



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

MARIANA ALCANTARA CARDOSO FARIA

CARACTERIZAÇÃO DE NEUTRÓFILOS E SEUS PRODUTOS NO SANGUE
PERIFÉRICO DE PACIENTES COM DOENÇA ARTERIAL CORONARIANA

CAMPINAS

2019

MARIANA ALCANTARA CARDOSO FARIA

**CARACTERIZAÇÃO DE NEUTRÓFILOS E SEUS PRODUTOS NO SANGUE
PERIFÉRICO DE PACIENTES COM DOENÇA ARTERIAL CORONARIANA**

Dissertação de Mestrado 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, na área de concentração em Patologia Clínica.

ORIENTADOR: MARIA HELOISA SOUZA LIMA BLOTTA

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA MARIANA ALCANTARA CARDOSO FARIA, E ORIENTADA PELA PROF. Dr^a. MARIA HELOISA SOUZA LIMA BLOTTA.

CAMPINAS

2019

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CAPES, 1693706; CNPq, 308746/2013-9

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

F225c Faria, Mariana Alcantara Cardoso, 1989-
Caracterização de neutrófilos e seus produtos em sangue periférico de
pacientes com doença arterial coronarínica / Mariana Alcantara Cardoso Faria. –
Campinas, SP : [s.n.], 2019.

Orientador: Maria Heloisa de Souza Lima Blotta.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade
de Ciências Médicas.

1. Neutrófilos. 2. Inflamação. 3. Aterosclerose. I. Blotta, Maria Heloisa de
Souza Lima, 1953-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Characterization of neutrophil and their products in the peripheral
blood of patients with coronary arterial disease

Palavras-chave em inglês:

Neutrophils
Inflammation
Atherosclerosis

Área de concentração: Patologia Clínica

Titulação: Mestra em Ciências

Banca examinadora:

Maria Heloisa de Souza Lima Blotta [Orientador]
Maria Cristina de Oliveira Izar
Albina Messias de Almeida Milani Altemani

Data de defesa: 30-01-2019

Programa de Pós-Graduação: Ciências Médicas

COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

MARIANA ALCANTARA CARDOSO FARIA

ORIENTADOR: PROFESSORA DRA. MARIA HELOISA DE SOUZA LIMA BLOTTA

MEMBROS:

- 1. PROFA. DRA. MARIA HELOISA DE SOUZA LIMA BLOTTA**
- 2. PROFA. DRA. MARIA CRISTINA DE OLIVEIRA IZAR**
- 3. PROF. DRA. ALBINA MESSIAS DE ALMEIDA MILANI ALTEMANI**

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

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da FCM.

Data de Defesa: 30/01/2019

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família, que muitas vezes deixou seus sonhos de lado para acreditar nos meus. Aos meus pais, Fátima e Neio, por serem pessoas sensacionais e por me darem todo o suporte necessário para seguir meu caminho.

Aos meus irmãos, Eduardo e Carolina por estarem comigo sempre e me ensinarem a acreditar que tudo é possível.

Ao meu esposo, Ignácio por toda a compreensão e amor.

Amo todos vocês.

AGRADECIMENTOS

À toda minha família, em especial meus pais, irmãos e esposo. Obrigada pela educação e pelo empenho em sempre me fazer seguir em frente, enfrentando meus medos e me dando a confiança para seguir em busca de meus objetivos.

À minha orientadora professora Maria Heloisa Blotta, por ter me acolhido em seu grupo de pesquisa. Obrigada pela confiança, pelo respeito e por me incentivar sempre a seguir meus sonhos.

Aos meus amigos do Laboratório de Imunologia Celular e Molecular, Amauri, Lilian, Livia Genaro e Livia Furquim, e a Juliana do Laboratório de Genética do Câncer, obrigada por me proporcionarem tantos momentos de diversão e companheirismo, sempre buscando a melhor oportunidade para aprender e partilhar experiências.

Aos pacientes e doadores de sangue, por permitirem que meu trabalho fosse realizado e a todos, que de alguma maneira, contribuíram para a realização desse projeto.

A CAPES e ao CNPQ, pela bolsa de mestrado e pelos auxílios concedidos.

RESUMO

A aterosclerose é uma doença inflamatória crônica caracterizada pela retenção de lipídios e células da resposta imunológica na íntima arterial. Monócitos e macrófagos são células centrais no processo da formação da lesão de ateroma, entretanto, um crescente número de evidências aponta para a participação dos neutrófilos, principalmente nos estágios mais tardios da doença. Os neutrófilos contribuem para a propagação da inflamação através de produção e liberação de mediadores locais, que induzem um maior recrutamento de leucócitos. Além disso, produzem múltiplas proteases capazes de degradar a matriz extracelular e atuando no processo de desestabilização e consequente ruptura da placa aterosclerótica. A existência de subpopulações de neutrófilos com heterogeneidade funcional e fenotípica e funções pró e anti-inflamatória vem sendo descrita em doenças inflamatórias crônicas, mas ainda não foram caracterizadas em doenças cardiovasculares. O presente estudo teve por objetivo evidenciar a participação dos neutrófilos em diferentes estágios da doença arterial coronariana (DAC). Para tal, neutrófilos do sangue periférico de pacientes com DAC (doença coronariana crônica - DCC e síndrome coronariana aguda - SCA) e controles com (FR) e sem (C) fatores de risco para aterosclerose foram avaliados quanto a expressão de marcadores de membrana por citometria de fluxo e a concentração de produtos de neutrófilos foi determinada no plasma por ELISA. Observamos uma maior expressão de moléculas de adesão como CD11b nos grupos FR, DCC e SCA. O grupo DCC apresentou uma maior frequência de neutrófilos CD54+ e CCR5+, além de uma maior expressão da glicoproteína CD177, enquanto o grupo SCA apresentou maior frequência de CXCR1+. Os mesmos grupos apresentaram concentrações plasmáticas mais elevadas de mieloperoxidase e elastase neutrofílica em relação ao grupo controle, enquanto os níveis de IL-8 e NGAL foram maiores nos pacientes com DCC. A dosagem de dsDNA, que reflete a formação de NETs, também foi maior no grupo com DCC e indivíduos com FR. Em conjunto, nossos resultados mostraram alterações na população de neutrófilos, bem como na produção de seus mediadores nos diferentes estágios da doença aterosclerótica indicando a sua participação no processo de aterogênese.

Palavras-chaves: aterosclerose, neutrófilos e inflamação.

ABSTRACT

Atherosclerosis is a chronic inflammatory disease characterized by retention of lipid and immune response cells in the arterial intima. Monocytes and macrophages are central cells in the process of atheroma lesion formation, however, a growing body of evidence points to the involvement of neutrophils, especially in the later stages of the disease. Neutrophils contribute to the spread of inflammation through the production and release of local mediators, which induce a higher recruitment of leukocytes. In addition, they produce multiple proteases capable of degrading the extracellular matrix and acting in the process of destabilization and consequent rupture of the atherosclerotic plaque. The existence of neutrophil subpopulations with functional and phenotypic heterogeneity and pro and anti-inflammatory functions has been described in chronic inflammatory diseases, but they have not yet been characterized in cardiovascular diseases. The present study aimed to evidence the participation of neutrophils in different stages of coronary artery disease (CAD). Peripheral blood neutrophils from patients with CAD (Stable angina - SA and unstable angina) and controls with (RF) and without (C) risk factors for atherosclerosis were evaluated for expression of membrane markers by flow cytometry and the concentration of neutrophil products was determined in the plasma by ELISA. We observed a greater expression of adhesion molecules such as CD11b in the RF, SA and UA groups. The SA group had a higher frequency of CD54 + and CCR5 + neutrophils, in addition to a greater expression of the CD177 glycoprotein, while the CAD group had a higher frequency of CXCR1 +. The same groups had higher plasma concentrations of myeloperoxidase and neutrophil elastase than the control group, whereas IL-8 and NGAL levels were higher in patients with SA. The dosage of dsDNA, which reflects the formation of NETs, was also higher in the group with SA and individuals with RF. Taken together, our results showed changes in the neutrophil population, as well as in the production of its mediators in the different stages of atherosclerotic disease, indicating its participation in the atherogenesis process.

Key-words: neutrophil, atherosclerosis, inflammation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Figura 1. Estratégia para a análise das subpopulações de neutrófilos do sangue total. A) Em um primeiro momento, para retirada de células agrupadas (doublets) foi gerado um gráfico do tipo dot-plot no qual foi delimitado um gate para as células isoladas (sem doublets), B) seguido de um dot plot (SSC-H X SSC-A) para uma segunda retirada de células agrupadas, para isso foi delimitado um gate Single Cells. C) foi gerado um gráfico do tipo dot-plot, no qual a população de neutrófilos foi determinada de acordo com as suas características de tamanho (FSC) e granulosidade (SSC). D) A partir desse gráfico foi gerado outro dot-plot, no qual foi avaliada a marcação dos neutrófilos com o anticorpo anti-CD16 e anti-CD49d, sendo então delimitada a população de neutrófilos CD16+CD49d-.....35

Figura 2. Intensidade Média de Fluorescência (IMF) das integrinas CD11b (A) e CD18 (B) em neutrófilos dos pacientes com Doença Coronariana Crônica (DCC, n=33), Síndrome Coronariana Aguda (SCA, n=20) e controles com (FR, n=33) e sem (C, n=15) fatores de risco para aterosclerose. As barras horizontais representam a mediana. Kruskal-Wallis, com pós teste de Dunn.36

Figura 3. Frequência de neutrófilos CD54+ no sangue periférico de pacientes com Doença Coronariana Crônica (DCC, n=33), Síndrome Coronariana Aguda (SCA, n=20) e controles com (FR, n=33) e sem (C, n=15) fatores de risco para aterosclerose. As barras horizontais representam a mediana. Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn.37

Figura 4. Frequência de neutrófilos CD177+ (A) e CD177- (B) no sangue periférico de pacientes com Doença Coronariana Crônica (DCC, n=33), Síndrome Coronariana Aguda (SCA, n=20) e controles com (FR, n=33) e sem (C, n=15) fatores de risco para aterosclerose. As barras horizontais representam a mediana. Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn.38

Figura 5. Intensidade Média de Fluorescência (IMF) de CD177 em neutrófilos dos pacientes com Doença Coronariana Crônica (DCC, n=33), Síndrome Coronariana Aguda (SCA, n=20) e controles com (FR, n=33) e sem (C, n=15) fatores de risco para aterosclerose. As barras horizontais representam a mediana. Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn. * $p < 0,05$38

Figura 6. Frequência de neutrófilos CCR5+ no sangue periférico de pacientes com Doença Coronariana Crônica (DCC, n=33), Síndrome Coronariana Aguda (SCA,

n=20) e controles com (FR, n=33) e sem (C, n=15) fatores de risco para aterosclerose. As barras horizontais representam a mediana. Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn.

.....39

Figura 7. Frequência de neutrófilos CXCR1+ no sangue periférico de pacientes com Doença Coronariana Crônica (DCC, n=33), Síndrome Coronariana Aguda (SCA, n=20) e controles com (FR, n=33) e sem (C, n=15) fatores de risco para aterosclerose. As barras horizontais representam a mediana. Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn.

* $p < 0,05$40

Figura 8. Frequência de neutrófilos CXCR2+ no sangue periférico de pacientes com Doença Coronariana Crônica (DCC, n=33), Síndrome Coronariana Aguda (SCA, n=20) e controles com (FR, n=33) e sem (C, n=15) fatores de risco para aterosclerose. As barras horizontais representam a mediana. Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn.

.....41

Figura 9. Frequência de células CXCR4+ de neutrófilos do sangue periférico nos diferentes grupos de estudo. Controle (C, n=15), Fator de Risco (FR, n=33), Doença Coronariana Crônica (DCC, n=33), Síndrome Coronariana Aguda (SCA, n=20). As barras horizontais representam a mediana. Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn.

Figura 10. Frequência de células CXCR4^{High} CXCR2^{Low} (A) e CXCR4^{Low} CXCR2^{High} (B) de neutrófilos do sangue periférico nos diferentes grupos de estudo. Controle (C, n=15), Fator de Risco (FR, n=33), Doença Coronariana Crônica (DCC, n=33), Síndrome Coronariana Aguda (SCA, n=20). As barras horizontais representam a mediana. Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn.43

Figura 11. Concentração plasmática de mieloperoxidase (MPO) no plasma de pacientes com Doença Coronariana Crônica (DCC, n=33), Síndrome Coronariana Aguda (SCA, n=20) e controles com (FR, n=33) e sem (C, n=15) fatores de risco para aterosclerose. As barras horizontais representam a mediana. Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$44

Figura 12. Concentração plasmática de Elastase neutrofílica (EN) no plasma de pacientes com Doença Coronariana Crônica (DCC, n=33), Síndrome Coronariana Aguda (SCA, n=20) e controles com (FR, n=33) e sem (C, n=15) fatores de risco para aterosclerose. As barras horizontais representam a mediana. Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$45

Figura 13. Concentração plasmática de IL-8 no plasma de pacientes com Doença Coronariana Crônica (DCC, n=33), Síndrome Coronariana Aguda (SCA, n=20) e

controles com (FR, n=33) e sem (C, n=15) fatores de risco para aterosclerose. As barras horizontais representam a mediana. Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ 46

Figura 14. Concentração plasmática de NGAL no plasma de pacientes com Doença Coronariana Crônica (DCC, n=33), Síndrome Coronariana Aguda (SCA, n=20) e controles com (FR, n=33) e sem (C, n=15) fatores de risco para aterosclerose. As barras horizontais representam a mediana. Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn. * $p < 0,05$ 46

Figura 15. Concentração plasmática de MMP-9 no plasma de pacientes com Doença Coronariana Crônica (DCC, n=33), Síndrome Coronariana Aguda (SCA, n=20) e controles com (FR, n=33) e sem (C, n=15) fatores de risco para aterosclerose. As barras horizontais representam a mediana. Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn. * $p < 0,05$ 47

Figura 16. Concentração plasmática de dsDNA no plasma de pacientes com Doença Coronariana Crônica (DCC, n=6), Síndrome Coronariana Aguda (SCA, n=7) e controles com (FR, n=19) e sem (C, n=4) fatores de risco para aterosclerose. As barras horizontais representam a mediana. Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn. * $p < 0,05$ 48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Parâmetros clínicos e laboratoriais dos pacientes dos grupos experimentais.
.....32

Tabela 2. Correlação entre as concentrações de DNA, Elastase Neutrófila e MPO
nos diferentes grupos de pacientes (teste de Spearman)49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ApoE – Apolipoproteína E

BSA – Soro albumina bovina

CCL – Quimiocina ligante da família CC

CCR – Receptor de quimiocina da família CC

CD – Cluster de diferenciação

DAC – Doença Arterial Coronariana

DCC – Doença Coronariana Crônica

DCs – Células Dendriticas

DCV – Doença Cardio Vascular

DNA – Ácido Desoxiribunucleico

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

EN – Elastase neutrofílica

EROS – Espécies Reativas de Oxigênio

FSC – “Forward scatter“

FR – Fator de Risco

HDL – Lipoproteína de Alta Densidade

ICAM-1 – Molécula de adesão intercelular

IFN – Interferon

IL – Interleucina

IMC – Índice de Massa Corpórea

IMF – Intensidade média de fluorescência

LDL – Lipoproteína de Baixa Densidade

LDL-ox – Lipoproteína de Baixa Densidade Oxidada

LL-37 – Leucina-leucina 37

M-CSF – Fator Estimulador de Colônia de Macrófagos

MMP-9 – Metaloproteinase-9

MPO – Mieloperoxidase

NB-1 – Antígeno Neutrófilo específico

NETs – Neutrophil extracellular traps

NGAL – Lipocalina associada à gelatinase de neutrófilos

NLR – Relação Neutrófilo por Linfócito

NLRs – Receptor do Tipo NOD

OMS – Organização Mundial de Saúde

PBS – Tampão fosfato salina

PCR – Proteína C Reativa

PECAM- 1 – Molécula de adesão celular endotelial plaquetária

PR3 – Proteinase 3

RANTES – “Regulated upon activation normal T cell expressed and secreted”

rTEM – Neutrófilos com migração reversa

SCA – Síndrome Coronariana Aguda

SDF-1 – Fator derivado de células estromais 1

SSC – “Side scatter”

SR – Receptor Scavenger

TCLE – Termo de consentimento livre e esclarecido

TLRs – Toll Like Receptor

TNF- α – Fator de necrose tumoral α

VCAM-1 – Molécula de adesão vascular 1

VEGF – Fator de Crescimento endotelial vascular

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
1.1	A resposta inflamatória na aterosclerose – participação de neutrófilos	17
1.2	Receptores de quimiocinas e grânulos.....	19
1.3	Imunomodulação	21
1.4	Subpopulações de neutrófilos	22
2	OBJETIVOS.....	25
2.1	Objetivo Geral	25
2.2	Objetivos Específicos	25
3	MATERIAIS E MÉTODOS	26
3.1	Caracterização dos grupos experimentais	26
3.2	Cálculo amostral.....	27
3.3	Procedimentos gerais.....	27
3.4	Cálculo da relação Neutrófilos/Linfócitos (NLR)	28
3.5	Detecção de mediadores inflamatórios por ELISA	28
3.6	Obtenção dos leucócitos do sangue periférico	28
3.7	Citometria de fluxo para análise dos neutrófilos	29
3.8	Quantificação de dsDNA no plasma.....	29
3.9	Análise estatística	30
4	RESULTADOS	31
4.1	Caracterização dos grupos de estudo	31
4.2	Avaliação das populações de neutrófilos por citometria de fluxo	34
4.2.1	Estratégia para análise das subpopulações de neutrófilos	34
4.2.2	Moléculas de adesão	36
4.2.3	Receptores de Quimiocinas	39
4.3	Detecção de mediadores inflamatórios por ELISA	43
4.4	Quantificação de dsDNA no plasma.....	47

5	DISCUSSÃO.....	50
6	CONCLUSÃO	57
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58
8	ANEXOS.....	68

1 INTRODUÇÃO

1.1 A resposta inflamatória na aterosclerose – participação de neutrófilos

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), as Doenças Cardiovasculares (DCV) são a primeira causa de morte no mundo. Estima-se que 17,7 milhões de pessoas morreram de doença cardiovascular em 2015, o que representa 31% de todas as mortes globais, sendo a maioria devido à doença arterial coronariana (DAC) e acidente vascular cerebral (1).

A base fisiopatológica para os eventos cardiovasculares, como a DAC e o acidente vascular encefálico é a aterosclerose. Considerado como um processo inflamatório crônico de evolução lenta, a aterosclerose é caracterizada pelo acúmulo de lipídios e componentes celulares da resposta imunológica nas artérias de grande e médio calibre levando a formação de lesões conhecidas como placas ateroscleróticas ou ateromas (2-4).

A patogênese da aterosclerose envolve a ativação de vias de sinalização pró-inflamatórias, a expressão de citocinas, quimiocinas e o aumento do stress oxidativo. O estresse oxidativo é o desequilíbrio em favor do aumento da geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) e/ou redução dos sistemas de defesa anti-oxidante inatos do corpo (5). As EROs desempenham um papel importante nas respostas inflamatórias, na apoptose, no crescimento celular e na alteração do tônus vascular, bem como na oxidação do LDL-colesterol (6).

A partícula de LDL retida na íntima arterial pode sofrer modificação por enzimas e radicais de oxigênio, formando moléculas de LDL oxidada (LDLox) (7).

Entre os leucócitos que migram, os monócitos são as principais células envolvidas na formação da lesão inicial. A presença de fatores de crescimento, como M-CSF, promove a transformação dos monócitos em macrófagos, o principal grupo celular envolvido nos processos de formação e desestabilização das lesões de ateroma (8). Os macrófagos passam a expressar grande quantidade de receptores da imunidade inata envolvidos nos processos de endocitose de lipoproteínas e fragmentos apoptóticos, como os receptores *scavenger* (SR), representado principalmente pelo CD36, que apresentam papel essencial na formação da célula

espumosa, característica do ateroma (9, 10). Além disso, os macrófagos aumentam a expressão de receptores que induzem ativação de vias pró-inflamatórias como os receptores do tipo Toll (TLRs) e os receptores do tipo NOD (NLRs) (10).

Mais recentemente os neutrófilos vêm sendo apontados como importantes participantes da patogênese das lesões ateroscleróticas, com estudos mostrando o envolvimento destas células nos processos que causam acidente vascular isquêmico, trombose e aterosclerose (11-13).

Os neutrófilos estão entre as primeiras células a responder a microrganismos invasores ou danos teciduais, correspondem a 70% dos leucócitos do sangue periférico e têm meia vida curta (6-8h) na circulação. Participam ativamente do processo de inflamação aguda, com importante papel na fagocitose e produção de espécies reativas de oxigênio, mieloperoxidase (MPO) e várias enzimas proteolíticas, como a elastase. Estes mecanismos em conjunto levam a eliminação de agentes microbianos patogênicos, mas também contribuem para a destruição tecidual (14). Muitas das funções desempenhadas pelos neutrófilos ocorrem através da ativação e sinalização de receptores da imunidade inata, tais como TLRs, receptores de lectina do tipo C e receptores do tipo RIG-I (15, 16).

Vários estudos nos últimos anos mostraram haver uma correlação direta entre a contagem de neutrófilos do sangue periférico e as doenças cardiovasculares (17, 18). Além disso, a razão entre o número total de neutrófilos e de linfócitos (NLR – “*Neutrophil Lymphocyte Ratio*”) vem sendo utilizada como marcador de risco cardiovascular com alto valor preditivo e de prognóstico para acidentes cardiovasculares (19, 20). O aumento no número de neutrófilos jovens (desvio à direita) sugere uma liberação precoce de neutrófilos da medula óssea, fato geralmente associado a infecção ou inflamação (21).

Por muito tempo os neutrófilos foram negligenciados no contexto da fisiopatologia da aterosclerose. Esta lacuna pode ser atribuída a sua rara detecção nas lesões (vida média curta) e a falta de métodos de detecção sensíveis e específicos que permitam sua diferenciação de outras células como monócitos e células dendríticas (DCs), com as quais compartilham alguns receptores de membrana. No entanto, novas evidências têm indicado a participação dos neutrófilos na aterogênese.

1.2 Receptores de quimiocinas e grânulos

Durante a formação do ateroma, os neutrófilos ganham acesso à íntima arterial por mecanismos que envolvem a integrina- β 2 e as quimiocinas CXCL8 (IL-8) e CCL5 (RANTES), por intermédio da ligação aos receptores CXCR2, CCR1 e CCR5 (22-25). Döring e colaboradores mostraram que camundongos deficientes em ApoE e St3Gal4, uma glicosiltransferase envolvida na geração de selectinas, desenvolvem lesões ateroscleróticas significativamente menores comparado a camundongos selvagens (26).

O controle da migração de neutrófilos para a placa coronariana envolve o receptor de quimiocina CXCR2 (25). Este receptor se liga a IL-8 com alta afinidade assim como outros ligantes CXCL1, CXCL2, CXCL3 e CXCL5. CXCR2 é expresso em neutrófilos e têm importante papel em mediar a migração destas células, visto que sua inibição diminui o recrutamento de neutrófilos para sítios inflamatórios (27, 28). Em estudos prévios a administração de AZD5069, antagonista específico de CXCR2, foi capaz de inibir o fluxo de cálcio, a quimiotaxia e a expressão de CD11b em neutrófilos humanos *in vitro*, em resposta a ligantes como IL-8 e fator de crescimento associado ao oncogene- α (29). Em um modelo de inflamação pulmonar induzida por LPS em camundongos o inibidor de CXCR2, AZD5069 reduziu a neutrofilia de forma dose dependente tanto no fluido broncoalveolar como no soro (30). Estes achados embasaram ensaio clínico em andamento no qual o efeito de AZD5069 vem sendo avaliado quanto ao seu efeito na reserva de fluxo coronariano medida pela tomografia computadorizada com emissão de pósitrons e pela morfologia das placas coronárias (31).

Outro receptor de quimiocina importante no desenvolvimento da aterosclerose e expressa por neutrófilos é o CXCR4, envolvido na liberação de neutrófilos da medula óssea, bem como na depuração de neutrófilos senescentes da circulação (32, 33). Vários estudos mostraram que ao bloquear o CXCR4 observaram um aumento da liberação de neutrófilos da medula óssea para a circulação (33, 34). Em camundongos ApoE $-/-$, o bloqueio completo e crônico de CXCR4 com AMD3465, um antagonista de CXCR4, aumentou o número de neutrófilos no sangue, resultando em um acúmulo destas células na parede do vaso aterosclerótico, promovendo a progressão da placa (34).

Uma vez no interior da lesão de ateroma, os neutrófilos respondem a componentes endógenos alterados presentes no microambiente, como a partícula de LDL oxidada. O reconhecimento dessas moléculas induz a transmigração e desgranulação levando à ativação da resposta inflamatória pela secreção de uma grande variedade de mediadores como o leucotrieno B₄, espécies reativas de oxigênio (EROs) e pela liberação de enzimas granulares. Estes eventos promovem o aumento da adesividade e da permeabilidade do endotélio vascular (35).

Grânulos como azurocidina, LL-37, α -defensinas e NGAL (lipocalina associada à gelatinase de neutrófilos), amplamente restritos a neutrófilos foram identificados por imuno-histoquímica em lesões ateroscleróticas (36-39). Desde então, várias proteínas tipicamente expressas e liberadas por neutrófilos passaram a ser utilizadas como biomarcadores da doença, como a MPO (40, 41).

Presente em maior concentração nos neutrófilos, a MPO é uma enzima presente em lesões ateroscleróticas humanas e fundamental na produção de EROS (42, 43). Brennan *et al.* dosaram os níveis plasmáticos em pacientes com DAC e observaram aumento nos níveis de paciente com angina instável, além disso mostraram em seu estudo que os níveis plasmáticos de mieloperoxidase predizem os riscos cardiovasculares independentemente dos níveis de proteína C-reativa e outros marcadores de inflamação (44). Liu e colaboradores mostraram que a administração de INV-315, inibidor farmacológico da MPO, em camundongos ApoE^{-/-} resulta em uma redução considerável das placas ateroscleróticas, devido à melhora da função vascular (45).

A elastase neutrofílica (NE), uma serina proteinase armazenada em grânulos azurófilos, é liberada para o espaço extracelular em resposta a vários estímulos inflamatórios agudos e/ou crônicos (46). Marino e colaboradores detectaram elastase, IL-8 e VEGF (fator de crescimento endotelial vascular) em neutrófilos na circulação e no interior de placas ateroscleróticas de pacientes submetidos à endarterectomia carotídea, relacionando-os ao desenvolvimento e progressão da aterosclerose (47). Em camundongos ApoE^{-/-} NE^{-/-} foi observada uma redução significativa do tamanho das placas ateroscleróticas, além de um menor número de neutrófilos e macrófagos no interior das mesmas (48).

Em estudo prospectivo foi demonstrado associação entre concentrações plasmáticas de NGAL, glicoproteína estocada em grânulos de neutrófilos, e eventos cardiovasculares, com valores preditivos superiores a proteína C reativa (49). A expressão de NGAL em células endoteliais, células musculares lisas e macrófagos em placas ateroscleróticas sugere seu envolvimento na disfunção endotelial, processos inflamatórios e degradação de matriz que levam a instabilidade da placa aterosclerótica pela modulação da metaloproteinase-9 (MMP-9). A formação de complexos NGAL e MMP-9 é crucial para a erosão da placa aterosclerótica e formação do trombo (49, 50).

1.3 Imunomodulação

Neutrófilos também são células capazes de modular a resposta imune por meio da liberação de grânulos que leva ao recrutamento e ativação de monócitos, macrófagos e células dendríticas (51, 52).

De fato, o extravasamento de neutrófilos para o local da inflamação é imediatamente seguido por uma onda de migração de monócitos (53). A liberação de azurocidina e proteinase-3 dos neutrófilos aumenta a expressão da molécula de adesão vascular-1 (VCAM-1) e ICAM-1, o que resulta na adesão de monócitos nas células endoteliais facilitando a sua migração (54, 55).

A influência dos neutrófilos sobre os macrófagos também parece contribuir de forma significativa para as fases mais avançadas da aterosclerose. Neutrófilos podem ativar macrófagos através da secreção de TNF- α , IL-8 e IFN- γ . Além disso, a liberação de MPO a partir dos grânulos pode induzir a formação de EROS, juntamente com a liberação de outras citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1 β , IL-6, IL-8 e GM-CSF (56). As EROs por sua vez participam do processo de oxidação da LDL, fornecendo, assim, o substrato para o desenvolvimento de células de espumosas (57). Por outro lado, os neutrófilos também podem contribuir para a resolução da inflamação e reparação tecidual através da indução de sua própria remoção e liberação de moléculas anti-inflamatórias como anexina-1 e lipoxina A4 (58).

Uma outra característica dos neutrófilos é a capacidade de liberar armadilhas extracelulares (NETs – *neutrophil extracellular traps*) em locais de intensa inflamação (59). As NETs são compostas de material genético (DNA, histonas) e proteínas líticas

dos grânulos citoplasmáticos com ação pró-inflamatória, citotóxica e pró-trombótica (60, 61), envolvidas na patogênese de diversas doenças inflamatórias (62).

Síndromes coronarianas agudas podem se iniciar tanto pela ruptura da capa fibrosa, por erosões superficiais ou hemorragias intraplaca. Neutrófilos e NETs são abundantes em placas propensas ao rompimento, mas não em placas estáveis, indicando sua importante participação nas complicações trombóticas ou hemorrágicas e consequentemente no quadro isquêmico agudo (63).

Warnatsch e colaboradores detectaram grande quantidade de NETs em lesões de ateroma de camundongos ApoE^{-/-} e em neutrófilos humanos estimulados com cristais de colesterol. Além disso, demonstraram que as NETs ativam as vias de sinalização da imunidade inata (NLRs), o inflamassoma, em macrófagos culminando com grande liberação de IL-1 β (59).

1.4 Subpopulações de neutrófilos

Neutrófilos têm sido classicamente descritos como uma população homogênea de células que desempenham as mesmas funções, exibem as mesmas propriedades durante a inflamação e em resposta à infecção, e que são equipadas com as mesmas proteínas granulares (64). No entanto, evidências acumuladas nos últimos anos revelaram que os neutrófilos apresentam uma grande heterogeneidade fenotípica e versatilidade funcional, o que os coloca como importantes moduladores da inflamação e das respostas imunes (65, 66). De fato, achados mais recentes a respeito da existência de subconjuntos distintos de neutrófilos na circulação, caracterizados pela expressão de diferentes marcadores, têm proporcionado uma atenção renovada a essa questão (67, 68).

Uma molécula cuja presença ou ausência define subpopulações de neutrófilos é a glicoproteína de superfície CD177 (NB1), expressa em diferentes concentrações nos neutrófilos circulantes em indivíduos saudáveis (69, 70). Funções distintas foram recentemente atribuídas a CD177, incluindo a alta afinidade de ligação à molécula de adesão plaquetária endotelial (PECAM-1) e a capacidade de se associar à serina protease PR3 (71, 72).

A interação CD177/PECAM é crucial na migração transendotelial de neutrófilos facilitando o seu acesso aos sítios inflamatórios. Subpopulações de neutrófilos que expressam CD177 (CD177+) parecem ter uma vantagem competitiva sobre as subpopulações que não expressam esta proteína de membrana (CD177-) no que se refere a ligação a células endoteliais, mas não a plaquetas. De fato, polimorfismo de PECAM-1 que afeta sua ligação a moléculas CD177 não influencia a capacidade dos dois subsets em se ligar em plaquetas, mas influencia significativamente a migração transendotelial de neutrófilos que expressam CD177 (73).

Estudos recentes mostraram que os neutrófilos não se movem somente do lúmen vascular para os tecidos, mas também em direção oposta, dos tecidos para os vasos, fenômeno este conhecido como migração transendotelial reversa (rTEM) (74). Os neutrófilos capazes de realizar a rTEM apresentam fenótipo de superfície peculiar com alta expressão de ICAM-1 e expressão baixa ou nula do receptor de quimiocinas CXCR1, de forma que esses marcadores poderiam ser usados para identificar neutrófilos em circulação que são "tecidos experientes". Neutrófilos com este padrão particular podem ser encontrados com uma frequência aumentada no sangue periférico de pacientes com doenças inflamatórias crônicas, como a artrite reumatoide (75). Os neutrófilos que executam o rTEM apresentam o fenótipo ICAM-1^{hi} CXCR1^{low}, diferentemente de neutrófilos circulatórios que não fazem transmigração (fenótipo ICAM-1^{low} CXCR1^{hi}) e de neutrófilos teciduais (fenótipo ICAM-1^{low} CXCR1^{low}) (75).

O número de neutrófilos circulantes é dependente do equilíbrio entre a liberação daqueles recém produzidos da medula óssea e o sequestro de células senescentes para serem destruídas em tecidos periféricos. Os neutrófilos circulantes são geralmente considerados como células de vida curta, com um tempo de circulação aproximado de 6 a 8 horas em humanos (76). Entretanto, Pillay e colaboradores mostraram através da marcação in vivo com óxido de deutério (²H₂O) que neutrófilos humanos podem apresentar uma vida útil média significativamente mais longa chegando a 5,4 dias (77). Uma vez no sangue, os neutrófilos podem ser atraídos para os tecidos por mediadores inflamatórios liberados localmente, como as quimiocinas, em resposta à infecção, lesão ou inflamação, como parte da resposta imune inata do hospedeiro. Os neutrófilos que permanecem no sangue se tornam senescentes, adquirindo um fenótipo alterado (CXCR4^{High} CXCR2^{Low}) com funcionalidade comprometida para atuar como célula da imunidade inata, o que exige que eles sejam

eliminados (78). Os neutrófilos senescentes sintetizam ativamente e expressam níveis aumentados de CXCR4, o que aumenta sua sensibilidade ao SDF-1 (fator derivado de células estromais-1), promovendo seu direcionamento para a medula óssea. Este processo é ainda apoiado por uma redução nas respostas mediadas por CXCR2, tornando-os menos sensíveis às quimiocinas, e assim reduzindo a sua migração para locais de inflamação (33, 76, 78).

Hiperlipidemia e inflamação representam os dois principais pilares na fisiopatologia da aterosclerose (2-4). Assim como para outras doenças inflamatórias crônicas, a exposição de neutrófilos a mediadores locais e sistêmicos pode favorecer o aparecimento de subpopulações com diferentes fenótipos e capacidade de atender às demandas, orientando a resposta de defesa e a evolução da doença.

A inserção dos neutrófilos no contexto da patogênese da aterosclerose aumentou a complexidade das interações celulares na doença arterial coronariana e acidente vascular encefálico. A noção emergente do papel dos neutrófilos na disfunção endotelial e em praticamente todas as etapas do processo aterosclerótico, justifica pesquisas com o objetivo de identificar subpopulações celulares, bem como marcadores preditivos de risco cardiovascular e gravidade da doença aterosclerótica associados a essas células.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Quantificar e caracterizar os neutrófilos e seus produtos no sangue periférico de pacientes com doença arterial coronariana (DAC) e controles com e sem fatores de risco para DAC.

2.2 Objetivos Específicos

1. Caracterizar os neutrófilos circulantes quanto a expressão de moléculas de adesão (CD16, CD11b, CD18, CD49d, CD177 e ICAM-1) e receptores de quimiocinas (CXCR1, CXCR2, CCR5, CXCR4), por citometria de fluxo.
2. Determinar a concentração plasmática de elastase, MPO, NGAL, IL-8 e em pacientes com doença arterial coronariana e comparar os resultados com indivíduos controles com e sem fatores de risco para DAC.
3. Determinar a concentração plasmática de dsDNA (medida indireta da formação de NETs) no plasma de pacientes com doença arterial coronariana e comparar os resultados com indivíduos controles com e sem fatores de risco para DAC.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Caracterização dos grupos experimentais

Dentre os pacientes dos Ambulatórios da Disciplina de Cardiologia e da Unidade Coronariana do Hospital das Clínicas da UNICAMP e do Hospital do Coração de Campinas, foram selecionados homens e mulheres com idade variando entre 30 e 80 anos para a formação de quatro grupos distintos a serem analisados.

Grupo I (Controle) – Indivíduos sem doença coronária e sem fatores de risco para aterosclerose compõem o grupo controle, de mesma média de idade que os demais analisados (grupos II, III e IV).

Grupo II (Fator de Risco) – Pacientes sem doença coronária com fatores de risco para aterosclerose: pacientes sem história de doença coronariana, sem antecedentes familiares de primeiro grau ou com teste de isquemia negativo ou com cinecoronariografia sem lesões obstrutivas acima de 50% da luz. Os pacientes apresentaram pelo menos um fator de risco dentre os quais: hipertensão, definida como uma pressão arterial em repouso $\geq 140 \times 90$ mmHg ou o uso de medicamentos anti-hipertensivos; dislipidemia, caracterizada por LDL ≥ 130 mg/dL e/ou o uso de medicação para baixar o colesterol; diabetes, glicose em jejum ≥ 126 mg/dL, hemoglobina glicada $> 6.5\%$ ou uso de hipoglicemiante e tabagismo, uso contínuo de cigarro, nos últimos 2 anos.

Grupo III (Doença Coronariana Crônica) – Pacientes com doença coronária estabelecida crônica: doença coronariana documentada através de cateterismo cardíaco com pelo menos uma artéria coronária envolvida com obstrução acima de 50% da luz, teste de isquemia positivo, história prévia documentada de síndrome isquêmica aguda (laboratorial ou eletrocardiograficamente) ou revascularização cirúrgica, sem episódios de eventos agudos ou mudança na classe funcional nos últimos seis meses.

Grupo IV (Síndrome Coronariana Aguda) - Pacientes com síndromes coronárias agudas com ou sem supradesnível de segmento ST: história de síndrome coronária instável definida como pelo menos um episódio de angina de repouso durando mais que 20 minutos nas 24 horas anteriores com alterações dinâmicas de

segmento ST $\geq$ 1mm, angina com hipotensão ou edema pulmonar e/ou elevação de marcadores cardíacos.

Para os quatro grupos, os seguintes critérios de exclusão foram considerados:

- a. Gravidez
- b. Doença valvar significativa
- c. Cirurgia ou trauma nas últimas 4 semanas
- d. Doença inflamatória aguda ou uso de imunossupressores nas últimas duas semanas
- e. Neoplasias
- f. Insuficiência cardíaca congestiva ou miocardiopatia dilatada avançada.

Os grupos Controle, Fator de Risco e Doença Coronariana Crônica foram selecionados no ambulatório de cardiologia do Hospital de Clínica e os pacientes do grupo Síndrome Coronariana Aguda foram selecionados no Hospital de Coração de Campinas, a coleta de sangue foi realizada dentre as 24 horas do evento.

3.2 Cálculo amostral

Baseando-se no trabalho de Kafkas *et al* (2012) (79) que avaliou as concentrações séricas de NGAL em pacientes com manifestações clínicas distintas de DAC e controles, estimamos o número de 33 pacientes em cada grupo, com total de 132 pacientes necessários para se observar diferença entre eles. Este número nos permitiria a detecção de uma diferença estimada absoluta de 10% entre os grupos com um poder de 0,8 e erro alfa de 0,05 (cálculo utilizando Hintze, J 2011. PASS 11. NCSS, LLC. Kaysville, EUA).

3.3 Procedimentos gerais

Todos os indivíduos selecionados e que aceitaram participar do estudo mediante a assinatura do termo consentimento livre e esclarecido (aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa-Unicamp, parecer número CAAE

50871215.8.0000.5404) tiveram os seus dados clínicos/epidemiológicos levantados: nome, idade, sexo, presença de fatores de risco para doença coronária (diabetes, dislipidemia, hipertensão arterial e antecedente familiar). Os pacientes também tiveram a medida da circunferência abdominal coletada com fita métrica não elástica. Os pacientes foram submetidos à punção venosa de 20 mL de sangue periférico, realizada por pessoa devidamente habilitada em tubo contendo heparina sódica e tubo de EDTA. Além disso, os pacientes também foram encaminhados para coleta de sangue periférico em jejum a fim de realizar exames de hemograma, perfil lipídico, proteína C reativa (PCR) e glicemia.

3.4 Cálculo da relação Neutrófilos/Linfócitos (NLR)

O hemograma foi realizado em contador XZ 500 Sysmex (Roche) e o número absoluto de linfócitos e neutrófilos foi utilizado para o cálculo de NLR (19, 20, 80), conforme a fórmula abaixo:

$$NLR = \frac{n^{\circ} \text{ absoluto de neutrófilos}}{n^{\circ} \text{ absoluto de linfócitos}}$$

3.5 Detecção de mediadores inflamatórios por ELISA

As amostras de plasma foram utilizadas para a determinação da concentração de MPO, Elastase Neutrófila (EN), IL-8, NGAL (Human Lipocalin-2/NGAL) e MMP-9 por ELISA, de acordo com as instruções do fabricante (Duo Set – R&D Systems, EUA).

3.6 Obtenção dos leucócitos do sangue periférico

O sangue periférico dos diferentes grupos de pacientes e dos grupos controle foi coletado (10 mL) em tubos contendo heparina sódica. Para remoção das hemácias, 2 mL de sangue total foi incubado com 10 mL de tampão de lise (NaCl 10mM; MgCL2 5mM; Tris-HCL 10mM) por 10 minutos seguido de centrifugação a 300 G durante 10 minutos a 24°C. O *pellet* de leucócitos foi ressuspensionado em 100

mL de tampão PBS-BSA-A (PBS-BSA 0,1%; azida sódica 0,2mM) e submetidos à caracterização fenotípica por citometria de fluxo.

3.7 Citometria de fluxo para análise dos neutrófilos

Os leucócitos (50µL) periféricos obtidos conforme descrito no item anterior foram distribuídos em placa de 96 cavidades com fundo U. Para a caracterização das diferentes populações de neutrófilos foi adicionado um conjunto de anticorpos para moléculas de adesão (anti-CD16, anti-CD11b, anti-CD18, anti-CD177, anti-CD49d e anti-ICAM-1) e receptores de quimiocinas (anti-CXCR1, anti-CXCR2, anti-CCR5 e anti-CXCR4), todos da Biolegend (San Diego, CA, EUA). Os anticorpos foram diluídos em 20 µL de PBS-BSA-A seguido de incubação por 30 minutos a 24°C no escuro. Após este período foram adicionados 150 µL de PBS-BSA-A com posterior centrifugação a 10 minutos a 300 G a 24°C. O sobrenadante foi desprezado, as células ressuspendidas (vórtex), com adição de 200 µL de PBS-BSA-A, seguido de nova centrifugação (10 minutos a 300 G, 24°C). Em seguida as células foram ressuspendidas novamente e adicionado 200 µL de formaldeído 2% seguido de incubação à temperatura ambiente por 20 minutos. Após o tempo de incubação as células foram transferidas para tubos apropriados e o volume completado para 300 µL. A leitura foi realizada no equipamento FACSVerse (BD Bioscience – San Diego, EUA) e os resultados foram analisados pelo programa FlowJo, LLC, versão 10 (Ashland, EUA), sendo avaliada a porcentagem e a intensidade média de fluorescência (IMF) das células marcadas.

3.8 Quantificação de dsDNA no plasma

O sangue periférico dos diferentes grupos de pacientes e dos grupos controle foi coletado (10 mL) em tubos contendo EDTA. As amostras foram centrifugadas a 300 G por 15 minutos a 24°C para a separação do plasma. Posteriormente o DNA de dupla fita (dsDNA) foi quantificado utilizando o kit para detecção de dsDNA Quant-iT PicoGreen (Invitrogen), de acordo com as recomendações do fabricante. O padrão de λ-DNA fornecido com o kit (100µg/mL) foi diluído com Tris-EDTA (tampão TE) para a concentração de 1ng/mL para a curva de alta amplitude. As placas foram incubadas à temperatura ambiente no escuro por 5

minutos antes da leitura em leitor de placa de fluorescência Spectra Max M2 (Molecular Devices) com comprimento de onda de excitação de 480 e comprimento de onda de emissão de 520 nm. Os valores obtidos foram correlacionados a concentração plasmática de mieloperoxidase e elastase neutrofílica dosadas por ELISA.

3.9 Análise estatística

Para análise estatística foi utilizado o Programa GraphPad Prism, versão 5 para Windows (San Diego, Califórnia, EUA). A verificação da distribuição normal das variáveis quantitativas foi feita pelos testes de Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk. As variáveis contínuas que apresentaram distribuição não normal foram expressas em mediana e foram analisadas pelos testes de Mann-Whitney para comparação de dois grupos independentes ou Kruskal-Wallis para 3 ou mais grupos. Correlações entre duas variáveis foram calculadas por coeficientes de correlação de Spearman. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando a probabilidade foi menor que 5% ($p < 0,05$).

4 RESULTADOS

4.1 Caracterização dos grupos de estudo

Seguindo os critérios descritos no item 3.1, após a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) o sangue periférico de 87 pacientes foi coletado, sendo 15 do grupo controle (grupo I), 33 do grupo fator de risco (grupo II), 33 do grupo Doença Coronariana Crônica (grupo III) e 20 do grupo Síndrome Coronariana Aguda (grupo IV). As características clínicas e laboratoriais dos grupos estudados, descritas na tabela 1, foram informadas pelos pacientes no momento da coleta de sangue e obtidas a partir dos prontuários médicos.

Tabela 1. Parâmetros clínicos e laboratoriais dos pacientes dos grupos experimentais.

	Grupo I Controle	Grupo II Fator de Risco	Grupo III DCC	Grupo IV SCA	Valor de p
Número de Pacientes	15	33	33	20	
Idade (média ± DP)	53,9 ± 6,5	56,5 ± 6,6	62 ± 7,5 ^{A,B}	58,4 ± 9,6	0,0088
Sexo (Homem/Mulher)	9/6	22/11	25/8	14/6	
IMC	24,4 ± 1,5	29,5 ± 4,7 ^A	27,9 ± 5,1	26,2 ± 3,7	0,0012
Fatores de risco para doenças vasculares (%)					
Hipertensão	0	64,5	75	89,5	<0,001
Diabetes	0	22,6	37,5	31,6	0,078
Tabagismo	0	47,2	35,2	17,6	0,207
Dislipidemia	0	54,8	79,2	84,2	<0,001
Medicações (%)					
Anti-hipertensivo	0	51,6	75	57,9	<0,001
Estatinas	0	29	83,3	36,8	<0,001
Exames Laboratoriais					
Triglicérides (mg/dL)	111 [54, 149]	157,9 [109,3, 192,3]	187 [120, 232] ^A	243,7 [113, 332] ^A	0,0186
Colesterol Total (mg/dL)	190,6 ± 20,7	195,4 ± 53,5	182,1 ± 39,8	169,1 ± 42,8	0,1913
HDL-C (mg/dL)	57 [41, 64]	46,5 [38,2, 54,7]	48,7 [34, 49]	37,8 [31,2, 41,7] ^A	0,0051
LDL-C (mg/dL)	107,2 ± 25,1	113,4 ± 40	106,4 ± 39	95,5 ± 33,9	0,2906
Glicemia (mg/dL)	88,6 [84,5, 91,5]	104,6 [91, 111] ^A	115,7 [92, 118] ^A	115 [83, 109,8]	0,0015
Leucócitos (x 10³µL)	5,5 ± 1,4	6,6 ± 1,3	6,9 ± 1,3 ^A	7 ± 1,6 ^A	0,0305
Neutrófilos (x 10³µL)	3,2 ± 1	3,7 ± 1	4,1 ± 1 ^A	4,1 ± 1,3	0,0163
Linfócitos (x 10³µL)	1,8 [1,3, 2,3]	1,9 [1,5, 2,3]	2,1 [1,7, 2,2]	2 [1,5, 2,5]	0,5923
NLR	1,9 [1,25, 2,6]	2,2 [1,4, 2,4]	2 [1,6, 2,4]	2,1 [1,6, 2,6]	0,8575
PCR (mg/L)	1,2 [0,5, 1,7]	3,2 [1,1, 5,1]	4,3 [0,7, 6,5]	1,7 [0,7, 2,4]	0,0527

IMC – Índice de massa corpórea; HDL-C – Lipoproteína de alta densidade; LDL-C – Lipoproteína de baixa densidade; NLR – Relação Neutrófilos por Linfócitos; PCR – Proteína C Reativa. Dados contínuos normais apresentados como média (desvio padrão), para dados não normais apresentado como mediana [intervalo interquartil]. A ANOVA unidirecional foi seguida pelo teste post hoc de Bonferroni ou pelo teste de Kruskal-Wallis, que foi seguido pelo teste post hoc de Mann-Whitney para as análises das variáveis distribuídas normalmente ou não normalmente. O qui-quadrado foi utilizado para as análises das variáveis categóricas. Todos os valores de p para comparações intergrupos de variáveis não normais e categóricas foram corrigidos por Bonferroni.

A – p < 0,005 em relação ao controle; B- p < 0,005 em relação ao Fator de Risco; C – p < 0,005 em relação a Doença Coronariana Crônica.

Encontramos diferença significativa entre os grupos estudados quanto à idade e ao índice de massa corpórea. Em relação à idade, podemos observar que o grupo III apresenta média de idade maior em relação aos grupos I e II. No entanto, ao observar o índice de massa corpórea observamos diferença significativa no grupo II em relação ao I.

O fator de risco para desenvolvimento de doença aterosclerótica mais frequente nos grupos II, III e IV foi a hipertensão (64,5%, 75%, 89,5%, respectivamente). A dislipidemia foi o segundo fator de risco mais frequentes nos grupos II, III e IV. Para a classificação de dislipidemia foram utilizados os valores referenciais do perfil lipídico constantes na V Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose (81), caracterizada por LDL $\geq$ 130mg/dL e/ou bem como aqueles que fazem o uso de estatina foram classificados como portadores de dislipidemia.

Os medicamentos em uso foram agrupados em anti-hipertensivos e estatinas. Medicamentos das classes de bloqueadores do receptor de angiotensina, inibidores da enzima conversora de angiotensina, β -bloqueadores e bloqueadores de canal de cálcio foram agrupados como anti-hipertensivos, enquanto que o grupo das estatinas incluíram os diferentes tipos de estatina. O uso de anti-hipertensivos e estatinas foi maior nos indivíduos do grupo III (75% e 83,3%, respectivamente) e grupo IV (57,9% e 36,8%, respectivamente). Os indivíduos do grupo controle não faziam uso de nenhum destes medicamentos.

Com relação aos exames laboratoriais, quando analisado o perfil lipídico encontramos diferença significativa entre grupos nas concentrações séricas de triglicérides, e HDL colesterol. O grupo IV apresenta concentração plasmática significativamente maior de triglicérides quando comparado ao grupo I. O maior nível de HDL-C foi encontrado no grupo controle apresentando diferença significativa comparado ao grupo síndrome coronariana aguda.

Ao analisar a glicemia de jejum, encontramos diferença significativa entre os grupos II e III comparado ao grupo controle.

Nos parâmetros hematológicos encontramos diferença significativa apenas em relação ao número absoluto de neutrófilos, observamos um aumento

no grupo doença coronariana crônica em relação ao controle. Ao analisar o número de leucócitos totais, parâmetro esse reconhecido como marcador inflamatório e preditor de eventos cardiovasculares (82), encontramos diferença significativa nos grupos doença coronariana crônica e síndrome coronariana aguda em relação ao grupo controle.

Não encontramos diferença significativa em relação aos outros marcadores inflamatórios utilizados para avaliar risco cardiovascular, tais como a Proteína C Reativa e a Relação Neutrófilo/Linfócito (NLR).

4.2 Avaliação das populações de neutrófilos por citometria de fluxo

4.2.1 Estratégia para análise das subpopulações de neutrófilos

Primeiramente foi realizado um dot-plot, que mostra os eventos de acordo com o tamanho celular, o *Forward Scatter* (FSC), para parâmetros altura (H) versus área (A) (FSC-H X FSC-A), seguido de um dot-plot de altura de dispersão lateral (SSC-H) versus área de dispersão lateral (SSC-A). Tal estratégia tem por finalidade a eliminação dos *doublets*, ou seja, células aderidas uma a outra formando duplas, provavelmente devido às etapas de centrifugação realizadas durante o processamento das amostras.

Posteriormente foi gerado um gráfico do tipo dot-plot, no qual a população de neutrófilos foi determinada de acordo com as suas características de tamanho (FSC) e granulosidade (SSC). Para a avaliação da expressão de moléculas de adesão e receptores de quimiocinas foi gerado um novo gráfico, no qual foi delimitada um *gate* baseado na expressão positiva de CD16 e negativa de CD49d (**Fig. 1**).

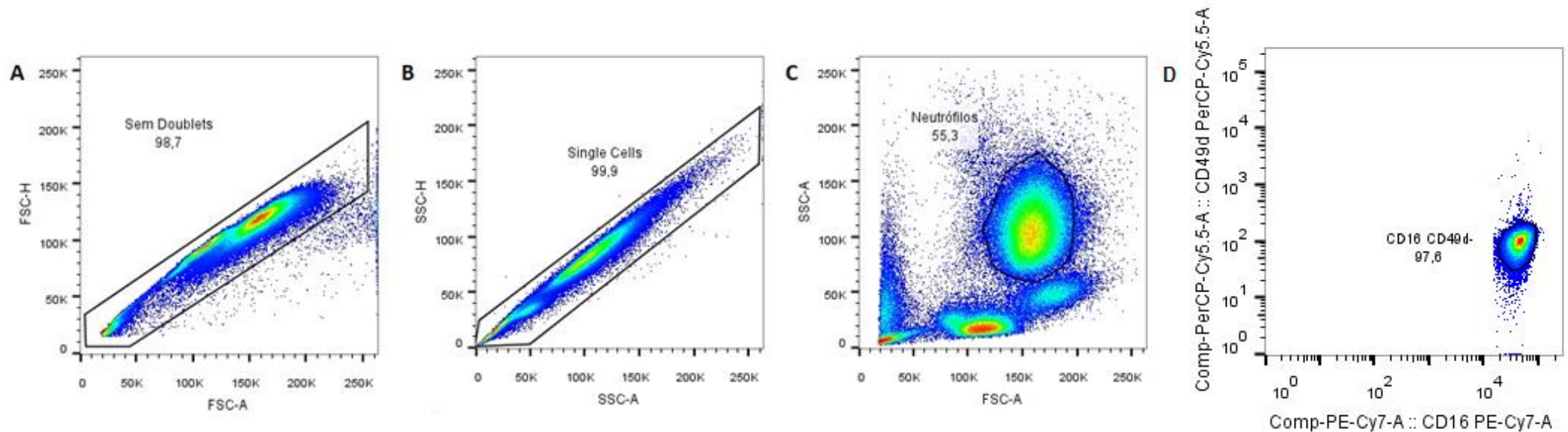


Figura 1. Figura 2. Estratégia para a análise das subpopulações de neutrófilos do sangue total. **A)** Em um primeiro momento, para retirada de células agrupadas (doublets) foi gerado um gráfico do tipo dot-plot no qual foi delimitado um gate para as células isoladas (sem doublets), **B)** seguido de um dot plot (SSC-H X SSC-A) para uma segunda retirada de células agrupadas, para isso foi delimitado um gate Single Cells. **C)** foi gerado um gráfico do tipo dot-plot, no qual a população de neutrófilos foi determinada de acordo com as suas características de tamanho (FSC) e granulosidade (SSC). **D)** A partir desse gráfico foi gerado outro dot-plot, no qual foi avaliada a marcação dos neutrófilos com o anticorpo anti-CD16 e anti-CD49d, sendo então delimitada a população de neutrófilos CD16+CD49d-.

4.2.2 Moléculas de adesão

O processo inflamatório que ocorre durante a formação e progressão da lesão aterosclerótica é caracterizado pela ativação de leucócitos que passam a expressar maiores concentrações de moléculas de adesão como o complexo CD11b/CD18 em sua superfície (82). Em nosso estudo verificamos uma maior expressão (Intensidade Média de Fluorescência - IMF) da integrina CD11b em indivíduos com fatores de risco para aterosclerose, assim como pacientes com DCC e SCA em relação ao grupo controle (**Fig. 2A**). Entretanto, não foram encontradas diferenças significativas quanto a expressão de CD18 entre os grupos estudados **Fig. 2B**).

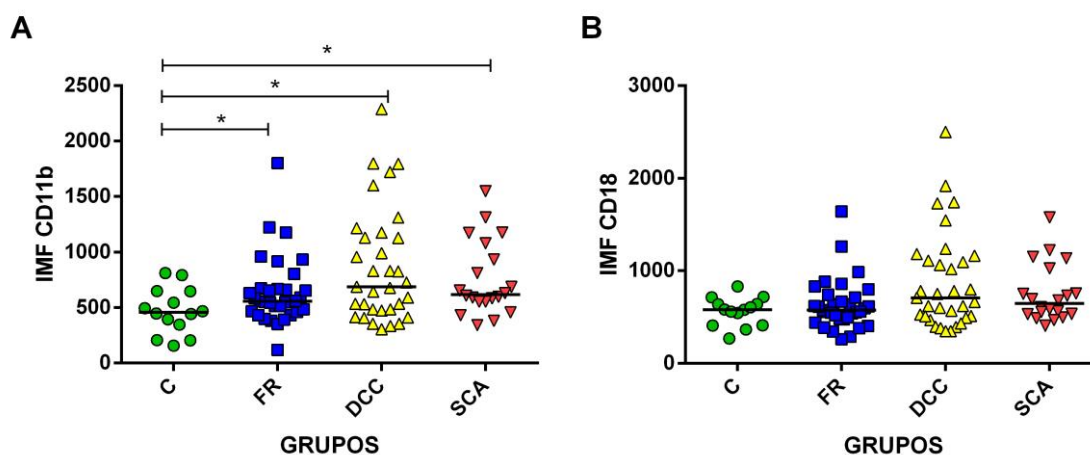


Figura 3. Intensidade Média de Fluorescência (IMF) das integrinas CD11b (**A**) e CD18 (**B**) em neutrófilos dos pacientes com Doença Coronariana Crônica (DCC, n=33), Síndrome Coronariana Aguda (SCA, n=20) e controles com (FR, n=33) e sem (C, n=15) fatores de risco para aterosclerose. As barras horizontais representam a mediana. Kruskal-Wallis, com pós teste de Dunn.

A molécula de adesão intracelular-1 (ICAM-1, CD54) é uma glicoproteína de transmembrana expressa na superfície celular de células endoteliais e epiteliais, células musculares lisas vasculares e leucócitos como os neutrófilos (83).

Constatamos um aumento significativo na frequência de neutrófilos CD54+ nos indivíduos com DCC em relação ao grupo controle (**Fig. 3**).

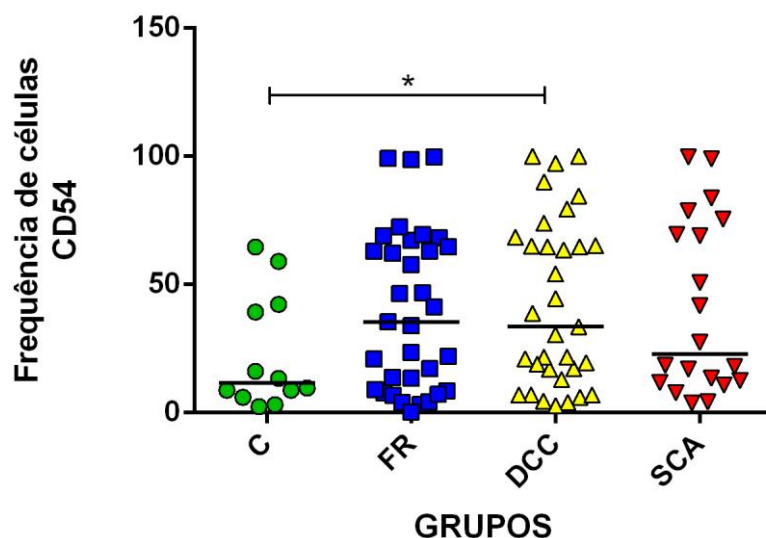


Figura 4. Frequência de neutrófilos CD54+ no sangue periférico de pacientes com Doença Coronariana Crônica (DCC, n=33), Síndrome Coronariana Aguda (SCA, n=20) e controles com (FR, n=33) e sem (C, n=15) fatores de risco para aterosclerose. As barras horizontais representam a mediana. Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn.

Em humanos, a glicoproteína CD177 (NB1) é exclusivamente expressa na superfície dos neutrófilos e regula a transmigração através do endotélio por meio da interação com a molécula de adesão PECAM-1 (84). A expressão ou não deste marcador define subpopulações de neutrófilos CD177+ e CD177-.

Quando avaliamos neutrófilos quanto a expressão de CD177 verificamos uma maior porcentagem de células CD177+ em todos os grupos estudados com mediana variando de 64 – 78% (**Fig. 4A**). Neutrófilos CD177- também foram detectados, embora em frequências menores (mediana de 21 – 35%) (**Fig. 4B**).

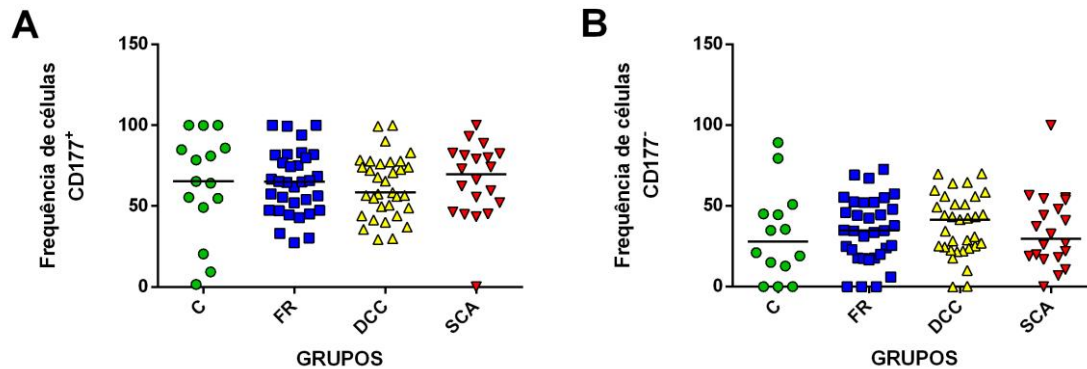


Figura 5. Frequência de neutrófilos CD177+ **(A)** e CD177- **(B)** no sangue periférico de pacientes com Doença Coronariana Crônica (DCC, n=33), Síndrome Coronariana Aguda (SCA, n=20) e controles com (FR, n=33) e sem (C, n=15) fatores de risco para aterosclerose. As barras horizontais representam a mediana. Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn.

Por outro lado, a avaliação da IMF mostrou maior expressão de CD177 em pacientes com DCC, embora tenha havido diferença significativa apenas em relação ao grupo FR (**Fig. 5**).

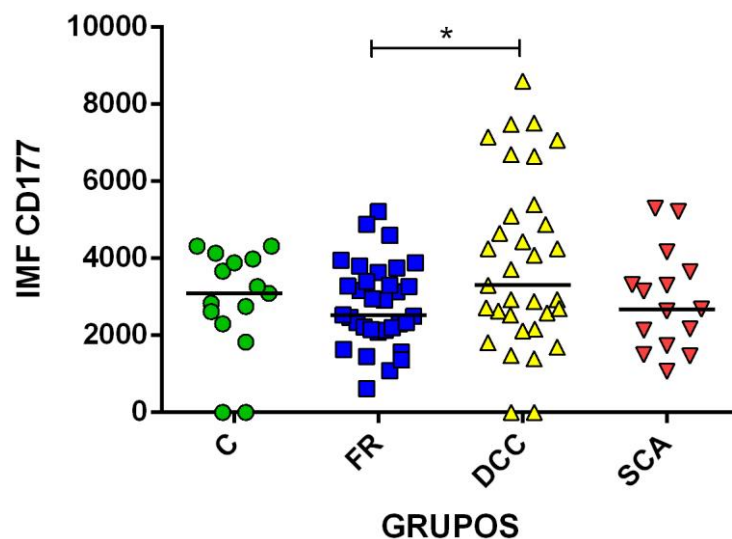


Figura 6. Intensidade Média de Fluorescência (IMF) de CD177 em neutrófilos dos pacientes com Doença Coronariana Crônica (DCC, n=33), Síndrome Coronariana Aguda (SCA, n=20) e controles com (FR, n=33) e sem (C, n=15) fatores de risco para aterosclerose. As barras horizontais representam a mediana. Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn. * $p < 0,05$

4.2.3 Receptores de Quimiocinas

As quimiocinas CCL3 derivada de macrófagos e CCL5 derivada de plaquetas parecem ter um importante papel no recrutamento de neutrófilos por meio da ligação de seus receptores CCR1, CCR3 e CCR5 (85).

Em especial a expressão aumentada do receptor CCR5 é considerada como marcador de placa vulnerável (85). Em nosso estudo, observamos uma diferença significativa na frequência de neutrófilos CCR5+ no grupo DCC em relação aos pacientes controles (**Fig. 6**).

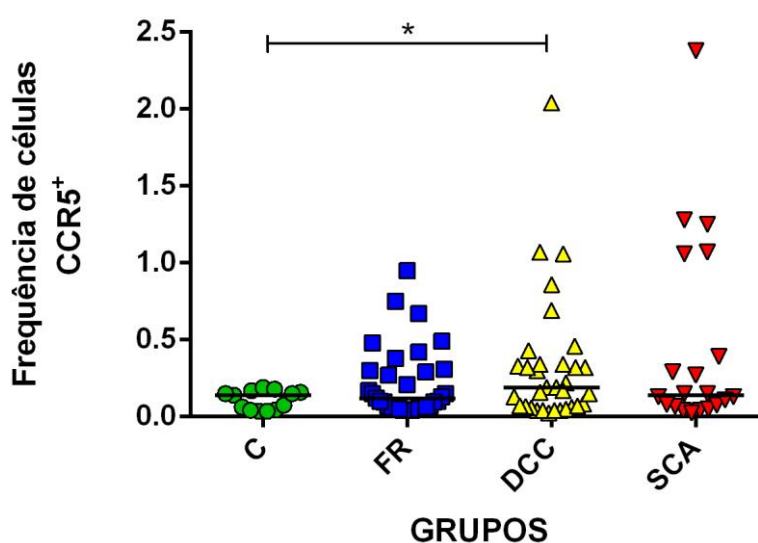


Figura 7. Frequência de neutrófilos CCR5+ no sangue periférico de pacientes com Doença Coronariana Crônica (DCC, n=33), Síndrome Coronariana Aguda (SCA, n=20) e controles com (FR, n=33) e sem (C, n=15) fatores de risco para aterosclerose. As barras horizontais representam a mediana. Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn.

A migração de neutrófilos é amplamente regulada pelo gradiente de concentração de quimiocinas CXC que contêm uma sequência de ácido glutâmico-leucina-arginina (ELR+) e são poderosos quimioatraentes destas células. A IL-8 é o membro mais importante da família CXC com alta afinidade para os receptores CXCR1 e CXCR2 que são co-expressos na membrana de neutrófilos. A ligação de IL-8 aos receptores CXCR1/2 é crucial para o recrutamento de neutrófilos (86).

A análise do receptor CXCR1 nos grupos estudados mostrou que pacientes com DCC apresentam uma menor frequência de neutrófilos CXCR1+ no sangue periférico comparado aos demais grupos, embora tenha sido observada diferença significativa apenas em relação ao grupo SCA (**Fig. 7**).

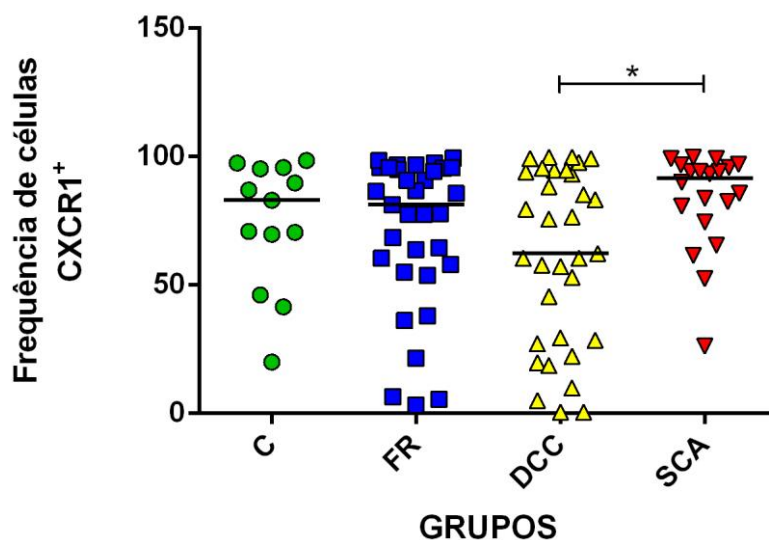


Figura 8. Frequência de neutrófilos CXCR1+ no sangue periférico de pacientes com Doença Coronariana Crônica (DCC, n=33), Síndrome Coronariana Aguda (SCA, n=20) e controles com (FR, n=33) e sem (C, n=15) fatores de risco para aterosclerose. As barras horizontais representam a mediana. Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn. * $p < 0,05$.

Por outro lado, para o receptor CXCR2 chama atenção a menor frequência de neutrófilos positivos nos indivíduos com fatores de risco para aterosclerose, em relação aos demais grupos, embora a diferença não tenha sido estatisticamente significativa (**Fig. 8**).

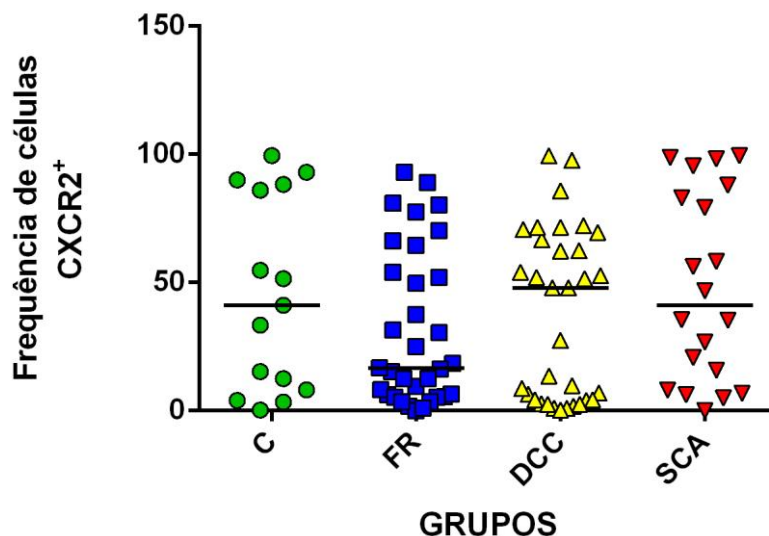


Figura 9. Frequência de neutrófilos CXCR2+ no sangue periférico de pacientes com Doença Coronariana Crônica (DCC, n=33), Síndrome Coronariana Aguda (SCA, n=20) e controles com (FR, n=33) e sem (C, n=15) fatores de risco para aterosclerose. As barras horizontais representam a mediana. Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn.

Em condições de hiperlipidemia, a concentração de CXCL12 na medula óssea e a expressão de CXCR4 são reduzidas, promovendo mobilização de neutrófilos e comprometendo o retorno de neutrófilos à medula óssea (25). A importância da retenção de neutrófilos dependente de CXCR4 foi demonstrada através da ruptura da interação CXCL12/CXCR4 em camundongos ateroscleróticos, o que leva à neutrofilia e aumento do tamanho da lesão aterosclerótica (87, 88).

Ao analisarmos a frequência de células CXCR4 positivas não encontramos diferença significativa entre os quatro grupos estudados (**Fig. 9**). Tampouco encontramos diferenças quando foi avaliada a IMF (dados não mostrados).

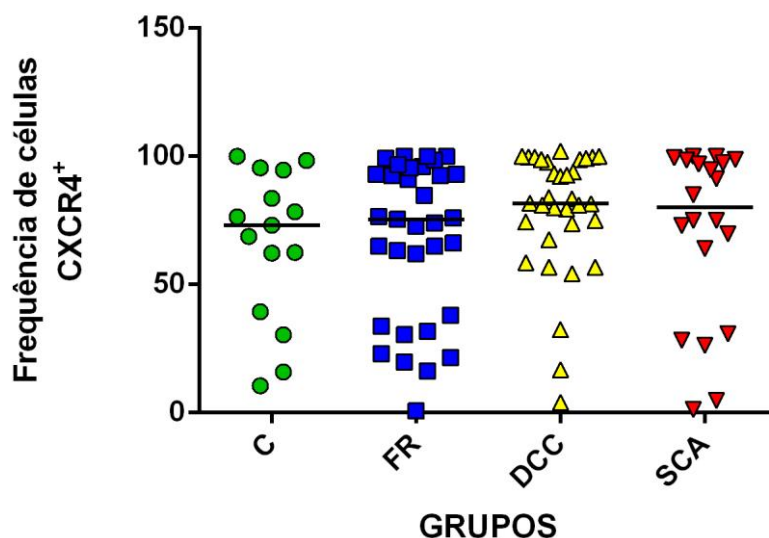


Figura 10. Frequência de células CXCR4⁺ de neutrófilos do sangue periférico nos diferentes grupos de estudo. Controle (C, n=15), Fator de Risco (FR, n=33), Doença Coronariana Crônica (DCC, n=33), Síndrome Coronariana Aguda (SCA, n=20). As barras horizontais representam a mediana. Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn.

Observamos que ambas as células CXCR4 e CXCR2 positivas, apresentavam um perfil de expressão diferente, com uma porção de células com alta expressão e uma outra com baixa expressão.

Os receptores CXCR4 e CXCR2 são descritos como receptores importantes na regulação da migração de neutrófilos na medula óssea, neutrófilos recentemente isolados expressam baixa concentração de CXCR4 e alta concentração de CXCR2 na membrana (CXCR2^{High} CXCR4^{Low}), enquanto que os neutrófilos senescentes, com aumentada capacidade de migração para a medula óssea, expressam altos níveis de CXCR4 e baixos de CXCR2 (CXCR4^{High} CXCR2^{Low}) (33).

Em nosso trabalho, observamos uma maior frequência de neutrófilos senescentes nos pacientes DCC em relação ao controle e SCA (**Fig. 10A**), por outro lado observamos frequência um pouco mais elevada de neutrófilos jovens no grupo controle em relação ao grupo DCC (**Fig. 10B**).

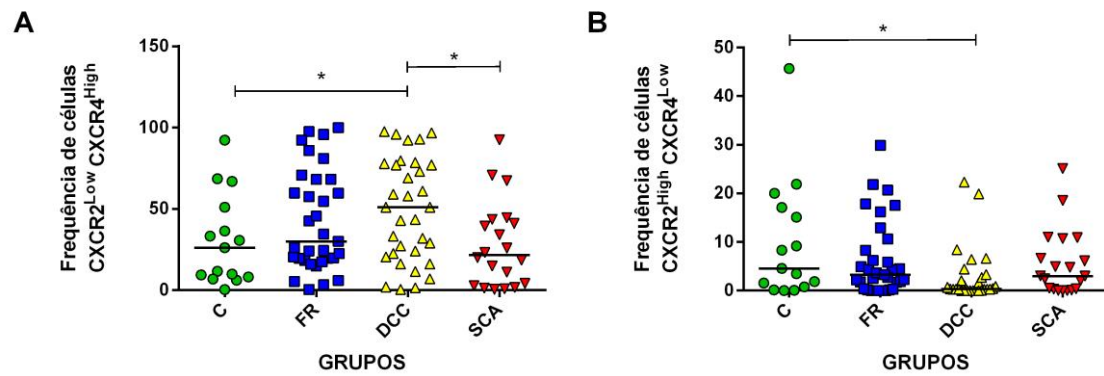


Figura 11. Frequência de células CXCR4^{High} CXCR2^{Low} **(A)** e CXCR4^{Low} CXCR2^{High} **(B)** de neutrófilos do sangue periférico nos diferentes grupos de estudo. Controle (C, n=15), Fator de Risco (FR, n=33), Doença Coronariana Crônica (DCC, n=33), Síndrome Coronariana Aguda (SCA, n=20). As barras horizontais representam a mediana. Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn.

4.3 Detecção de mediadores inflamatórios por ELISA

Após a caracterização fenotípica dos neutrófilos, passamos a avaliar as concentrações plasmáticas de seus produtos. Inicialmente quantificamos a MPO, enzima mais abundante dos neutrófilos armazenada nos grânulos azurófilos e marcador de inflamação e estresse oxidativo (40, 89). Constatamos concentrações plasmáticas mais elevadas de MPO em pacientes com DCC e SCA, assim como em indivíduos com fatores de risco para doença aterosclerótica em relação ao grupo controle (**Fig. 11**).

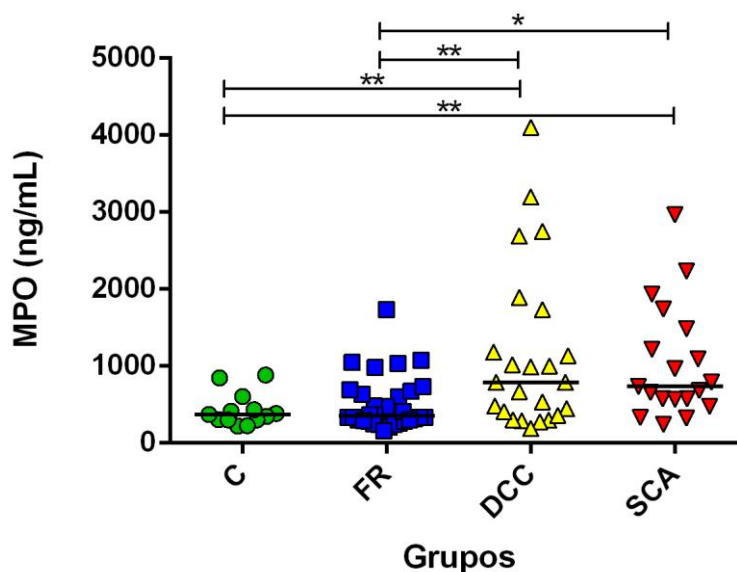


Figura 12. Concentração plasmática de mieloperoxidase (MPO) no plasma de pacientes com Doença Coronariana Crônica (DCC, n=33), Síndrome Coronariana Aguda (SCA, n=20) e controles com (FR, n=33) e sem (C, n=15) fatores de risco para aterosclerose. As barras horizontais representam a mediana. Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

A elastase neutrofílica (NE) está presente nas placas ateroscleróticas, onde contribui para a degradação da matriz e enfraquecimento da parede do vaso, associado à ruptura da placa (90). A análise das concentrações plasmáticas de NE mostrou o mesmo padrão da MPO, com elevação em pacientes com DCC e SCA, assim como em indivíduos com fatores de risco para doença aterosclerótica em relação ao grupo controle (**Fig. 12**).

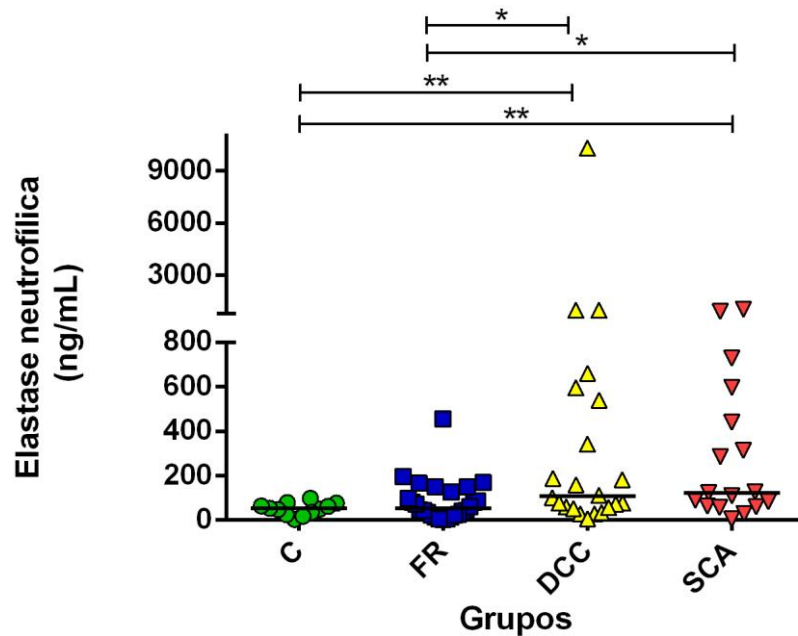


Figura 13. Concentração plasmática de Elastase neutrofílica (EN) no plasma de pacientes com Doença Coronariana Crônica (DCC, n=33), Síndrome Coronariana Aguda (SCA, n=20) e controles com (FR, n=33) e sem (C, n=15) fatores de risco para aterosclerose. As barras horizontais representam a mediana. Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Diferentemente da MPO e EN, produtos exclusivos de neutrófilos, a IL-8 é produzida por diferentes tipos celulares incluindo, além de neutrófilos, monócitos e macrófagos. Observamos diferença em relação a concentração plasmática de IL-8, a principal citocina responsável pelo recrutamento de neutrófilos (91), no grupo DCC em comparação ao Controle e ao grupo FR, $p < 0,01$, $p < 0,05$ respectivamente (**Fig. 13**).

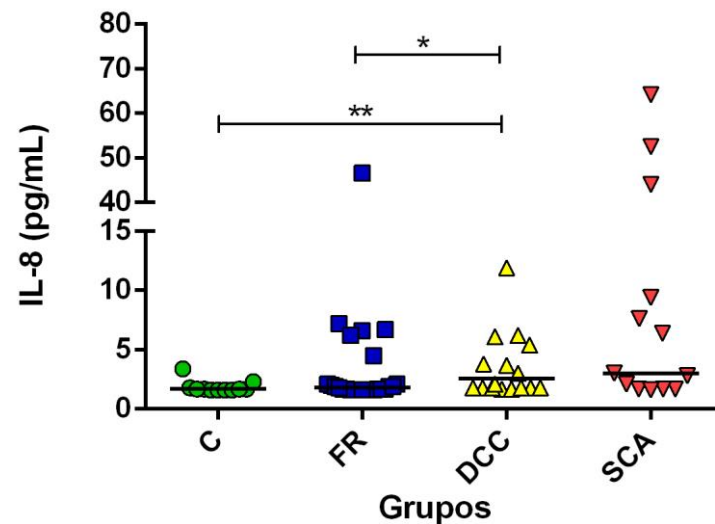


Figura 14. Concentração plasmática de IL-8 no plasma de pacientes com Doença Coronariana Crônica (DCC, n=33), Síndrome Coronariana Aguda (SCA, n=20) e controles com (FR, n=33) e sem (C, n=15) fatores de risco para aterosclerose. As barras horizontais representam a mediana. Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

A NGAL circulante reflete o grau de inflamação em pacientes com DAC (79). Em nosso estudo a concentração plasmática de NGAL foi mais elevada no grupo DCC em comparação ao grupo FR e ao controle. (**Fig. 14**).

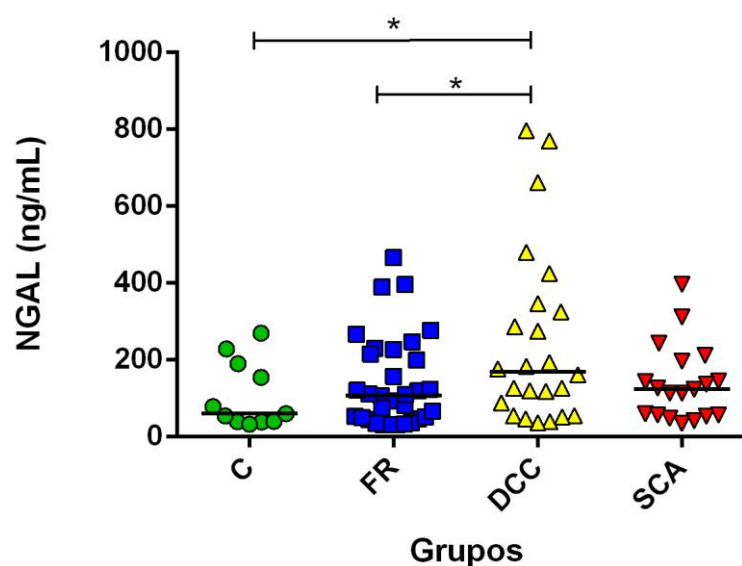


Figura 15. Concentração plasmática de NGAL no plasma de pacientes com Doença Coronariana Crônica (DCC, n=33), Síndrome Coronariana Aguda (SCA, n=20) e controles com (FR, n=33) e sem (C, n=15) fatores de risco para

aterosclerose. As barras horizontais representam a mediana. Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn. * $p < 0,05$

Outro potencial mecanismo pró-aterosclerótico da NGAL inclui a ligação à MMP-9 e a formação do complexo MMP-9 /NGAL, que protege a MMP-9 da inativação (92). Foi detectada diferença significativa em relação às concentrações plasmáticas de MMP-9 no grupo SCA em relação ao controle (Fig. 15).

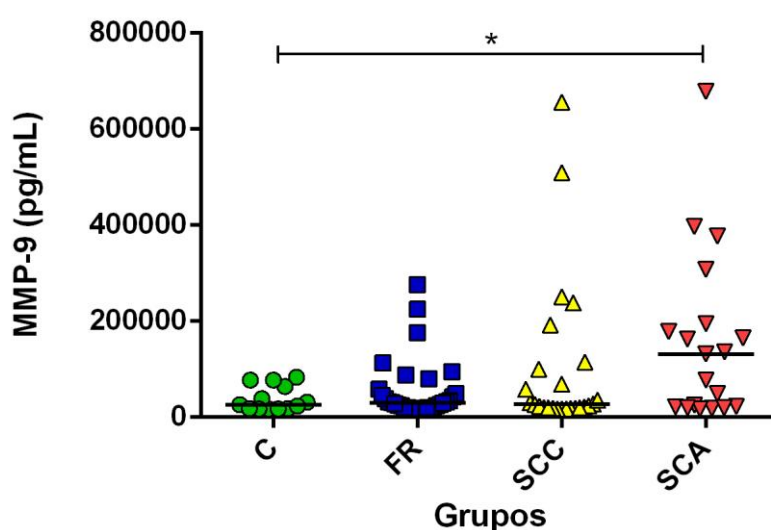


Figura 16. Concentração plasmática de MMP-9 no plasma de pacientes com Doença Coronariana Crônica (DCC, $n=33$), Síndrome Coronariana Aguda (SCA, $n=20$) e controles com (FR, $n=33$) e sem (C, $n=15$) fatores de risco para aterosclerose. As barras horizontais representam a mediana. Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn. * $p < 0,05$

4.4 Quantificação de dsDNA no plasma

Para quantificar o DNA liberado pelos neutrófilos durante o processo de formação de NETs utilizamos o kit de Picogreen e correlacionamos os valores obtidos com as concentrações plasmáticas de MPO e EN dosadas por ELISA.

Concentrações mais elevadas de DNA foram observadas no plasma de pacientes com SCC e indivíduos com fatores de risco para aterosclerose em relação ao grupo controle (Fig. 16).

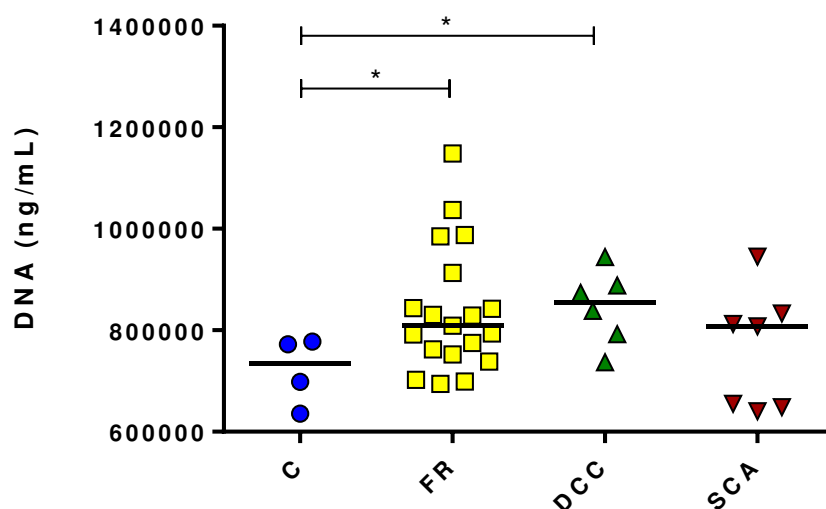


Figura 17. Concentração plasmática de dsDNA no plasma de pacientes com Doença Coronariana Crônica (DCC, n=6), Síndrome Coronariana Aguda (SCA, n=7) e controles com (FR, n=19) e sem (C, n=4) fatores de risco para aterosclerose. As barras horizontais representam a mediana. Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn. * $p < 0,05$

No grupo FR observamos haver uma correlação positiva moderada entre a concentração de DNA e elastase neutrofílica ($r=0,511$; $p=0,0005$) e uma correlação positiva alta entre a concentração de DNA e MPO ($r=0,725$; $p=0,01$).

Por outro lado, a análise de realizada no grupo com SCA mostrou uma correlação muito forte entre a concentração de DNA e elastase neutrofílica ($r=0,929$; $p=0,007$).

Não foram observadas correlações significativas entre os parâmetros no grupo DCC (**Tabela 2**).

Tabela 2. Correlação entre as concentrações de DNA, Elastase Neutrofílica e MPO nos diferentes grupos de pacientes (teste de Spearman)

	Grupo I C		Grupo II FR		Grupo III DCC		Grupo IV SCA	
Número de Pacientes	4		19		6		7	
	r	p	r	p	r	p	r	p
DNA x EN	0		0,511	0,026		NS	0,929	0,007
DNA x MPO	0		0,725	0,0005		NS	0,536	NS
EN x MPO	0		0,553	0,01		NS	0,536	NS

5 DISCUSSÃO

Nosso estudo teve como objetivo principal evidenciar a participação dos neutrófilos em diferentes estágios da doença arterial coronariana.

Inicialmente fenotipamos os neutrófilos com base nas moléculas de adesão que capacitam os neutrófilos a migrarem para sítios inflamatórios como as placas ateroscleróticas (93).

Nossos resultados mostraram um maior número absoluto de neutrófilos no grupo DCC em relação ao controle. Este aumento encontrado poderia indicar uma maior liberação destas células na circulação em resposta ao ambiente inflamatório sistêmico. Além disso, poderia ser um indicativo de agravamento da doença e complicações do quadro.

A fase inicial da aterosclerose envolve o recrutamento de células inflamatórias da circulação para a parede arterial (94, 95). Este processo é predominantemente mediado por moléculas de adesão celular, expressas no endotélio vascular e nos leucócitos circulantes. Duas das mais importantes moléculas de adesão, expressas exclusivamente por leucócitos, são CD11a/CD18 (LFA-1) e CD11b/CD18 (Mac-1 ou complemento-3), que pertencem à família das integrinas $\beta 2$ (96).

Os dados obtidos até o momento mostraram uma maior expressão da molécula CD11b em todos os grupos de pacientes em relação ao controle e uma maior frequência de neutrófilos CD54+ em pacientes com DCC. As moléculas de adesão capacitam os neutrófilos para migração para sítios inflamatórios como as placas ateroscleróticas (93).

A ligação de CD11b ativa múltiplas funções efetoras de neutrófilos, incluindo migração transendotelial, degranulação, fagocitose, produção de superóxido e explosão respiratória. Níveis elevados de CD11b de neutrófilos e status de ativação correlacionam-se positivamente com indicadores de gravidade da doença e desfechos adversos em estados agudos inflamatórios humanos (97).

No grupo DCC observamos também um aumento na frequência de neutrófilos CCR5+, outro forte indicativo dessas células estarem ativadas, uma vez que esse receptor que, juntamente com CXCR2 e CCR2, facilitam a adesão firme e a subsequente migração de neutrófilos (25).

Em estudo realizado por Drechsler e colaboradores foi demonstrado que a hipercolesterolemia induzida em camundongos Apo E-/- levou a um aumento no número de neutrófilos, além da migração a sítios inflamatórios, observado pela maior expressão do receptor CCR5 (25). Em concordância, em nosso estudo os pacientes do grupo DCC apresentaram maior número de neutrófilos, maior concentração de triglicérides, além da maior frequência de células CCR5+ no sangue periférico.

Também analisamos a expressão de CD177, uma glicoproteína de superfície com âncora GPI, exclusiva de neutrófilos. Estudos de imunoprecipitação e ligação, além de microscopia confocal demonstraram haver uma associação física entre CD177 e integrinas do tipo β -2, particularmente MAC-1 (CD11bCD18) (98).

Observamos uma maior expressão de CD177 em neutrófilos de pacientes com DCC em comparação aos controles. Não há nenhum relato a respeito da expressão desta molécula em neutrófilos de pacientes com aterosclerose, porém, a sua capacidade de ligação a PECAM-1 (97) e a células endoteliais estimuladas com citocinas ((99) sugere um papel na transmigração endotelial.

A molécula CD177 é expressa por uma proporção variável de neutrófilos humanos, mas a sua função ainda é pouco conhecida. Não encontramos diferenças quanto à frequência de células CD177+ e CD177- que variou de 64 a 78% e 21 a 35%, respectivamente, nos grupos estudados. Hu e colaboradores mostraram que a expressão de RNAm de genes que codificam proteínas granulares como PR3 e MPO é maior na população de neutrófilos que não expressa CD177 em controles saudáveis (100)

Como a expressão de CD177 em neutrófilos está aumentada em pacientes com infecções bacterianas graves, é possível que sob certas

condições inflamatórias, os subconjuntos de neutrófilos CD177+ possam infiltrar o tecido pela associação superfície celular PR3, o que poderia ser visto na aterosclerose.

Procuramos verificar a expressão conjunta de marcadores relacionados a algumas características fenotípicas, neutrófilos com capacidade migratória transendotelial reversa (ICAM-1^{hi} CXCR1^{low}) e neutrófilos senescentes (CXCR4^{high} CXCR2^{low}). Entretanto, até o momento observamos diferença significativa apenas em relação ao neutrófilos senescentes no grupo DCC em relação ao controle e ao SCA.

Diferenças funcionais foram observadas em neutrófilos humanos envelhecidos *in vitro*, mostrando degranulação e explosão respiratória reduzidos em comparação com neutrófilos recém-isolados. Além disso, um declínio nas habilidades quimiotáticas, fagocíticas e de mudança de forma poderia estar relacionado aos níveis crescentes de neutrófilos apoptóticos (101). Estes achados, entretanto, não foram confirmados em nosso estudo visto que o grupo DCC apresentou maior concentração plasmática de todos os grânulos.

Suratt e colaboradores forneceram evidências da existência de diferenças fenotípicas entre neutrófilos imaturos da medula óssea, neutrófilos circulantes e neutrófilos infiltrados em tecidos de camundongos *in vivo*. Em experimento no qual infundiram células radiomarcadas em camundongos verificaram que a localização das células foi governada pelo nível de maturidade e estado de ativação, com células situadas igualmente na medula óssea e fígado após 4h, enquanto neutrófilos de exsudato infiltradas em tecido foram direcionadas predominantemente para o fígado, presumivelmente por degradação. Neutrófilos derivados do sangue mostraram um fenótipo intermediário, posicionando-se entre esses dois locais. Além de fornecer evidências que a medula óssea é um local de não apenas liberação, mas também retenção subsequente de neutrófilos, os achados deste estudo demonstram a divergência no comportamento dos neutrófilos circulantes, conforme determinado pela idade e ativação das células (102).

O citoplasma de neutrófilos caracteriza-se pela presença de vários tipos de grânulos, primários, secundários e terciários. Os grânulos primários

contêm MPO, serina proteases como a catepsina G, EN, PR-3, protease de serina de neutrófilos-4 e azurocidina-1 e peptídeos antimicrobianos (proteína bactericida/aumento de permeabilidade, defensinas). A MPO, a catepsina G e a EN são os principais componentes proteicos dos grânulos primários (103).

A maioria dos estudos que avaliam a ação da MPO na doença cardiovascular enfoca o estágio inicial do processo. No entanto, estudos recentes enfatizam a ação moduladora da MPO sobre a cascata de proteases que participam das complicações agudas da aterosclerose e à vulnerabilidade da placa (104).

Concentrações plasmáticas elevadas de MPO predizem eventos cardíacos futuros em pacientes com SCA (100, 101). Yunoki e colaboradores verificaram que níveis elevados de MPO na admissão hospitalar estão associados à microcirculação miocárdica comprometida após implante de stent em pacientes com infarto agudo do miocárdio (105). Esses achados sugerem que MPO pode ser utilizada como biomarcador para estratificação de risco e escolha do tratamento nesses pacientes.

Zhang e colaboradores. (89) conduziram um estudo de caso-controle para determinar a associação entre os níveis de MPO e a prevalência de doença arterial crônica em 158 pacientes submetidos à cateterismo cardíaco com DAC estabelecida e 175 pacientes sem DAC angiograficamente significativa. Nos modelos multivariados, ajustados pelos fatores de risco tradicionais, escore de risco de Framingham e contagem de leucócitos, os níveis de MPO foram significativamente associados à presença de DAC.

Esses resultados corroboram com nossos achados de aumento na concentração plasmática de MPO nos grupos com doença arterial coronariana estabelecida (DCC e SCA) em comparação com o grupo controle e fator de risco.

A distribuição das concentrações plasmáticas de EN entre os grupos estudados foi semelhante a observada para MPO. O aumento encontrado nos pacientes com DAC, tanto no grupo DCC como SCA, estão de acordo com os resultados de outros estudos. Smith e colaboradores (106) mostraram que níveis plasmáticos elevados de EN podem ser utilizados como um preditor

independente de eventos cardiovasculares em pacientes com infarto agudo do miocárdio. Outros estudos também relataram que níveis elevados de EN plasmática foram observados em pacientes com várias doenças cardiovasculares (107-109). Além disso, a atividade da elastase sérica está associada à hipertensão sistólica e à rigidez arterial (110).

Em relação a NGAL observamos uma maior concentração plasmática no grupo DCC em comparação ao grupo controle e fator de risco. Outros estudos mostram que níveis séricos de NGAL são significativamente maiores em pacientes com DAC confirmada por angiografia em comparação com controles com artérias normais (111, 112). A NGAL pode desempenhar um papel no remodelamento vascular e na instabilidade das placas ateroscleróticas. A presença de NGAL foi documentada no meio vascular, tanto em sua forma livre como em um complexo com MMP-9. A formação de um complexo de NGAL e MMP-9 previne a degradação de MMP-9 e reforça sua atividade proteolítica que pode tomar parte na formação de uma placa aterosclerótica instável. Este complexo está localizado em placas ateroscleróticas e sua concentração aumentada foi detectada em placas com hematoma intramural e necrose central (113-116). O que não vai de acordo com nosso trabalho, pois ao analisarmos os níveis de MMP-9, encontramos diferença significativa no grupo SCA em relação ao controle.

Uma indicação adicional para infiltração de neutrófilos e seu envolvimento no desenvolvimento da lesão vem de estudos descrevendo a presença da IL-8 em lesões ateroscleróticas (117). A IL-8 é a quimiocina mais importante no recrutamento de neutrófilos para locais de inflamação. Em camundongos, as quimiocinas MIP-2 e KC, homólogas funcionais da IL-8 humana, mostraram estar relacionadas à extensão da aterosclerose (117).

Em nosso trabalho observamos uma maior concentração de IL-8 em pacientes do grupo DCC, o que está de acordo com um estudo de Kirk *et al.* que demonstraram aumento dos níveis de IL-8 em pacientes com doença oclusiva da artéria periférica (118). Porém ao observar a expressão dos receptores CXCR1 e CXCR2, encontramos diferença significativa na expressão de CXCR1+ no grupo SCA, o que não era esperado, já que o CXCR1 liga-se seletivamente

à IL-8 com alta afinidade, enquanto o CXCR2 se liga a uma série de quimiocinas CXC, incluindo IL-8 e Gro α (119-121).

A maior parte dos trabalhos relaciona os neutrófilos aos estágios mais tardios da aterosclerose e às complicações agudas. De fato, o exame de segmentos de artéria coronária obtidos por autópsia e amostras de endarterectomia de pacientes com angina instável confirma que a infiltração de neutrófilos é comum no interior de lesões culpadas em pacientes que tiveram um evento coronário agudo (90). Similarmente, o exame de placas de carótidas revelam que o alto conteúdo de neutrófilos está fortemente associado a lesões propensas à ruptura, sugerindo um papel para os neutrófilos na desestabilização da placa (122). Evidências para o envolvimento de neutrófilos na vulnerabilidade também foram obtidas de análises bioquímicas e imuno-histoquímicas de placas culpadas. Proteases específicas de neutrófilos ligadas a degradação de matriz como elastase, NGAL, MMP-9, CD66b e proteinase-3 todas colocalizadas em locais de hemorragia e positivamente correlacionado com a presença de complexos alfa-1-anti-tripsina/elastase, MPO e alfa-defensinas (114).

A elastase neutrofílica humana (EN) e a mieloperoxidase (MPO) são essenciais para a formação de NETs e ambas as enzimas são encontradas dentro de grânulos primários de neutrófilos em repouso (123-125). A EN cliva as histonas para revelar o DNA, processo auxiliado pela MPO e essencial para a formação de NETs (125).

Em nosso trabalho observamos uma forte correlação entre as concentrações de DNA-Elastase e DNA-MPO no plasma dos indivíduos com fatores risco para aterosclerose e entre DNA-Elastase nos pacientes com SCA. Podemos interpretar estes achados como evidência da participação dos neutrófilos em todas as etapas do processo aterosclerótico, com possível contribuição para o agravamento do quadro de inflamação e desestabilização da placa aterosclerótica.

Em conjunto os resultados mostraram indícios mais fortes da participação de neutrófilos nos pacientes com DCC, a saber, maior número absoluto de neutrófilos, maior expressão de CD11b e CD177 e maior frequência de células CD54+ e CCR5+, sugerindo um alto potencial migratório e atividade

inflamatória. Concentrações plasmáticas mais elevadas de mieloperoxidase, elastase neutrofílica, IL-8, NGAL e dsDNA também foram mais elevadas em pacientes com DCC, mostrando uma grande influência dos neutrófilos neste estágio da doença aterosclerótica.

6 CONCLUSÃO

Em conclusão os resultados sugerem a participação dos neutrófilos em todo processo aterosclerótico, não apenas no início e na ruptura da placa como descrito na literatura, mas também nos estágios de manutenção da doença.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Organization WH. Cardiovascular Diseases (CVDs) <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/2015> [cited 2015 08 set]. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/index.html>.
2. Ross R. Atherosclerosis is an inflammatory disease. *Am Heart J*. 1999;138(5 Pt 2):S419-20.
3. Fan J, Watanabe T. Inflammatory reactions in the pathogenesis of atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb*. 2003;10(2):63-71.
4. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*. 2002;420(6917):868-74.
5. Peluso I, Morabito G, Urban L, Ioannone F, Serafini M. Oxidative stress in atherosclerosis development: the central role of LDL and oxidative burst. *Endocrine, metabolic & immune disorders drug targets*. 2012;12(4):351-60.
6. Zhang DX, Gutterman DD. Mitochondrial reactive oxygen species-mediated signaling in endothelial cells. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2007;292(5):H2023-31.
7. Steinberg D. Low Density Lipoprotein Oxidation and Its Pathobiological Significance. *Journal of Biological Chemistry*. 1997;272(34):20963-6.
8. Smith JD, Trogan E, Ginsberg M, Grigaux C, Tian J, Miyata M. Decreased atherosclerosis in mice deficient in both macrophage colony-stimulating factor (op) and apolipoprotein E. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1995;92(18):8264-8.
9. Li AC, Glass CK. The macrophage foam cell as a target for therapeutic intervention. *Nat Med*. 2002;8(11):1235-42.
10. Lundberg AM, Hansson GK. Innate immune signals in atherosclerosis. *Clin Immunol*. 2010;134(1):5-24.
11. Ruf W, Ruggeri ZM. Neutrophils release brakes of coagulation. *Nat Med*. 2010;16(8):851-2.
12. Carbone F, Nencioni A, Mach F, Vuilleumier N, Montecucco F. Pathophysiological role of neutrophils in acute myocardial infarction. *Thromb Haemost*. 2013;110(3):501-14.
13. Mocsai A. Diverse novel functions of neutrophils in immunity, inflammation, and beyond. *J Exp Med*. 2013;210(7):1283-99.
14. Mantovani A, Cassatella MA, Costantini C, Jaillon S. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nature reviews Immunology*. 2011;11(8):519-31.

15. Hayashi F, Means TK, Luster AD. Toll-like receptors stimulate human neutrophil function. *Blood*. 2003;102(7):2660-9.
16. Kolaczowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nature reviews Immunology*. 2013;13(3):159-75.
17. Arbel Y, Finkelstein A, Halkin A, Birati EY, Revivo M, Zuzut M, et al. Neutrophil/lymphocyte ratio is related to the severity of coronary artery disease and clinical outcome in patients undergoing angiography. *Atherosclerosis*. 2015;225(2):456-60.
18. Aygün F, Efe D. Association of neutrophil/lymphocyte ratio with obstructive coronary artery disease and coronary artery calcium score detected by multislice computed tomography in type 2 diabetes mellitus patients. *Patient preference and adherence*. 2015;9:1023-31.
19. Duffy BK, Gurm HS, Rajagopal V, Gupta R, Ellis SG, Bhatt DL. Usefulness of an elevated neutrophil to lymphocyte ratio in predicting long-term mortality after percutaneous coronary intervention. *The American journal of cardiology*. 2006;97(7):993-6.
20. Verdoia M, Barbieri L, Giovine GD, Marino P, Suryapranata H, De Luca G. Neutrophil to Lymphocyte Ratio and the Extent of Coronary Artery Disease: Results From a Large Cohort Study. *Angiology*. 2015.
21. Kawaguchi H, Mori T, Kawano T, Kono S, Sasaki J, Arakawa K. Band neutrophil count and the presence and severity of coronary atherosclerosis. *American Heart Journal*. 2013;126(1):9-12.
22. Soehnlein O, Weber C, Lindbom L. Neutrophil granule proteins tune monocytic cell function. *Trends in immunology*. 2009;30(11):538-46.
23. Borregaard N, Sorensen OE, Theilgaard-Monch K. Neutrophil granules: a library of innate immunity proteins. *Trends in immunology*. 2007;28(8):340-5.
24. Soehnlein O. Multiple roles for neutrophils in atherosclerosis. *Circulation research*. 2012;110(6):875-88.
25. Drechsler M, Megens RT, van Zandvoort M, Weber C, Soehnlein O. Hyperlipidemia-triggered neutrophilia promotes early atherosclerosis. *Circulation*. 2010;122(18):1837-45.
26. Doring Y, Noels H, Mandl M, Kramp B, Neideck C, Lievens D, et al. Deficiency of the sialyltransferase St3Gal4 reduces Ccl5-mediated myeloid cell recruitment and arrest: short communication. *Circulation research*. 2014;114(6):976-81.
27. Sadik CD, Kim ND, Luster AD. Neutrophils cascading their way to inflammation. *Trends in immunology*. 2011;32(10):452-60.
28. Sanz MJ, Kubes P. Neutrophil-active chemokines in in vivo imaging of neutrophil trafficking. *European journal of immunology*. 2012;42(2):278-83.

29. Jurcevic S, Humfrey C, Uddin M, Warrington S, Larsson B, Keen C. The effect of a selective CXCR2 antagonist (AZD5069) on human blood neutrophil count and innate immune functions. *British journal of clinical pharmacology*. 2015;80(6):1324-36.
30. Nicholls DJ, Wiley K, Dainty I, MacIntosh F, Phillips C, Gaw A, et al. Pharmacological characterization of AZD5069, a slowly reversible CXC chemokine receptor 2 antagonist. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2015;353(2):340-50.
31. Joseph JP, Reyes E, Guzman J, O'Doherty J, McConkey H, Arri S, et al. CXCR2 Inhibition - a novel approach to treating CoronAry heart DiseAse (CICADA): study protocol for a randomised controlled trial. *Trials*. 2017;18(1):473.
32. Eash KJ, Means JM, White DW, Link DC. CXCR4 is a key regulator of neutrophil release from the bone marrow under basal and stress granulopoiesis conditions. *Blood*. 2009;113(19):4711-9.
33. Martin C, Burdon PC, Bridger G, Gutierrez-Ramos JC, Williams TJ, Rankin SM. Chemokines acting via CXCR2 and CXCR4 control the release of neutrophils from the bone marrow and their return following senescence. *Immunity*. 2003;19(4):583-93.
34. Eash KJ, Greenbaum AM, Gopalan PK, Link DC. CXCR2 and CXCR4 antagonistically regulate neutrophil trafficking from murine bone marrow. *The Journal of clinical investigation*. 2010;120(7):2423-31.
35. Rotzius P, Thams S, Soehnlein O, Kenne E, Tseng C-N, Björkström NK, et al. Distinct Infiltration of Neutrophils in Lesion Shoulders in ApoE^{-/-} Mice. *The American journal of pathology*. 177(1):493-500.
36. Barnathan ES, Raghunath PN, Tomaszewski JE, Ganz T, Cines DB, Higazi Aa-R. Immunohistochemical localization of defensin in human coronary vessels. *The American journal of pathology*. 1997;150(3):1009-20.
37. Hemdahl A-L, Gabrielsen A, Zhu C, Eriksson P, Hedin U, Kastrup J, et al. Expression of Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin in Atherosclerosis and Myocardial Infarction. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2006;26(1):136-42.
38. Edfeldt K, Agerberth B, Rottenberg ME, Gudmundsson GH, Wang X-B, Mandal K, et al. Involvement of the Antimicrobial Peptide LL-37 in Human Atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2006;26(7):1551-7.
39. Lee TD, Gonzalez ML, Kumar P, Chary-Reddy S, Grammas P, Pereira HA. CAP37, a Novel Inflammatory Mediator. *The American journal of pathology*. 160(3):841-8.
40. Schindhelm RK, van der Zwan LP, Teerlink T, Scheffer PG. Myeloperoxidase: A Useful Biomarker for Cardiovascular Disease Risk Stratification? *Clinical Chemistry*. 2009;55(8):1462-70.

41. Koenig W, Khuseyinova N. Biomarkers of Atherosclerotic Plaque Instability and Rupture. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2007;27(1):15-26.
42. van Leeuwen M, Gijbels MJ, Duijvestijn A, Smook M, van de Gaar MJ, Heeringa P, et al. Accumulation of myeloperoxidase-positive neutrophils in atherosclerotic lesions in LDLR-/- mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008;28(1):84-9.
43. Daugherty A, Dunn JL, Rateri DL, Heinecke JW. Myeloperoxidase, a catalyst for lipoprotein oxidation, is expressed in human atherosclerotic lesions. *The Journal of clinical investigation*. 1994;94(1):437-44.
44. Brennan ML, Penn MS, Van Lente F, Nambi V, Shishehbor MH, Aviles RJ, et al. Prognostic value of myeloperoxidase in patients with chest pain. *The New England journal of medicine*. 2003;349(17):1595-604.
45. Liu C, Desikan R, Ying Z, Gushchina L, Kampfrath T, Deilüis J, et al. Effects of a novel pharmacologic inhibitor of myeloperoxidase in a mouse atherosclerosis model. *PLoS One*. 2012;7(12):e50767.
46. Tkalecic J, Novelli M, Phylactides M, Iredale JP, Segal AW, Roes J. Impaired Immunity and Enhanced Resistance to Endotoxin in the Absence of Neutrophil Elastase and Cathepsin G. *Immunity*. 12(2):201-10.
47. Marino F, Tozzi M, Schembri L, Ferraro S, Tarallo A, Scanzano A, et al. Production of IL-8, VEGF and Elastase by Circulating and Intraplaque Neutrophils in Patients with Carotid Atherosclerosis. *PLOS ONE*. 2015;10(4):e0124565.
48. Dollery CM, Owen CA, Sukhova GK, Krettek A, Shapiro SD, Libby P. Neutrophil Elastase in Human Atherosclerotic Plaques: Production by Macrophages. *Circulation*. 2003;107(22):2829-36.
49. Lindberg S, Jensen JS, Mogelvang R, Pedersen SH, Galatius S, Flyvbjerg A, et al. Plasma Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin in the General PopulationSignificance. Association With Inflammation and Prognosis. 2014;34(9):2135-42.
50. Lindberg S, Pedersen SH, Mogelvang R, Jensen JS, Flyvbjerg A, Galatius S, et al. Prognostic Utility of Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin in Predicting Mortality and Cardiovascular Events in Patients With ST-Segment Elevation Myocardial Infarction Treated With Primary Percutaneous Coronary Intervention. *Journal of the American College of Cardiology*. 2012;60(4):339-45.
51. Yang D, de la Rosa G, Tewary P, Oppenheim JJ. Alarmins link neutrophils and dendritic cells. *Trends in immunology*. 30(11):531-7.

52. Soehnlein O, Weber C, Lindbom L. Neutrophil granule proteins tune monocytic cell function. *Trends in immunology*. 30(11):538-46.
53. Soehnlein O, Lindbom L, Weber C. Mechanisms underlying neutrophil-mediated monocyte recruitment. *Blood*. 2009;114(21):4613-23.
54. Taekema-Roelvink ME, Kooten C, Kooij SV, Heemskerk E, Daha MR. Proteinase 3 enhances endothelial monocyte chemoattractant protein-1 production and induces increased adhesion of neutrophils to endothelial cells by upregulating intercellular cell adhesion molecule-1. *J Am Soc Nephrol*. 2001;12(5):932-40.
55. Soehnlein O, Xie X, Ulbrich H, Kenne E, Rotzius P, Flodgaard H, et al. Neutrophil-derived heparin-binding protein (HBP/CAP37) deposited on endothelium enhances monocyte arrest under flow conditions. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2005;174(10):6399-405.
56. Mocatta TJ, Pilbrow AP, Cameron VA, Senthilmohan R, Frampton CM, Richards AM, et al. Plasma concentrations of myeloperoxidase predict mortality after myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*. 2007;49(20):1993-2000.
57. Tavakoli S, Asmis R. Reactive oxygen species and thiol redox signaling in the macrophage biology of atherosclerosis. *Antioxid Redox Signal*. 2012;17(12):1785-95.
58. Kolaczowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nature reviews Immunology*. 2013;13(3):159-75.
59. Warnatsch A, Ioannou M, Wang Q, Papayannopoulos V. Inflammation. Neutrophil extracellular traps license macrophages for cytokine production in atherosclerosis. *Science*. 2015;349(6245):316-20.
60. Fuchs TA, Brill A, Duerschmied D, Schatzberg D, Monestier M, Myers DD, Jr., et al. Extracellular DNA traps promote thrombosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(36):15880-5.
61. Saffarzadeh M, Juenemann C, Queisser MA, Lochnit G, Barreto G, Galuska SP, et al. Neutrophil extracellular traps directly induce epithelial and endothelial cell death: a predominant role of histones. *PLoS One*. 2012;7(2):e32366.
62. Branzk N, Papayannopoulos V. Molecular mechanisms regulating NETosis in infection and disease. *Seminars in immunopathology*. 2013;35(4):513-30.
63. Pertiwi KR, van der Wal AC, Pabittei DR, Mackaaij C, van Leeuwen MB, Li X, et al. Neutrophil Extracellular Traps Participate in All Different Types of Thrombotic and Haemorrhagic Complications of Coronary Atherosclerosis. *Thrombosis and haemostasis*. 2018;118(6):1078-87.
64. Gallin JI. Human neutrophil heterogeneity exists, but is it meaningful? *Blood*. 1984;63(5):977-83.

65. Scapini P, Marini O, Tecchio C, Cassatella MA. Human neutrophils in the saga of cellular heterogeneity: insights and open questions. *Immunological reviews*. 2016;273(1):48-60.
66. Scapini P, Cassatella MA. Social networking of human neutrophils within the immune system. *Blood*. 2014;124(5):710-9.
67. Galli SJ, Borregaard N, Wynn TA. Phenotypic and functional plasticity of cells of innate immunity: macrophages, mast cells and neutrophils. *Nat Immunol*. 2011;12(11):1035-44.
68. Beyrau M, Bodkin JV, Nourshargh S. Neutrophil heterogeneity in health and disease: a revitalized avenue in inflammation and immunity. *Open biology*. 2012;2(11):120134.
69. Stroncek DF. Neutrophil-specific antigen HNA-2a, NB1 glycoprotein, and CD177. *Current Opinion in Hematology*. 2007;14(6):688-93.
70. Hu N, Westra J, Huitema MG, Bijl M, Brouwer E, Stegeman CA, et al. Coexpression of CD177 and membrane proteinase 3 on neutrophils in antineutrophil cytoplasmic autoantibody-associated systemic vasculitis: Anti-proteinase 3-mediated neutrophil activation is independent of the role of CD177-expressing neutrophils. *Arthritis & Rheumatism*. 2009;60(5):1548-57.
71. Kuckleburg CJ, Tilkens SM, Santoso S, Newman PJ. Proteinase 3 contributes to transendothelial migration of NB1-positive neutrophils. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2012;188(5):2419-26.
72. Bauer S, Abdgawad M, Gunnarsson L, Segelmark M, Tapper H, Hellmark T. Proteinase 3 and CD177 are expressed on the plasma membrane of the same subset of neutrophils. *Journal of Leukocyte Biology*. 2007;81(2):458-64.
73. Pliyev BK, Menshikov M. Comparative evaluation of the role of the adhesion molecule CD177 in neutrophil interactions with platelets and endothelium. *European journal of haematology*. 2012;89(3):236-44.
74. Nourshargh S, Renshaw SA, Imhof BA. Reverse Migration of Neutrophils: Where, When, How, and Why? *Trends in immunology*. 2016;37(5):273-86.
75. Buckley CD, Ross EA, McGettrick HM, Osborne CE, Haworth O, Schmutz C, et al. Identification of a phenotypically and functionally distinct population of long-lived neutrophils in a model of reverse endothelial migration. *J Leukoc Biol*. 2006;79(2):303-11.
76. Summers C, Rankin SM, Condliffe AM, Singh N, Peters AM, Chilvers ER. Neutrophil kinetics in health and disease. *Trends in immunology*. 2010;31(8):318-24.
77. Pillay J, den Braber I, Vrisekoop N, Kwast LM, de Boer RJ, Borghans JA, et al. In vivo labeling with 2H2O reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days. *Blood*. 2010;116(4):625-7.
78. Rankin SM. The bone marrow: a site of neutrophil clearance. *J Leukoc Biol*. 2010;88(2):241-51.

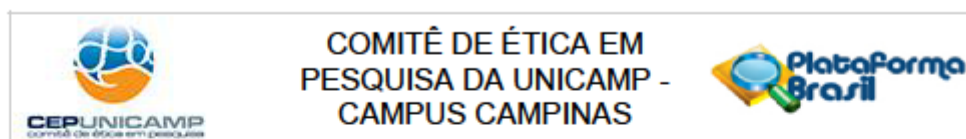
79. Kafkas N, Demponeras C, Zouboulouglou F, Spanou L, Babalis D, Makris K. Serum Levels of Gelatinase Associated Lipocalin as Indicator of the Inflammatory Status in Coronary Artery Disease. *International Journal of Inflammation*. 2012;2012:8.
80. Shah N, Parikh V, Patel N, Patel N, Badheka A, Deshmukh A, et al. Neutrophil lymphocyte ratio significantly improves the Framingham risk score in prediction of coronary heart disease mortality: insights from the National Health and Nutrition Examination Survey-III. *Int J Cardiol*. 2014;171(3):390-7.
81. Xavier HT, Izar MC, Faria Neto JR, Assad MH, Rocha VZ, Sposito AC, et al. V Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*. 2013;101:1-20.
82. Hoffman M, Blum A, Baruch R, Kaplan E, Benjamin M. Leukocytes and coronary heart disease. *Atherosclerosis*. 2004;172(1):1-6.
83. Woodfin A, Beyrau M, Voisin M-B, Ma B, Whiteford JR, Hordijk PL, et al. ICAM-1–expressing neutrophils exhibit enhanced effector functions in murine models of endotoxemia. *Blood*. 2016;127(7):898-907.
84. Sachs UJ, Andrei-Selmer CL, Maniar A, Weiss T, Paddock C, Orlova VV, et al. The neutrophil-specific antigen CD177 is a counter-receptor for platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31). *The Journal of biological chemistry*. 2007;282(32):23603-12.
85. Zernecke A, Weber C. Chemokines in atherosclerosis: proceedings resumed. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2014;34(4):742-50.
86. Murphy PM. Neutrophil receptors for interleukin-8 and related CXC chemokines. *Seminars in hematology*. 1997;34(4):311-8.
87. Zernecke A, Bot I, Djalali-Talab Y, Shagdarsuren E, Bidzhekov K, Meiler S, et al. Protective role of CXC receptor 4/CXC ligand 12 unveils the importance of neutrophils in atherosclerosis. *Circulation research*. 2008;102(2):209-17.
88. Bot I, Daissormont IT, Zernecke A, van Puijvelde GH, Kramp B, de Jager SC, et al. CXCR4 blockade induces atherosclerosis by affecting neutrophil function. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2014;74:44-52.
89. Zhang R, Brennan ML, Fu X, Aviles RJ, Pearce GL, Penn MS, et al. Association between myeloperoxidase levels and risk of coronary artery disease. *Jama*. 2001;286(17):2136-42.
90. Naruko T, Ueda M, Haze K, van der Wal AC, van der Loos CM, Itoh A, et al. Neutrophil infiltration of culprit lesions in acute coronary syndromes. *Circulation*. 2002;106(23):2894-900.
91. Apostolakis S, Vogiatzi K, Amanatidou V, Spandidos DA. Interleukin 8 and cardiovascular disease. *Cardiovascular Research*. 2009;84(3):353-60.

92. Yan L, Borregaard N, Kjeldsen L, Moses MA. The high molecular weight urinary matrix metalloproteinase (MMP) activity is a complex of gelatinase B/MMP-9 and neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL). Modulation of MMP-9 activity by NGAL. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(40):37258-65.
93. Lau D, Mollnau H, Eiserich JP, Freeman BA, Daiber A, Gehling UM, et al. Myeloperoxidase mediates neutrophil activation by association with CD11b/CD18 integrins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005;102(2):431-6.
94. Price DT, Loscalzo J. Cellular adhesion molecules and atherogenesis. *The American journal of medicine*. 1999;107(1):85-97.
95. Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *The New England journal of medicine*. 2005;352(16):1685-95.
96. Springer TA. Adhesion receptors of the immune system. *Nature*. 1990;346(6283):425-34.
97. Särndahl E, Bergström I, Brodin VP, Nijm J, Setterud HL, Jonasson L. Neutrophil Activation Status in Stable Coronary Artery Disease. *PLoS ONE*. 2007;2(10):e1056.
98. Jerke U, Rolle S, Dittmar G, Bayat B, Santoso S, Sporbert A, et al. Complement receptor Mac-1 is an adaptor for NB1 (CD177)-mediated PR3-ANCA neutrophil activation. *J Biol Chem*. 2011;286(9):7070-81.
99. Kuckleburg CJ, Tilkens SB, Santoso S, Newman PJ. Proteinase 3 contributes to transendothelial migration of NB1-positive neutrophils. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2012;188(5):2419-26.
100. Hu N, Mora-Jensen H, Theilgaard-Monch K, Doornbos-van der Meer B, Huitema MG, Stegeman CA, et al. Differential expression of granulopoiesis related genes in neutrophil subsets distinguished by membrane expression of CD177. *PLoS One*. 2014;9(6):e99671.
101. Whyte MK, Meagher LC, MacDermot J, Haslett C. Impairment of function in aging neutrophils is associated with apoptosis. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 1993;150(11):5124-34.
102. Suratt BT, Young SK, Lieber J, Nick JA, Henson PM, Worthen GS. Neutrophil maturation and activation determine anatomic site of clearance from circulation. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2001;281(4):L913-21.
103. Chistiakov DA, Grechko AV, Myasoedova VA, Melnichenko AA, Orekhov AN. The role of monocytosis and neutrophilia in atherosclerosis. 2018;22(3):1366-82.
104. Hazen SL. Myeloperoxidase and plaque vulnerability. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24(7):1143-6.

105. Yunoki K, Naruko T, Komatsu R, Shirai N, Nakagawa M, Sugioka K, et al. Relation of elevated levels of plasma myeloperoxidase to impaired myocardial microcirculation after reperfusion in patients with acute myocardial infarction. *The American journal of cardiology*. 2010;105(7):922-9.
106. Smith FB, Fowkes FG, Rumley A, Lee AJ, Lowe GD, Hau CM. Tissue plasminogen activator and leucocyte elastase as predictors of cardiovascular events in subjects with angina pectoris: Edinburgh Artery Study. *European heart journal*. 2000;21(19):1607-13.
107. Dinerman JL, Mehta JL, Saldeen TG, Emerson S, Wallin R, Davda R, et al. Increased neutrophil elastase release in unstable angina pectoris and acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*. 1990;15(7):1559-63.
108. Amaro A, Gude F, Gonzalez-Juanatey R, Iglesias C, Fernandez-Vazquez F, Garcia-Acuna J, et al. Plasma leukocyte elastase concentration in angiographically diagnosed coronary artery disease. *European heart journal*. 1995;16(5):615-22.
109. Amaro A, Gude F, Gonzalez-Juanatey JR, Iglesias C, Fernandez-Vazquez F, Varela-Duran J, et al. Activity of leucocyte elastase in women with coronary artery disease documented using angiography. *Journal of cardiovascular risk*. 1995;2(2):149-53.
110. Yasmin, McEniery CM, Wallace S, Dakham Z, Pulsalkar P, Maki-Petaja K, et al. Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), MMP-2, and serum elastase activity are associated with systolic hypertension and arterial stiffness. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25(2):372.
111. Choi KM, Lee JS, Kim EJ, Baik SH, Seo HS, Choi DS, et al. Implication of lipocalin-2 and visfatin levels in patients with coronary heart disease. *European journal of endocrinology*. 2008;158(2):203-7.
112. Zografos T, Haliassos A, Korovesis S, Giazitzoglou E, Vroidis E, Katritsis D. Association of neutrophil gelatinase-associated lipocalin with the severity of coronary artery disease. *The American journal of cardiology*. 2009;104(7):917-20.
113. Hemdahl AL, Gabrielsen A, Zhu C, Eriksson P, Hedin U, Kastrup J, et al. Expression of neutrophil gelatinase-associated lipocalin in atherosclerosis and myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26(1):136-42.
114. Leclercq A, Houard X, Philippe M, Ollivier V, Sebbag U, Meilhac O, et al. Involvement of intraplaque hemorrhage in atherothrombosis evolution via neutrophil protease enrichment. *J Leukoc Biol*. 2007;82(6):1420-9.
115. te Boekhorst BC, Bovens SM, Hellings WE, van der Kraak PH, van de Kolk KW, Vink A, et al. Molecular MRI of murine atherosclerotic plaque targeting NGAL: a protein associated with unstable human plaque characteristics. *Cardiovasc Res*. 2011;89(3):680-8.

116. Kalousek I, Roselova P, Otevrelva P. [NGAL--neutrophil gelatinase associated lipocalin in biochemistry, physiology and clinical praxis]. *Casopis lekaru ceskych*. 2006;145(5):373-6.
117. Boisvert WA, Rose DM, Johnson KA, Fuentes ME, Lira SA, Curtiss LK, et al. Up-regulated expression of the CXCR2 ligand KC/GRO-alpha in atherosclerotic lesions plays a central role in macrophage accumulation and lesion progression. *The American journal of pathology*. 2006;168(4):1385-95.
118. Kirk G, Hickman P, McLaren M, Stonebridge PA, Belch JJ. Interleukin-8 (IL-8) may contribute to the activation of neutrophils in patients with peripheral arterial occlusive disease (PAOD). *European journal of vascular and endovascular surgery : the official journal of the European Society for Vascular Surgery*. 1999;18(5):434-8.
119. Holmes W, Lee J, Kuang W, Rice G, Wood W. Structure and functional expression of a human interleukin-8 receptor. *Science*. 1991;253(5025):1278-80.
120. Schumacher C, Clark-Lewis I, Baggiolini M, Moser B. High- and low-affinity binding of GRO alpha and neutrophil-activating peptide 2 to interleukin 8 receptors on human neutrophils. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1992;89(21):10542-6.
121. Lee J, Horuk R, Rice GC, Bennett GL, Camerato T, Wood WI. Characterization of two high affinity human interleukin-8 receptors. *The Journal of biological chemistry*. 1992;267(23):16283-7.
122. Ionita MG, van den Borne P, Catanzariti LM, Moll FL, de Vries JP, Pasterkamp G, et al. High neutrophil numbers in human carotid atherosclerotic plaques are associated with characteristics of rupture-prone lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010;30(9):1842-8.
123. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*. 2004;303(5663):1532-5.
124. Bardoel BW, Kenny EF, Sollberger G, Zychlinsky A. The balancing act of neutrophils. *Cell host & microbe*. 2014;15(5):526-36.
125. Papayannopoulos V, Metzler KD, Hakkim A, Zychlinsky A. Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *The Journal of cell biology*. 2010;191(3):677-91.
126. Schechter MC, Buac K, Adekambi T, Cagle S, Celli J, Ray SM, et al. Neutrophil extracellular trap (NET) levels in human plasma are associated with active TB. 2017;12(8):e0182587.
127. Arai Y, Yamashita K, Mizugishi K, Watanabe T, Sakamoto S, Kitano T, et al. Serum neutrophil extracellular trap levels predict thrombotic microangiopathy after allogeneic stem cell transplantation. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*. 2013;19(12):1683-9.

8 ANEXOS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Identificação de populações fenotipicamente distintas de neutrófilos no sangue periférico de pacientes com doença arterial coronariana

Pesquisador: Mariana Alcântara Cardoso Faria

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 50871215.8.0000.5404

Instituição Proponente: Hospital de Clínicas da UNICAMP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.801.340

Apresentação do Projeto:

A pesquisadora responsável apresentou a emenda ao projeto original adicionando uma instituição coparticipante que é o "Hospital do Coração de Campinas".

Objetivo da Pesquisa:

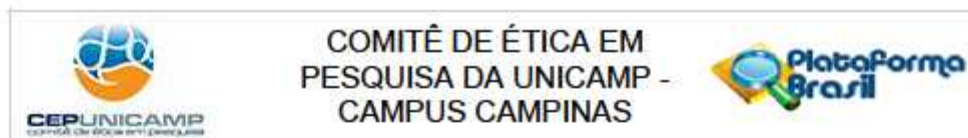
Objetivo Primário:

Quantificar e caracterizar os neutrófilos e seus produtos no sangue periférico de pacientes com doença arterial coronariana (DAC) e controles com e sem fatores de risco para DAC.

Objetivos Secundários:

1. Determinar a porcentagem e o número absoluto de neutrófilos circulantes em amostras de sangue periférico de pacientes com doença arterial coronariana e comparar os resultados com indivíduos controles com e sem fatores de risco para DAC.
2. Determinar a concentração plasmática de elastase, MPO, NGAL, azurocidina, LL-37 (catelicidina), cathepsina G, IL-8 e IL-1Beta de pacientes com doença arterial coronariana e comparar os resultados com indivíduos controles com e sem fatores de risco para DAC.

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
 Bairro: Barão Geraldo CEP: 13.083-887
 UF: SP Município: CAMPINAS
 Telefone: (19)3521-8936 Fax: (19)3521-7187 E-mail: cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 1.801.340

3. Caracterizar os neutrófilos circulantes quanto a expressão de moléculas de adesão (CD18, CD11b, CD18, CD32, CD49d, ICAM-1 e CD29) e de estimulação (HLA-DR, CD80) e receptores de quimiocinas (CCR1, CXCR2, CCR5, CXCR8), por citometria de fluxo.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos e benefícios se mantiveram os mesmos do projeto original.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de uma emenda ao projeto de pesquisa original para o acréscimo de uma instituição coparticipante que é o Hospital do Coração de Campinas.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Na presente emenda foram anexados os seguintes documentos: a) Informações básicas da pesquisa, b) Projeto de pesquisa completo; c) Justificativa da emenda; d) Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) que será aplicado no Hospital do Coração de Campinas; e) Declaração autorização coleta de dados no Hospital do Coração de Campinas.

Recomendações:

1. No projeto de pesquisa, lê-se que "Os pacientes serão submetidos à punção venosa de 30 mL de sangue periférico,...", no entanto no TCLE no item "Riscos e desconfortos" está escrito que "... serão coletados apenas 40mL de sangue". As informações nos dois documentos devem ser identificas.

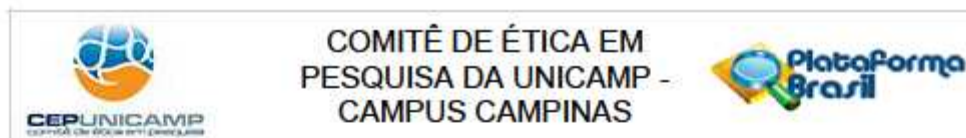
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

2. O TCLE não faz menção aos "benefícios". Deve estar escrito quais os benefícios diretos que a pessoa terá caso aceite participar da pesquisa. Caso a pesquisadora, não consiga dimensionar esses benefícios deve descrever que não há benefícios diretos com a participação (Resolução 486/12).

3. No item "Confidencialidade", esclarecer:

a) quais os cuidados os pesquisadores tomarão com as informações coletadas na pesquisa que estarão com os pesquisadores. As informações estarão no prontuário médico, mas provavelmente

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
 Bairro: Barão Geraldo CEP: 13.083-887
 UF: SP Município: CAMPINAS
 Telefone: (19)3521-8936 Fax: (19)3521-7187 E-mail: cep@com.unicamp.br



Continuação do Parecer: 1.801.340

os pesquisadores irão registrar esses dados também em uma "ficha de coleta de dados" para posterior processamento dos dados. Explicar quais os cuidados os pesquisadores tomarão em relação a esse material para manter o sigilo e a confidencialidade. Também há necessidade de explicar quem terá acesso a esses registros/a essas fichas.

b) Nesse item, lê-se que "Informações médicas obtidas neste estudo farão parte do seu prontuário médico deste hospital. Informação que não fizer parte do prontuário será colocado junto a arquivo dos investigadores e identificado por códigos". Explicar que tipo de informação não médica não irá fazer parte do prontuário.

c) Deve estar escrito de forma clara e objetivo que a identidade da pessoa será mantida em sigilo e que quando os resultados da pesquisa forem divulgados, o nome dela não será divulgado.

4. Item "Destino do material biológico após conclusão do estudo" deve ser acrescentado:

a) que o participante ou seu representante legal podem a qualquer momento retirar seu consentimento da guarda e utilização do material biológico armazenado. Também deve-se acrescentar quem terá direito sobre o material armazenado em caso de falecimento do participante ou se esse ficar em uma condição incapacitante. No site do CEP tem uma estrutura básica dos itens que devem conter no TCLE que pode ser acessada através do link <https://www.prp.unicamp.br/pt-br/projeto-de-pesquisa> e clicando no item "3. Estrutura básica para Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)"

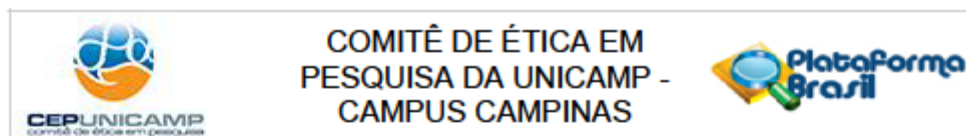
b) Nesse mesmo item, lê-se que "... Após a conclusão do estudo o material derivado do sangue periférico coletado (plasma) que não foi utilizado será armazenado em freezer -80o C no Laboratório de Imunologia Celular e Molecular sob a responsabilidade da Profa. Dra. Maria Heloisa de Souza Lima Blotta". Explicar que o Laboratório de Imunologia está localizado na UNICAMP.

c) Também nesse item, consta a opção de escolha "NÃO () Não concordo com o armazenamento". Acrescentar a esta frase "devendo o mesmo ser descartado no final da pesquisa".

d) Inserir os campos para serem colocadas as rubricas do "participante da pesquisa/representante legal" e do "pesquisador" nas páginas do TCLE.

5. Faltou inserir no TCLE o item "O Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)" que descreve qual é o papel do CEP, conforme consta na estrutura básica do TCLE que pode ser acessada através do link <https://www.prp.unicamp.br/pt-br/projeto-de-pesquisa> e clicando no item "3. Estrutura básica para Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)"

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
 Bairro: Barão Geraldo CEP: 13.083-887
 UF: SP Município: CAMPINAS
 Telefone: (19)3521-8936 Fax: (19)3521-7187 E-mail: cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 1.801.340

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovada com Recomendações (Vide item acima recomendações).

Considerações Finais a critério do CEP:

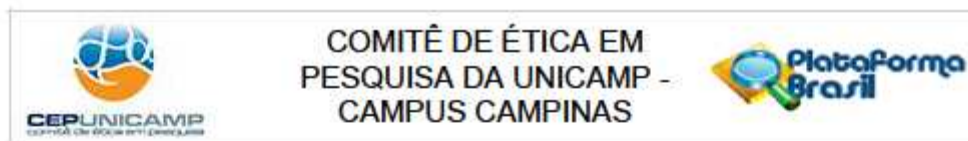
Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_798212_E1.pdf	06/10/2016 16:36:55		Aceito
Outros	JustificativaDeEmenda.pdf	06/10/2016 16:35:00	Mariana Alcântara Cardoso Faria	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Hcore.pdf	06/10/2016 16:30:27	Mariana Alcântara Cardoso Faria	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Emenda.pdf	06/10/2016 16:28:14	Mariana Alcântara Cardoso Faria	Aceito
Outros	Declaracao.pdf	06/10/2016 16:26:27	Mariana Alcântara Cardoso Faria	Aceito
Outros	carta_resposta_ao_CEP.pdf	12/01/2016 11:21:03	Mariana Alcântara Cardoso Faria	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_corrigido.pdf	12/01/2016 11:09:36	Mariana Alcântara Cardoso Faria	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_corrigido.pdf	12/01/2016 11:07:47	Mariana Alcântara Cardoso Faria	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Biorepositorio.pdf	09/11/2015 13:56:43	Mariana Alcântara Cardoso Faria	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.pdf	19/10/2015 08:02:32	Mariana Alcântara Cardoso Faria	Aceito
Folha de Rosto	Folha.pdf	19/10/2015 08:00:37	Mariana Alcântara Cardoso Faria	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
 Bairro: Barão Geraldo CEP: 13.083-887
 UF: SP Município: CAMPINAS
 Telefone: (19)3521-8936 Fax: (19)3521-7187 E-mail: cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 1.801.340

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CAMPINAS, 01 de Novembro de 2016

Assinado por:

Renata Maria dos Santos Celeghini
(Coordenador)

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
 Bairro: Barão Geraldo CEP: 13.083-887
 UF: SP Município: CAMPINAS
 Telefone: (19)3521-8936 Fax: (19)3521-7187 E-mail: cep@com.unicamp.br