrillier A, Kessenbrock, Gilliss BM, Nguyn JX, Marques MB, Toy P, Werb z, Mark RL. Platelets induce neutrophil extracellular traps in transfusion-related acute lung injury. *J Clin Invest.* 2012; 122 (7): 2661-2671.
83. Moore KL, Patel KD, Bruehl RE, Li F, Johnson DA. P-selectin glycoprotein ligand-1 mediates rolling of human neutrophils on P-selectin. *J Cell Biol.* 1995; 128: 661–671.
84. Ignarro LJ. Elsevier Science; Burlington, MA: 2009. Nitric Oxide: Biology and Pathobiology.
85. Rassaf T, Kleinbongard P, Preik M, Dejam A, Gharini P, Lauer T, *et al.* Plasma nitrosothiols contribute to the systemic vasodilatador effects of intravenously applied NO: experimental and clinical study on the fate of NO in human blood. *Circ. Res.* 2002; 91, 470-477.
86. Ignarro LJ. Nitric oxide as a unique signaling molecule in the vascular system: a historical overview. *Physiol pharmacol.* 2002; 53(4): 503-514.
87. Puzzo D, Privitera L, Leznik E, Fà M, Staniszewski A, Palmeri A, Arancio O. Picomolar amyloid-beta positively modulates synaptic plasticity and memory in hippocampus. *J. Neurosci.* 2008; 28, 14537–14545.
88. Michel T, Feron O. Nitric oxide synthases: which, where, how, and why? *J Clin Invest.* 1997; 100: 2146-2152.
89. Murad F. Nitric oxide and cyclic GMP in cell signaling and drug development. *The New England journal of medicine.* 2006; 355:2003–11.
90. Bryan NS, Bian K, Murad F. Discovery of the nitric oxide signaling pathway and targets for drug development. *Frontiers in bioscience.* 2009; 14:1–18

91. Stasch JP, Pacher P, Evgenov OV. Soluble guanylate cyclase as an emerging therapeutic target in cardiopulmonary disease. *Circulation*. 2011; 123:2263–73.
92. Lugnier C, Keravis T, Eckly-Michel A. Cross talk between NO and cyclic nucleotide phosphodiesterases in the modulation of signal transduction in blood vessel. *J Physiol Pharmacol*. 1999; 50:639-652.
93. McGann PT, Ware RE. Hydroxyurea for sickle cell anemia: what have we learned and what questions still remain? *Curr Opin Hematol*. 2011; 18:158-165.
94. Rodriguez GI, Kuhn JG, Weiss GR, Hilsenbeck SG, Eckardt JR, Thurman A, *et al*. A bioavailability and pharmacokinetic study of oral and intravenous hydroxyurea. *Blood*. 1998; 91(5), 1533–1541.
95. Gwilt PR, Tracewell, WG. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of hydroxyurea. *Clin. Pharmacokinet*. 1998; 34(5), 347–358.
96. Spivak LJ, Hasselbalch H. Hydroxycarbamide: a user's guide for chronic myeloproliferative disorders. *Expert Ver. Anticancer ther*. 2011; 11(3):403-414.
97. Kovacic P. Hydroxyurea (therapeutics and mechanism): Metabolism, carbamoyl nitroso, nitroxyl, radicals, cell signaling and clinical applications. *Med Hypotheses*. 2010; 76(1):24-31.
98. Vokes EE, Stenson K, Rosen FR, Kies MS, Rademaker AW, Witt ME, *et al*. Weekly Carboplatin and Paclitaxel Followed by Concomitant Paclitaxel, Fluorouracil, and Hydroxyurea Chemoradiotherapy: Curative and Organ-Preserving Therapy for Advanced Head and Neck Cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2003; 21(2): 320-326.
99. Wong ASC, Soo RA, Lu JJ, Loh KS, Tan KS, Hsieh WS, *et al*. Paclitaxel, 5 fluorouracil and hydroxyurea concurrent with radiation in locally advanced nasopharyngeal carcinoma. *Annals of Oncology*. 2006; 17: 1152–1157.
100. Ulug P, Vasavda N, Kumar R, Keir L, Awogbade M, Cunningham J, *et al*. Hydroxyurea therapy lowers circulating DNA levels in sickle cell anemia. *American Journal of Hematology*. 2008; 83:714-716.
101. Odièvre MH, Brun M, Krishnamoorthy R, Lapoumériou C, Elion J. Sodium Phenyl Butyrate downregulates endothelin-1 expression in cultured human endothelial cells: Relevance to Sickle cell disease. *Am J Hematol*. 2007 82: 357-62.
102. Colella MP, De Paula EV, Conran N, Machado-Neto JA, Annicchino-Bizzacchi JM, Costa FF *et al*. Hydroxyurea is associated with reductions in hypercoagulability markers in sickle cell anemia. *J Thromb Haemost*. 2012; 10(9): 1967-70.
103. Covas DT, de Lucena Angulo I, Vianna Bonini Palma P, Zago MA. Effects of hydroxyurea on the membrane of erythrocytes and platelets in sickle cell anemia. *Haematologica*. 2004; 89(3):273-80.

104. Gambero S, Canalli AA, Traina F, Albuquerque DM, Saad ST, Costa FF et al. Therapy with hydroxyurea is associated with reduced adhesion molecule gene and protein expression in sickle red cells with a concomitant reduction in adhesive properties. *Eur J Haematol.* 2007; 78:144-51.
105. Lou TF, Singh M, Mackie A, Li W, Pace BS. Hydroxyurea generates nitric oxide in human erythroid cells: mechanisms for gamma-globin gene activation. *Exp Biol Med.* 2009; 234: 1374–82.
106. Zhu G, Yao Y, Pan L, Zhu W, Yan S. Reduction of Leukocyte Counts by Hydroxyurea Improves Cardiac Function in Rats with Acute Myocardial Infarction. *Med Sci Monit.* 2015; 21: 3941-3947.
107. King SB. Nitric oxide production from hydroxyurea. *Free Rad Biol Med.* 2004; 37:737-744.
108. Almeida CB, Scheiermann C, Jang JE, Prophete C, Costa FF, Conran N, Frenette, PS. Hydroxyurea and a cGMP-amplifying agent have immediate benefits on acute vaso-occlusive events in sickle cell disease mice. *Blood.* 2012; 120: 2879-2888.
109. Proença-Ferreira R, Brugnerotto AF, Garrido VT, Dominical VM, Vital DM, Ribeiro MFR, Santos *et al.* Endothelial Activation by Platelets from Sickle Cell Anemia Patients. *PLoS ON.* 2014; 9 (2).
110. Garrido VT, Proença-Ferreira R, Dominical VM, Traina F, Bezerra MA, de Mello MR et al. Elevated plasma levels and platelet-associated expression of the pro-thrombotic and proinflammatory protein, TNFSF14 (LIGHT), in sickle cell disease. *Br J Haematol.* 2012; 158(6):78897
111. Conran N, Ferreira HH, Lorand-Metze I, Thomazzi SM, Antunes E, de Nucci G. Nitric oxide regulates human eosinophil adhesion mechanisms in vitro by changing integrin expression and activity on the eosinophil cell surface. *Br J Pharmacol.* 2001; 134 (3): 632-8
112. Conran N, Gambero A, Ferreira HHA, Antunes E, Nucci G. Nitric oxide has a role in regulating VLA-4-integrin expression on the human neutrophil cell surface. *Biochemical Pharmacology.* 2003; 66: 43-50.
113. Finnegan ME, Turhan A, Golan DE, Barabino GA. Adherent leukocytes capture sickle erythrocytes in an in vitro flow model of vaso-occlusion. *American Journal of Hematology.* 2007; 82: 266-75.
114. Dominical VM, Vital DM, Garrido VT, Silveira AA, Olalla-Saad ST, Costa FF, Conran N. Interactions of sickle red blood cells with neutrophils are stabilized on endothelial cell layers. *Blood Cells, Molecules and Diseases.* 2016; 56: 38-40

115. Guerreiro RJ, Santana I, Bras JM, Santiago B, Paiva A, Oliveira C. Peripheral inflammatory cytokines as biomarkers in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Neurodegener Dis.* 2007, 4(6): 406-12.
116. Nathan C. Inflammation: points of control. *Nature.* 2002; 420: 846–852.
117. Ferencík M, Stvrtinová V. Endogenous control and modulation of inflammation. *Folia Biol. Praha.* 1996; 42: 47-55.
118. Miguel LI, Dominical VM, Almeida CB, Saad STO, Costa FF, Conran N. Inhibition of Phosphodiesterase 9A (PDE9A) Reduces Cytokine-Stimulated in vitro Adhesion of Neutrophils from Sickle Cell Anemia Individuals. *Inflammation Research.* 2011; 60:633–642.
119. Charache S, Terrin ML, Moore RD *et al.* Effect of hydroxyurea on the frequency of painful crises in sickle cell anemia. *N. Engl. J. Med.* 1996; 332: 1317-1322.
120. Ware RE, Despotovic JM, Mortier NA, Flanagan JM, HE J, Smeltzer MP, *et al.* A. Pharmacokinetics, pharmacodynamics, and pharmacogenetics of hydroxyurea treatment for children with sickle cell anemia. *Blood.* 2011: 118(18): 4985-4991.
121. De Clerck LS, De Gendt CM, Bridts CH, Van Osselaer N, Stevens W J. Expression of neutrophil activation markers and neutrophil adhesion to chondrocytes in rheumatoid arthritis patients: relationship with disease activity. *Research in Immunology.* 1995; 146: 81-7.
122. Ley K, Tedder TF. Leukocyte interactions with vascular endothelium. New insights into selectin-mediated attachment and rolling. *J Immunol.* 1995: 115(2): 525-528.
123. Smalley DM, Ley K. L-selectin: mechanisms and physiological significance of ectodomain cleavage. *J Cell Mol Med.* 2005; 9 (2): 255-66.
124. Heemskerk JW, Kuijpers MJ, Munnix IC, Siljander PR. Platelet collagen receptors and coagulation. A characteristic platelet response as possible target for antithrombotic treatment. *Trends Cardiovasc Med.* 2005; 15(3):86-92.
125. Cicmil M, Thomas JM, Sage T, Barry FA, Leduc M, Bon C, Gibbins JM. Collagen, convulxin and thrombin stimulate aggregation-independent Tyrosine phosphorylation of CD31 in platelets evidence for the involvement of src family kinases. *J Biol Chem.* 2000: 275: 27339-47.
126. Lindmark E, *et al.* Role of platelet P-selectin and CD40 ligand in the induction of monocyte tissue factor expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000; 20: 2322–2328.
127. Haselmayer P, *et al.* TREM-1 ligand expression on platelets enhances neutrophil activation. *Blood.* 2007; 110: 1029–1035.
128. Gawaz M, Neumann FJ, Dickfeld T, *et al.* Vitronectin receptor (alpha(v)beta3) mediates platelet adhesion to the luminal aspect of endothelial cells: implications for reperfusion in acute myocardial infarction. *Circulation.* 1997; 96(6):1809-1818.

129. Massberg S, Enders G, Matos FC, et al. Fibrinogen deposition at the postischemic vessel wall promotes platelet adhesion during ischemia-reperfusion in vivo. *Blood*. 1999; 94(11):3829-3838.
130. Villagra J, Shiva S, Hunter LA, Machado RF, Gladwin MT, Kato GJ. Platelet activation in patients with sickle disease, hemolysis-associated pulmonary hypertension, and nitric oxide scavenging by cell-free hemoglobin. *Blood*. 2007; 110(6): 2166-72.
131. Kulkarni S, Doppeide SM, Yap CL, Ravanat C, Freund M, Mandin P, Heel KA, Street A, Harper IS, Lanza F, Jackson SP. "A revised model of platelet aggregation". *J Clin Invest*. 2000; 105:783-91.
132. Kubes P, Suzuki M, Granger DN. Nitric oxide: An endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 1991; 88: 4651-4655.

ANEXO

COMITÊ DE ÉTICA EM
PESQUISA DA UNICAMP -
CAMPUS CAMPINAS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Influência da Hidroxiureia na ativação de neutrófilos e plaquetas por estímulo inflamatório

Pesquisador: Cecília Souto Seguin

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 45999415.0.0000.5404

Instituição Proponente: Centro de Hematologia e Hemoterapia - HEMOCENTRO

Patrocinador Principal: MINISTERIO DA EDUCACAO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.145.426

Data da Relatoria: 16/07/2015

Apresentação do Projeto:

*A inflamação é a resposta fisiológica normal à ação invasiva de patógenos ou lesão tecidual. Quando ocorre uma inflamação, as células do sistema imunológico (neutrófilos, linfócitos, monócitos, macrófagos) são recrutadas da circulação sanguínea até o local da lesão tecidual. A inflamação pode ser classificada em aguda ou crônica; quando aguda pode durar de horas a até poucos dias, enquanto as inflamações denominadas como crônicas podem persistir por períodos de meses ou até anos. Muitas doenças são caracterizadas por uma inflamação crônica, tais como: colite ulcerativa, artrite reumatoide, aterosclerose, doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), anemia falciforme (AF) e também algumas dermatites como psoríase ou algumas vasculites. Nessas doenças não infecciosas, os neutrófilos desempenham um papel fundamental, pois eles deixam a circulação e migram em direção ao local da inflamação, e para isso eles aderem ao endotélio vascular ativado antes de migrar para o tecido. A hidroxiureia (HU) tem sido alvo de interesse científico há mais de 100 anos e é amplamente utilizada em várias doenças mieloproliferativas e neoplásicas. HU apresenta benefícios como: diminuição da contagem de plaquetas e leucócitos, a diminuição da ativação do endotélio, mudanças na expressão de moléculas de adesão, e a geração de óxido nítrico. O óxido nítrico é um gás e um radical livre muito reativo e é um dos maiores

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: São Geraldo CEP: 13.083-887
UF: SP Município: CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8938 Fax: (19)3521-7157 E-mail: cep@fcm.unicamp.br

COMITÊ DE ÉTICA EM
PESQUISA DA UNICAMP -
CAMPUS CAMPINAS



Continuação do Formulário 1.145-408

reguladores do tônus vascular, especificamente arteriolar. Acredita-se que a HU seja uma doadora de NO; Almeida, et al., 2012, demonstrou *in vivo* que a administração de Hidróxiureia (HU) é capaz de reduzir a adesão de leucócitos ao endotélio da microvasculatura de camundongos com anemia falciforme de forma aguda e imediata. Os efeitos benéficos da HU podem ser mediados por uma via dependente de NO e deste modo, torna-se interessante o estudo dos efeitos da HU nas propriedades adesivas de neutrófilos quando estes recebem um estímulo inflamatório e ainda definir se este efeito é intermediado por uma via de sinalização dependente em óxido nítrico. Sendo assim, o objetivo desse trabalho é investigar *in vitro* o efeito da hidróxiureia nas propriedades adesivas dos neutrófilos e plaquetas sob estímulo inflamatório e investigar a participação da via dependente de óxido nítrico nesse efeito.”

Objetivo da Pesquisa:

Investigar *in vitro* o efeito da hidróxiureia nas propriedades adesivas dos neutrófilos e plaquetas sob estímulo inflamatório e investigar a participação da via dependente de óxido nítrico nesse efeito.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Os riscos são aqueles associados à coleta de sangue venoso, dor local e possibilidade de hematoma.

Benefícios: Não há benefícios aos participantes.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de uma pesquisa apresentada como trabalho de mestrado da pós-graduada Cecília Souto Seguin (pesquisadora responsável), com orientação da Profa. Dra. Nicola Amanda Conran Zorzetto. Nesta pesquisa, pretende-se avaliar *in vitro* o efeito da hidróxiureia nas propriedades adesivas dos neutrófilos e plaquetas sob estímulo inflamatório e investigar a participação da via dependente de óxido nítrico nesse efeito. Pretende-se incluir 20 participantes no estudo, saudáveis, com idade entre 18 e 60 anos e que não estejam utilizando medicação anti-inflamatória, analgésica ou anticoagulante. Os participantes compreenderão funcionários, alunos e doadores de sangue do hemocentro da Unicamp, os quais serão convidados a doar 6ml de sangue periférico (venoso).

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados:

1. Folha de rosto assinada pela pesquisador responsável, Cecília Souto Seguin e pela Profa. Dra.

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo CEP: 13.083-887
UF: SP Município: CAMPINAS
Telefone: (19)3521-2606 Fax: (19)3521-7187 E-mail: cep@fcm.unicamp.br

COMITÊ DE ÉTICA EM
PESQUISA DA UNICAMP -
CAMPUS CAMPINAS



Continuação do Parecer: 1.145.425

Sara Saad, Coordenadora do Centro de Hematologia e Hemoterapia - Hemocentro de Campinas - Unicamp, Instituição Indicada como proponente;

2. Termo de consentimento Livre Esclarecido modificado segundo parecer consubstanciado 1.136.114;
3. Formulário da Plataforma Brasil com as informações básicas sobre o projeto.
4. Projeto completo

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O TCLE foi modificado segundo indicado no parecer substanciado 1.136.114 de 23/05/2015.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

- O sujeito de pesquisa deve receber uma via do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado.

- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado.

- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado. Se o pesquisador considerar a descontinuação do estudo, esta deve ser justificada e somente ser realizada após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou. O pesquisador deve aguardar o parecer do CEP quanto à descontinuação, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de uma estratégia diagnóstica ou terapêutica oferecida a um dos grupos da pesquisa, isto é, somente em caso de necessidade de ação imediata com intuito de proteger os participantes.

- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo. É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo CEP: 13.063-867
UF: SP Município: CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8938 Fax: (19)3521-7187 E-mail: cep@fcm.unicamp.br

COMITÊ DE ÉTICA EM
PESQUISA DA UNICAMP -
CAMPUS CAMPINAS



Continuação do Parecer 1.145.405

- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial.

- Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, inicialmente seis meses após a data deste parecer de aprovação e ao término do estudo.

- Lembramos que segundo a Resolução 466/2012, item XI.2 letra e, "cabe ao pesquisador apresentar dados solicitados pelo CEP ou pela CONEP a qualquer momento".

CAMPINAS, 10 de Julho de 2015

Assinado por:
Renata Maria dos Santos Celeghini
(Coordenador)

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo CEP: 13.063-887
UF: SP Município: CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8938 Fax: (19)3521-7187 E-mail: cep@fcm.unicamp.br