



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

CLEIDEANE DOS SANTOS SARGES

**AVALIAÇÃO FUNCIONAL DOS NEUTRÓFILOS
CIRCULANTES SOB EFEITO DA HIDROXIURÉIA EM
PACIENTES PORTADORES DE POLICITEMIA VERA E
TROMBOCITEMIA ESSENCIAL**

Belém - PA

2022

CLEIDEANE DOS SANTOS SARGES

**AVALIAÇÃO FUNCIONAL DOS NEUTRÓFILOS
CIRCULANTES SOB EFEITO DA HIDROXIURÉIA EM
PACIENTES PORTADORES DE POLICITÊMIA VERA E
TROMBOCITÊMIA ESSENCIAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração: Avaliação biológica de produtos naturais e sintéticos, do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas. Orientadora:
Prof^a. Dr^a. Carolina Heitmann Mares Azevedo Ribeiro.

Belém - PA

2022

Belém - PA

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a)
autor(a)

D722a dos Santos Sarges, Cleideare.
AVALIAÇÃO FUNCIONAL DOS NEUTRÓFILOS
CIRCULANTES SOB EFEITO DA HIDROXIUREIA EM
PACIENTES PORTADORES DE POLICITEMIA VERA E
TROMBOCITEMIA ESSENCIAL / Cleideane dos Santos
Sarges. — 2022.
62 f. : il. color.

Orientador(a): Prof^ª. Dra. Carolina Heitmann Mares
Azevedo Ribeiro.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará,
Instituto de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação
em Ciências Farmacêuticas, Belém, 2022.

1. neutrófilos, policitemia vera, trombocitemia
essencial, hidroxiureia, fagocitose. I. Título.

CDD 000

Belém - PA

2022

FOLHA DE APROVAÇÃO

Cleideane dos Santos Sarges.

Avaliação funcional dos neutrófilos circulantes sob efeito da hidroxiuréia em pacientes portadores de policitemia vera e trombocitemia essencial

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração: Avaliação biológica de produtos naturais e sintéticos, do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof^a. Dra. Carolina Heitmann Mares Azevedo Ribeiro (Orientadora)

Instituição: Programa de Pós-Graduação em Ciências
farmacêuticas/UFPA

Prof^a. Dra Maria Lúcia S. Siqueira

Instituição: Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas/UFPA

Prof. Dr. Eneas de Andrade Fontes Junior

Instituição: Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas/UFPA

Belém – Pa

2022

DEDICATÓRIA

Dedico à Deus, Rei e Soberano, dono de tudo o que há no céu e na terra, por seu amor e cuidado em todos os meus dias; Aos meus filhos por serem motivos de alegria e coragem; À minha família em especial a Cleide Melo, Erica Sarges; Aos meus avós por noites e dias de oração.

AGRADECIMENTOS

À professora Dr^a Carolina Haitmann Mares de Azevedo, minha orientadora, pelo acolhimento confiança e disponibilidade direcionada a minha pessoa e para realização desse trabalho.

À professora Dr^a Marta Chagas Monteiro e toda sua equipe por ceder o uso de equipamentos e materiais bem como atenção e suporte técnico necessário.

Aos amigos e companheiros do laboratório de hematologia básica e clínica, especialmente a Erica, Raquel e Larissa pelo apoio convivência e auxílio na superação dos desafios e lutas que travamos juntas.

As amigas de longa data, Daiane, Raiane, Iara e Izis pelo apoio singular e especial para que eu pudesse chegar a esta conquista.

Ao Dr Thiago Xavier Carneiro e sua equipe da hemoterapia do hospital Ophir Loyola, pela disponibilidade e auxílio na coleta de amostras.

Ao CNPq que me deu subsídios para avançar nessa etapa da vida acadêmica.

Por fim a todos os pacientes que generosamente acreditaram neste trabalho, possibilitando a concretização do memo.

EPÍGRAFE

—O coração do homem planeja seus caminhos, mas o Senhor lhe dirige os passos II.

(Provérbios do Rei Salomão)

RESUMO

C-SARGES. S. Avaliação funcional dos neutrófilos circulantes sob efeito da hidroxiuréia em pacientes portadores de policitemia vera e trombocitemia essencial. Dissertação (Mestrado), Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Pará, Belém, 2022.

O presente trabalho tem como objetivo analisar *in vitro* as alterações qualitativas nos neutrófilos circulantes de pacientes com Policitemia Vera e Trombocitemia Essencial com exposição prolongada a hidroxiuréia. O grupo amostral foi constituído por 11 pacientes com PV e 14 com TE, e 24 indivíduos controle. As amostras biológicas para análise foram obtidas após o consentimento mediante assinatura do TCLE, no hospital Ophir Loyola, e levadas a faculdade de farmácia da Universidade Federal do Pará, em temperatura adequada 2°C e 6°C. Foi coletado 10mL de sangue periférico para obtenção dos neutrófilos, e também para o teste de NBT. Na realização do hemograma as amostras foram processadas através de metodologia semi-automatizada utilizando o contador ABX micros 6 e posteriormente realizado distensão de esfregaço em todas as amostras sendo as lâminas coradas com Leishmann. Após essa primeira etapa, as lâminas foram submetidas à microscopia óptica como método para a visualização dos elementos celulares como contagem diferencial. Para obtenção dos neutrófilos circulantes foi utilizado 5mL de sangue com solução salina passando em seguida por 6 etapas para obtenção do neutrófilo purificado e então realizada leitura diferencial em câmara de Neubauer. A contagem diferencial foi realizada em lâmina preparada com 20 µl da solução de células em citocentrífuga (150 x g, 10 min, Cito-Spin) e corada com Leishmann. Foram contadas 100 células em microscópio de luz, com objetiva em óleo de imersão (100x) diferenciando-se os tipos celulares. Em seguida realizada avaliação da função fagocítica, pelo ensaio de fagocitose sensibilizado com zimozan. Após o processo os resultados foram expressos por meio do Índice Fagocítico (IF): $IF = \% \text{ neutrófilos em fagocitose} \times \text{número médio de partículas fagocitadas}$. Foi realizado o ensaio de NBT a fim de avaliar o metabolismo oxidativo dos neutrófilos. A análise estatística foi obtida através da plataforma Bioestat. Os pacientes portadores de PV e TE apresentaram menor IF que os indivíduos do grupo controle, com $p=0,0001$ ($2.72 \pm 0,25$; 3.51 ± 0.31), $p=0,0001$ ($2.82 \pm 0,81$; 3.51 ± 0.31). Não houve diferença quanto à ativação do metabolismo oxidativo na prova de redução do NBT, entre o grupo controle com o

grupo PV e TE ($6 \pm 1,17 - 5 \pm 2$) $p=0,22$ e ($5.5 \pm 1,94 - 5 \pm 2$) $p=0,55$ respectivamente. Os pacientes portadores de PV e TE apresentaram alterações qualitativas nos neutrófilos, como a diminuição da atividade fagocítica independente do uso da Hidroxiureia.

Palavras-chave: neutrófilos, policitemia vera, trombocitemia essencial, hidroxiureia, fagocitose

C-SARGES. S. Functional evaluation of circulating neutrophils under the effect of hydroxyurea in patients with polycythemia vera and essential thrombocythemia. Dissertation (Master's), Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Pará, Belém, 2022.

ABSTRACT

The present work aims to analyze in vitro the qualitative alterations in the circulating neutrophils of patients with Polycythemia Vera and Essential Thrombocythemia with prolonged exposure to hydroxyurea. The sample group consisted of 11 patients with PV and 14 with TE, and 24 control individuals. Biological samples for analysis were obtained after consent by signing the TCLE, at the Ophir Loyola hospital, and taken to the faculty of pharmacy at the Federal University of Pará, at an appropriate temperature of 2°C and 6°C. 10mL of peripheral blood was collected to obtain neutrophils, and also for the NBT test. In carrying out the hemogram, the samples were processed through a semi-automated methodology using the ABX micros 6 counter and later, a smear was distended in all samples and the slides were stained with Leishmann. After this first stage, the slides were submitted to optical microscopy as a method for viewing cell elements as a differential count. To obtain the circulating neutrophils, 5mL of blood with saline solution was used, then going through 6 steps to obtain the purified neutrophil and then a differential reading was performed in a Neubauer camera. Differential counting was performed on a slide prepared with 20 µl of the cell solution in a cytocentrifuge (150 x g, 10 min, Cyto-Spin) and stained with Leishmann. 100 cells were counted in a light microscope, with an oil immersion objective (100x) differentiating cell types. Afterthat, the phagocytic function was evaluated by the zymozan-sensitized phagocytosis assay, after which the results were expressed using the Phagocytic Index (IF): $IF = \% \text{ neutrophils in phagocytosis} \times \text{average number of phagocytosed particles}$. The NBT assay was performed in order to evaluate the oxidative metabolism of neutrophils. Statistical analysis was performed using the Bioestat platform. There was a predominance of females, as well as brown people in PV and ET, patients with PV had lower FI than individuals in the control group, with $p=0.0001$ (2.72 ± 0.25 ; 3.51 ± 0.31), the the same was observed in patients with ET who had a

lower index than control subjects with $p=0.0001$ (2.82 ± 0.81 ; 3.51 ± 0.31 respectively). Our results showed that there was no difference regarding the activation of oxidative metabolism in the NBT reduction test, between the control group with the PV and TE groups $6\pm 1,17 - 5\pm 2$ $p=0,22$ e ($5.5\pm 1,94 - 5\pm 2$) respectively, and control group with ET group using HU, showing In the present study, the relationship between dose and absolute number of neutrophils and lymphocytes was evaluated, which showed a significant result, demonstrating that even with higher doses, patients are in a desirable clinical condition. Patients with PV and TE showed qualitative changes in neutrophils, in which the use of HU decreases the phagocytic activity of neutrophils in these patients.

Keywords: neutrophils, polycythemia vera, essential thrombocythemia, hydroxyurea, phagocytosis

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura1: mecanismo de sinalização da Via JAK/STAT	22
Figura2: Mutações de condução em gene JAK2, MPL e CALR	23
Figura 3: neutrófilos segmentados Estrutura polimorfonuclear.	29
Figura 4: Ilustração de Receptores de Patógenos	31
Figura 5: Ilustração da obtenção de neutrófilos do sangue periférico	38
Figura 6: neutrófilo com e sem fagocitose in vitro	40
Figura 7: Capacidade fagocítica em gráfico	45
Figura 8: médias de neutrófilos de grupo controle e de pacientes reativos ao NBT	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Critérios da OMS 2016 para o diagnóstico de Policitemia Vera.	25
Tabela 2: Critérios da OMS 2016 para o diagnóstico de Policitemia Vera.	26
Tabela 3: Perfil dos grupos de pacientes e controles com os seguintes dados: Sexo, idade e raça em média e desvio padrão	42
Tabela 4: Hemograma de pacientes e controle	43
Tabela 5: média e desvio padrão dos neutrófilos e linfócitos absolutos, sobre a influência de diferentes doses	44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAS	Ácido acetilsalicílico
AMB	associação medica brasileira
ATP	Trisfosfato de adenosina
AVC	Acidente vascular cerebral
BCR-ABL	Breakpoint cluster region - Abelson murineleukemia viral oncogene 1
BMO	Biópsia de medula óssea
CD62L	L-selectina
CD11a	Subunidade α da integrina LFA-1
CD11b	Subunidade α da integrina Mac-1
DDM	diretriz de doenças mieloproliferativas
DMPC	Doenças mieloproliferativas
DNA	Ácido desoxirribonucleico
CVO	Crises vasos oclusivas
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EPO	Eritropoietina
Epo-R	Receptores de eritropoietina
EROs	Espécies reativas de oxigênio

ERN	Espécies reativas de nitrogênio
FDA	<i>FoodandDrugAdministration</i>
G-CFS	Fatores de estímulos de granulócitos
G-CSF-R	Receptor fator estimulador de colônias de granulócitos
GM-CFS	Fator estimulador de colônias granulócito-macrófago
HCT	Hematócrito
HOCL	Ácido hipocloroso
HU	Hidroxiureia
ICAM	Molécula de Adesão Intercelular
IF	Índice fagocítico
IL-1	Interleucina-1
IL-3	Interleucina-3
IL-6	Interleucina-6
IL-8	Interleucina -8
JAK1	Janus Kinase 1
JAK2	Janus Kinase 2
JAK3	Janus Kinase 3
JH1	JAK homology 1
JH2	JAK homology 2
JH7	JAK homology7

KCl	Cloreto de Potássio
KH ₂ PO ₄	Fostato de Potássio dihidrogenado
LFA-1	Antígeno 1 associado a função linfocitária
LMA	Leucemia mieloideaguda
LMC	Leucemia mieloidecrônica
LPO	Lactoperoxidase
MF	Mielofibrose
MFP	Mielofibrose primária
Mac-1	Antígeno de macrófago 1
MO	Medula óssea
MPL	Myeloproliferativeleukemia vírus oncogene
MPO	Mieloperoxidase
NADPH	Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina
Na ₂ HPO ₄	Fostato de sódio dibásico
NaCl	Cloreto de Sódio
NaOH	Hidróxido de Sódio
NETs	Neutrophilextracellulartraps
NMP	Neoplasias mieloproliferativas
NMP-Ph ⁻	Neoplasias mieloproliferativas philadelphia negativas
NO	Óxido nítrico
O ₂ •	Ânion superóxido
OMS	Organização Mundial da Saúde

PBS	Tampão Fosfato-salino
PEO	Peroxidase eosinofílica
PGHS	Pronstaglandina endoperóxido sintase
Ph ¹	<i>Philadelphia</i>
PMNs	Polimorfonucleadas
PSGL	Ligante de P-selectina
PTO	Peroxidase de tireóide
PV	Policitemia vera
RPMI	Instituto Memorial Park Roswell
SFB	Soro fetal bovino
SMD	Síndrome mielodisplásica
SNC	Sistema nervoso central
STAT	Transdutores de sinal e ativadores de transcrição
TE	Trombocitemia essencial
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral alfa
TPO	Trombopoetina
Tpo-R	Receptor de trombopoetina
TYK2	Tirosina kinase

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	19
1.1 Epidemiologia das NMPs PH.....	21
1.2 Patogênese das Neoplasias mieloproliferativas Ph1 negativas.....	21
1.3 Policitemia vera	24
1.4 Trombocitemia Essencial	25
1.5 Neutrófilos e NMPs Ph1 negativas.....	27
1.6 O Neutrófilo.....	28
1.6.1 ASPECTOS GERAIS	28
1.6.2 FAGOCITOSE	30
1.6.3 NADPH OXIDASE E ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ERO).....	31
1.7 Hidróxiuréia.....	32
2. OBJETIVOS.....	35
2.1 Objetivo geral:.....	35
2.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
3. CASUÍSTICA E MÉTODOS	35
3.1 Casuística	35
3.2 Aspectos éticos	36
3.3 Amostras biológicas	36
3.3.1 REAGENTES.....	37
3.3.2 DETERMINAÇÃO DO HEMOGRAMA	37
3.4 Avaliação da função fagocítica de neutrófilos circulantes.....	38
3.4.1 OBTENÇÃO E PREPARO DOS NEUTRÓFILOS CIRCULANTES	38
3.4.2 AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO FAGOCÍTICA.....	39
3.4.3 ENSAIO DE REDUÇÃO NITROBLUE TETRAZOLIUM (NBT)	40
3.5 Análise estatística	40

4. RESULTADOS	41
4.1 Características clínicas e hematológicas dos pacientes com PV, TE e controles	
41	
4.2 Dados do hemograma.....	42
4.3 Análise da Função Fagocítica	44
4.4 Nitroazul Tetrazólio – NBT	45
5. DISCUSSÃO	46
6. CONCLUSÃO	51
7. REFERÊNCIA.....	52
ANEXO.....	605

1. INTRODUÇÃO

Estudos realizados entre os anos de 2016 e 2021 demonstraram um crescente interesse a respeito da ação da hidroxiuréia sobre os neutrófilos, visto que essas células possuem um potencial modulador de resposta à inflamação aguda, e que são também o principal tipo celular responsável por obter resposta inflamatória. Apresentam-se como células leucocitárias mais abundantes do sistema imune, e sua abundância é clinicamente relevante porque defeitos congênitos ou condições adquiridas que baixam contagens sanguíneas de neutrófilos predizem infecções avassaladoras (Newburger, 2016; Skokowa et al., 2017, Burn et al., 2021). Destaca-se esse tipo celular como regulador para a integridade do indivíduo, uma vez que o controle do infiltrado de neutrófilos e a ampliação da visão de versatilidade dessa célula, são importantes em todo o estabelecimento da resposta imune. Os neutrófilos abrem um campo de possibilidades para o estudo de patogêneses que dependem do processo inflamatório para se estabelecerem no organismo (Silva, 2016).

Em um estudo qualitativo e comparativo, sobre efeito de hidroxiuréia e anagrelide em neutrófilos diante de estímulo infeccioso, Sarges E.S (2018) em estudo ainda não publicado, identificou que pacientes portadores de policitemia vera e trombocitemia essencial, em uso de hidroxiuréia apresentaram alterações na atividade fagocítica, sugerindo menor capacidade de resposta dessas células frente a uma infecção. O presente estudo é uma extensão desse trabalho e buscou analisar o determinado efeito da hidroxiuréia nos neutrófilos de pacientes em exposição a esse fármaco, além disso propõe-se, fomentar dados na literatura que auxiliem no manejo terapêutico de pacientes com policitemia vera e trombocitemia essencial.

A policitemia vera e a trombocitemia essencial são neoplasias mieloproliferativas (NMP) *philadelphia* negativas (Ph⁻) que tem como complicações expansão clonal de células progenitoras hematopoiéticas mielóides, de linhagem diferente consoante o subtipo de doença, de forma independente dos mecanismos de regulação e que não apresentam displasia (Paz et al., 2017; Cardoso ANS, 2018), podendo causar eventos trombóticos e hemorrágicos. A relação dos neutrófilos com os processos trombóticos, ocasionados por essas duas patologias não está bem elucidada na literatura, no entanto é de conhecimento comum que o aumento do número desse tipo celular pode levar a um processo de oclusão vascular. Embora

faltem insights quanto ao mecanismo do processo que comprovem a relação do neutrófilo com essas doenças, o diagnóstico do aumento de volume de eritrócitos e megacariócitos geralmente são acompanhados de leucocitose com desvio a esquerda. As NMP de cromossoma Filadélfia negativas (NMP-Ph⁻), também designadas por “BCR-ABL1 negativas”, é uma subcategoria operacional do grupo das NMP, que inclui a Policitemia vera (PV), a Trombocitemia essencial (TE), Mielofibrose primária (MFP) e Mielofibrose Primária pré-fibrótica (pre-MFP), (Barbui et al., 2016).

Em 2005 Campbell et al. (2005) realizaram um estudo sobre a relação da mutação V617F em gene JAK2, que foi um ponto de partida para um considerável avanço quanto ao conhecimento sobre as mutações relacionadas a patogênese dessas doenças. O avanço da compreensão dos efeitos clínicos de mutações de genes, levou a melhora na predição do prognóstico e escolha terapêutica, causando impacto direto na seleção de terapias específicas. O tratamento direcionado aos pacientes com PV e TE, tem como objetivo reduzir os riscos de eventos trombóticos utilizando terapias redutoras promovendo melhora no quadro clínico, porém, não são capazes de aumentar significativamente a sobrevida ou promover a cura da doença (Fruchtman et al., 1997; Tefferi, 2016).

Há mais de quatro décadas a HU tem apresentado excelente eficácia no tratamento das doenças supracitadas, no entanto, para além da ação mielossupressora, os efeitos antitrombóticos de hidroxiuréia passam ainda pela indução de alterações qualitativas nos leucócitos, reduzindo a expressão de moléculas de adesão endoteliais, bem como pela libertação de radicais livres de óxido nítrico (Castilho, 2017). Pacientes com essas NMP-Ph⁻ submetidos ao tratamento com HU apresentam diminuição no número de neutrófilos, estando assim sujeitos a alterações das funções essenciais dessas células. O presente estudo teve como intento atualizar dados evidenciados em estudo anteriormente citado, e investigar as implicações de HU sobre os neutrófilos, analisando a ação do principal medicamento na terapêutica de PV e TE, contribuindo para estender o conhecimento sobre essas informações ao acompanhamento clínico e estratégias terapêuticas desses pacientes.

1.1 Epidemiologias das NMPs PH⁻

A PV, TE e MFP são distúrbios mais frequentes em adultos com 50 a 70 anos com sobrevida mediana estimada de 10 a 15, 15 a 20 e 2 a 5 anos, respectivamente (Moulard et al., 2013; Rumi et al., 2017). Estudos epidemiológicos realizados em alguns países europeus mostraram uma incidência da PV que varia de 0,4 a 2,8 casos em 100.000 pessoas/ano, TE de 0,38 a 1,7 casos em 100.000 pessoas/ano e de mielofibrose (MF) de 0,1 a 1 caso em 100.000 pessoas/ano (Pedrazanni, 2016). Um estudo epidemiológico descritivo realizado na Coreia por Byun et al. (2016) avaliou que o período de 2004 a 2013, foi notório o crescimento da prevalência de TE e PV com intervalo 4,1 a 9,0 por 100.000 e intervalo de 2,8 a 5,4 por 100.000 respectivamente. Além da existência de uma grande variação nas estimativas de prevalência e incidência, até o momento não há dados referentes à América do Sul na literatura.

Em seu estudo Byun et al. (2016) identificou, prevalência de TE no sexo feminino e em PV prevalência do sexo masculino. Quanto a etnia e raça, a PV foi mais incidente em brancos. Já os leste-asiáticos representados no estudo apresentaram menor incidência, sendo mais frequente o acometimento por TE. Hispânicos e negros apresentaram maior incidência para PV e TE. Além da existência de uma grande variação nas estimativas de prevalência e incidência, até o momento não há dados referentes à América do Sul na literatura (Valente; Ribeiro, 2021).

1.2 Patogênese das Neoplasias mieloproliferativas Ph1 negativas

As NMP-Ph⁻ clássicas são um grupo de distúrbios hematológicos e são resultados de uma alteração clonal da célula-tronco hematopoiética de linhagem mielóide, a qual é maioritariamente expandida no sangue periférico. Portanto PV, TE e MFP compartilham características clínicas e laboratoriais, abordaremos características que cerceiam as duas de maior ocorrência. A diretriz de doenças mieloproliferativas (DDM) publicada em 2018 da associação médica brasileira (AMB), aponta para anomalia na via JAK-STAT que é comum entre PV, TE habitualmente causada por mutações dos genes janus kinase 2 (JAK2 V617F), thrombopoietin receptor gene, myeloproliferative leucemia (MPL) ou calreticulin gene (CALR), excludentes entre si, e necessariamente BCR-ABL1 negativas, a diretriz

alerta também que pode haver ocorrência de outras mutações concomitantes ao curso da doença, bem como alterações citogenéticas variadas.

Estudos baseados em isoenzimas da glucose-6-fosfato-desidrogenase (G6PD), análise da inativação do padrão do cromossoma-X (XCIP), perda da heterozigotismo do braço curto do cromossoma 9, demonstraram que estas doenças são hematologias derivadas da transformação de uma célula hematopoiética pluripotentes (Leibundgut et al., 2006; Delhommeau, 2007; Silva AGCC, 2010). Apesar de sofrerem mutações em gene condutor, as linhagens eritróide, granulocítica e megacariocítica não são afetadas em seu processo de diferenciação e de maturação. Na investigação para detecção de PV e TE o teste de JAK 2 (figura 1) mutação V617F são recursos de primeira linha. JAK2 V617F está presente em 95% dos doentes com PV e em 50-60% dos doentes com TE (figura 2) (Gángó et al., 2018). JAK2 possui papel importante na via de sinalização para receptores de citocinas nas células mielóides, por meio da ligação a três receptores mielóides homodímeros (EPO-R, MPL ou TPO-R e GCSF-R) (Vinchenker et al., 2011; Moura, 2012) a descoberta da mutação JAK2V 617F permitiu compreender em partes o mecanismo preciso de ativação da quinase (Levine; Gilliland, 2008).

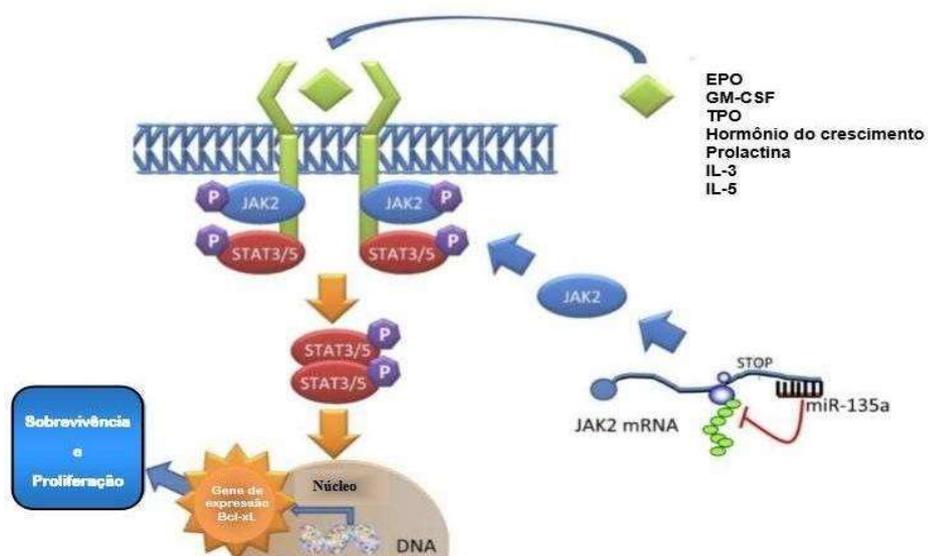


Figura 1: mecanismo de sinalização da Via JAK/STAT utilizadas por muitas citocinas nas células mielóides. Fonte: adaptado de Navarro et al., (2009); Pedrazanni, (2016).

O aminoácido que é formado pela mutação JAK2 V617F, bloqueia a alça de ativação do domínio JH1, interferindo no efeito inibitório sobre o JH1, o que resulta na eterna dimerização do receptor transmembrana, não sendo necessário o contato com um fator de crescimento para ativar a JAK2, a qual se auto-fosforila promovendo a ativação constitutiva da via JAK-STAT (Smith; Fan, 2008; Santos, 2010).

O entendimento dos mecanismos de sinalização JAK2V617F e desregulação genômica podem fornecer uma base para o desenvolvimento de estratégias terapêutica.

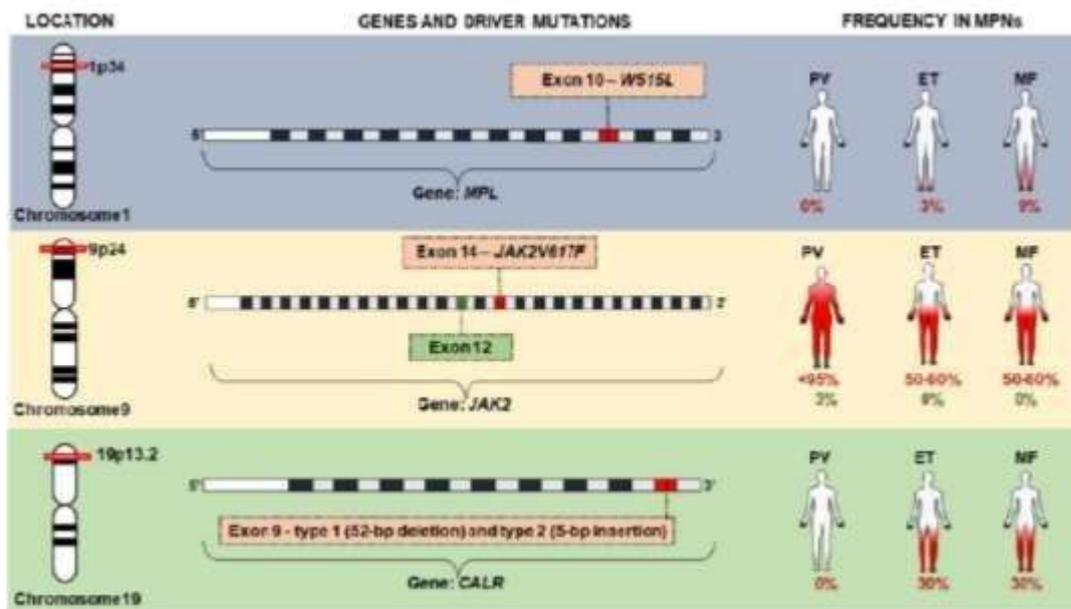


Figura 2: Mutações de condução em gene JAK2, MPL e CALR associadas a doenças mieloproliferativas crônicas. Fonte: Torres et al, (2022).

Alguns estudos analisaram os efeitos celulares na mutação JAK2V617F nas populações de células hematopoiéticas (em diferentes estágios de diferenciação), e concluíram que esta, estava associada a um aumento de células progenitoras da linhagem eritroide/megacariocítica e granulocítica/macrofágica (Grinfeld et al., 2017). A Leucocitose característica, eritrose e trombocitose nesses pacientes refletem não apenas alterações quantitativas na hematopoiese, mas também alterações qualitativas na resposta imune e na hemostasia (Francisca et al., 2021)

1.3 Policitemia vera

O desequilíbrio central na PV é a produção de eritrócitos independente de eritropoetina (EPO), o hormônio que normalmente regula a eritropoese, os níveis de EPO são baixos, os progenitores eritróides de medula óssea (MO) formam colônias EPO-independentes em culturas e a expressão de receptores de EPO e a sua habilidade de ligar-se a EPO são normais (Correa, et al.,1994; Green, 1996; Gasparotto, 2009). Tem chances de evolução para mielofibrose, mielodisplasia, e leucemia aguda (Barbui et.al., 2011; Ribeiro et al., 2009). As células eritróides, nesta patologia, mostram-se hipersensíveis a diversos fatores de crescimento incluindo interleucina-3 (IL-3), fator estimulador de colônias granulócito-macrófago (GM-CSF) e trombopoetina (TPO) o que sugere a alteração da via de transdução de sinais nestas células (Daí, 1994; Gasparotto, 2009). A poliglobulia característica desencadeada nessa síndrome é definida como o aumento contínuo do número de glóbulos vermelhos circulantes por um período superior a dois meses (Lee; Arcasory,2015).

As manifestações clínicas mais comuns são prurido, trombose, hemorragia, esplenomegalia e queixas neurológicas. (Spivak; Silver, 2008) Dentre algumas doenças relacionadas à PV destacam-se a gota e úlceras, e a ocorrência da síndrome de Budd Chiari deve ser ponderada em pacientes com PV, singularmente quando os pacientes apresentam ascite e alterações funcionais hepáticas (Buzzas et al., 2009). Há neutrofilia em 60% dos casos de PV, casualmente com presença de células imaturas (mielócitos e metamielócitos) em sangue periférico (Boyiadzis et al.,2007).

Após a revisão de classificação da OMS de 2016 (tabela 1) houve melhorias na acuidade diagnóstica, levando em consideração as mutações genéticas moleculares (JAK2 e MPL) para além dos critérios laboratoriais e morfológicos (Cardoso ANS, 2018). A Inclusão da morfologia da MO como critério maior de diagnóstico, diminuição do limiar dos valores de hemoglobina e hematócrito nodiagnóstico da PV são as principais alterações para a atualização do critério de diagnóstico a partir de 2016.

Tabela 1. Critérios da OMS 2016 para o diagnóstico de Policitemia Vera.

CRITÉRIOS MAIORES		
1. Hemoglobina	>16,5g/dL para homens	>16,0g/dL para mulher
ou		
Hematócrito	>49% para homens	>48%para mulheres
ou		
Aumento da massa eritrocitária> 25% acima do valor normal preditivo*		
2. Biópsia de MO mostrando hiper celularidade para a idade com panmielose, proliferação eritróide, granulocítica e megacariocítica com pleomorfismo e megacariócitosmaduros		
3. Ausência das mutações JAK2V617F ou JAK exon 12		
CRITÉRIOS MENORES		
Níveis baixos de eritropoietina sérica.		
O diagnóstico de PV requer atender a todos os 3 critérios principais, ou os dois primeiros critérios principais e o critério menor †		

* Mais de 25% acima do valor previsto normal.† O critério número 2 (biópsia MO) pode não ser necessário em casos com eritrocitose absoluta sustentada: níveis de hemoglobina .18,5 g / dL em homens (hematócrito, 55,5%) ou 0,16 g / dL em mulheres (hematócrito, 49,5%). Se o critério principal 3 e o critério menor estiverem presentes. No entanto, a mielofibrose inicial (presente em até 20% dos pacientes) só pode ser detectada através da realização de uma biópsia MO; essa descoberta pode prever uma progressão mais rápida para a mielofibrose aberta (pós-PV MF). Fonte: Arber et al. 2016

*

1.4 Trombocitemia Essencial

A TE envolve principalmente a linhagem megacariocítica, com alterações que podem ser quantitativa e/ou qualitativa. É caracterizada por trombose sustentada em sangue periférico, aumento do número de megacariócitos maduros e grandes na medula óssea, e clinicamente quadros de trombose e/ou sangramento e fenômenos vasomotores (Zago et al., 2013). É definida pela OMS como plaquetose persistente, superior a 600.000/mm³, e hiperplasia megacariocítica na medula óssea. O principal fator de crescimento que regula fisiologicamente a trombopoiese é a TPO, que atua através da ligação ao seu receptor na superfície celular, o MPL (Myeloproliferative leukemia vírus oncogene).

O mecanismo desencadeante para a TE não está bem elucidado, contudo, percebe-se a relação entre a superprodução de megacariócitos e a trombopoetina.

O receptor de TPO está envolvido na via de sinalização JAK- STAT, desempenhando um papel importante na renovação hematopoiética das células progenitoras CD34+, diferenciação megacariocítica e formação de plaquetas (Royer et al., 2005; Pecquet et al., 2010; Defour et al., 2013). Por não haver um marcador específico genético ou biológico, outras causas de trombocitose devem ser descartadas (Campo et al., 2008; Pedrazanni, 2016), devendo seguir os critérios diagnósticos da OMS (2016) (tabela 2).

Tabela 2. Critérios da OMS 2016 para o critério diagnóstico de Trombocitemia Essencial

CRITÉRIOS MAIORES

1. Plaquetas > 450 x 10⁹/L.
2. Biópsia de MO mostrando proliferação principalmente da linhagem megacariocítica com aumento do número e do tamanho, megacariócitos com hiperlobularidade nuclear. Sem aumento significativo ou desvio à esquerda na granulopoieseneutrofílica ou eritropoiese e um muito raro pequeno aumento na fibra reticulínica (grau 1).
3. Ausência dos critérios da OMS para LMC BCR-ABL⁺, PV, MFP, SMD ou outras neoplasias mielóides.
4. Presença das mutações JAK2, CALR ou MPL.

CRITÉRIOS MENORES

Presença de um marcador clonal ou ausência de evidencia para trombocitose reativa.

O diagnóstico de ET exige reunir os 4 principais critérios ou os 3 primeiros critérios principais e o critério menor

Fonte: Arber et al. 2016. Tabela 2. Critérios da OMS 2016 para Trombocitemia Essencial

Os principais sintomas clínicos da TE são cefaleia, dor torácica, síncope, alterações na visão, esplenomegalia, atrofia esplênica, eritromegalia, livedo reticular, hemorragia e trombose (Zago et al., 2013). Um número significativo de pacientes apresentam-se assintomáticos e tendem a manter-se desta forma até o diagnóstico da doença. Já os pacientes sintomáticos têm quadros clínicos caracterizados pelas complicações trombo-hemorrágicas. O diagnóstico deve atender a todos os quatro critérios maiores ou os três primeiros maiores e o menor, definidos pela OMS, (Arber et al., 2016).

1.5 Neutrófilos e NMPs Ph1 negativas

A trombose arterial e venosa é a principal causa de mortalidade de pacientes com as NMPs Ph1 negativas. Classicamente, a relação fisiopatológica entre leucocitose e trombose no nas NMPs Ph¹ negativas tem sido explicada pelo aumento do componente celular e pela interação dessas células com o endotélio e com as plaquetas ativadas (Falanga et al., 2014). A trombose arterial e venosa é a principal causa de mortalidade de pacientes com as NMPs Ph1 negativas. No que diz respeito à leucocitose, numerosos estudos têm demonstrado sua relevância como fator de risco trombótico (especialmente de trombose arterial) tanto na VP quanto no TE (Barbui et al., 2009). Um grupo italiano relatou, que a contagem de leucócitos em pacientes com TE, no momento do primeiro evento trombótico, previu trombose arterial recorrente em pacientes com NMP de baixo risco (Tefferi et al 2007).

Em um dos maiores estudos epidemiológicos em PV, o estudo ECLAP que incluiu mais de 1.600 pacientes, leucocitose basal $>15 \times 10^9/L$, em oposição a $<10 \times 10^9/L$ previu infarto do miocárdio, mas não trombose venosa (Landolf et al 2007). Em uma meta-análise de artigos publicados nos últimos 12 anos (anteriores ao estudo), abordando sobre a relação de leucocitose com as NMPs crônicas, Carobbio et al. (2019) apresentou dentre os resultados que o efeito da leucocitose, foi mais forte no TE do que no PV e parece estar relacionado exclusivamente a eventos arteriais (incluindo eventos recorrentes). Além disso, a associação da contagem de leucócitos com trombose foi confirmada nos cinco estudos incluídos nesta meta- análise que usaram medidas de leucócitos dependentes do tempo (Carobbio et al., 2019). Os Neutrófilos derivados das ERO podem induzir lesão endotelial celular e modificar as funções que eles têm na tromboregulação (Hurtado-nedelec et al. 2013).

O papel dos neutrófilos no processo de oclusão vascular e comprometimento funcional dos órgãos adjacentes se devem ao principal fato de serem células relativamente grandes (12-15 μ m) e rígidas. O seu recrutamento para a microcirculação reduz o fluxo sanguíneo dos vasos, devido a adesão às paredes do endotélio ativado e pelas interações adesivas com hemácias, plaquetas ou outros leucócitos circulantes, retendo e formando agregados celulares que obstruem ainda

mais o lúmen vascular. A estimulação do endotélio vascular aumenta sua expressão de ligantes para moléculas de adesão nas células sanguíneas, induzindo dano tecidual, infarto de órgãos adjacentes e reação inflamatória que predis põem e prolongam as CVO (Charache et al.,1996; Okpala, 2004; Souza, 2007; Miguel, 2010; Pedroza, 2013)

1.6 O Neutrófilo

1.6.1 ASPECTOS GERAIS

Na medula óssea, a produção de neutrófilos ocorre a partir de células hematopoiéticas pluripotentes, sob estímulos de numerosos mediadores, em especial os fatores de estímulos de granulócitos (G-CFS) e de colônias de granulócitos e monócitos (GM-CFS) (Pedrosa, 2013). São os leucócitos mais abundantes do sistema imune possuem uma meia-vida que pode variar entre 6 a 12 horas na circulação, esse tempo de meia-vida pode se prolongar pela ação de alguns agentes ou processos, chegando a estender a vida dessas células há alguns dias (Ameida et al. 2012), possuem diâmetro de aproximadamente 12 a 15 µm, morfologicamente são classificados como células polimorfonucleadas (PMNs). Apresentam um núcleo lobulado e são denominados granulócitos, pois possuem diversos grânulos no citoplasma, que são delimitados por membranas que armazenam proteínas essenciais às suas funções (Luz, 2004; Vital., 2015), (figura 3).

São as primeiras células a serem recrutadas da corrente sanguínea para o sítio de inflamação, sendo por essa razão, apreciados como a primeira linha de defesa do organismo e células efetoras centrais no sistema imune (Johnson et al 1992; Luster et al., 2005; Cascão et al., 2009; Pedrosa 2013). Os grânulos neutrofílicos distinguem-se entre si pela sua morfogênese e citoquímica, bem como pela composição de suas membranas e conteúdo em moléculas citotóxicas responsáveis pela degradação de patógenos para a defesa do hospedeiro (Borregaard et al., 2007; Dale et al., 2008; Freitas., 2009).

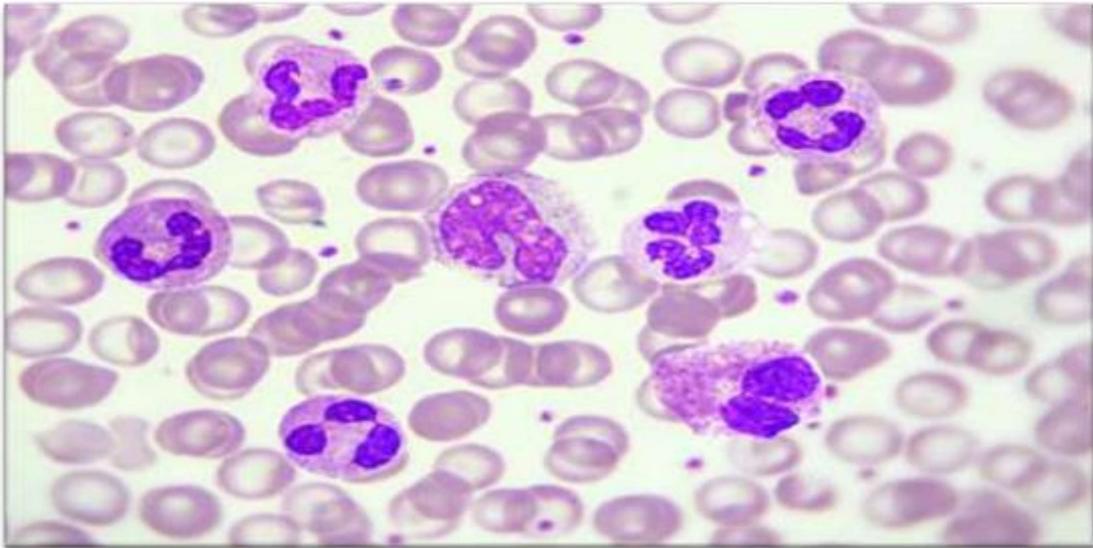


Figura 3.: neutrófilos segmentados Estrutura polimorfonuclear com grânulos Citoplasmáticos Fonte: adaptado baxter 2005

Os grânulos dos neutrófilos são formados durante a granulopoiese em uma sequência de eventos de diferenciação, iniciando-se no estágio de promielócito, onde surgem os primeiros grânulos (primários), também denominados de azurófilos devido a sua afinidade pelo corante azul, contendo em seu interior: hidrolases ácidas, enzimas microbidas, mieloperoxidase (MPO), lisosima, proteinases neutras (elastase, catepsina G e proteinase 3 - PR3) (Faurischou; Borregaard, 2003; Radu et al., 2005; kumar et al., 2010). Durante estágio de metamielócito são formados grânulos secundários e as proteínas destes grânulos são essenciais contra peptídeos antimicrobianos que induzem a quimiotaxia em neutrófilos. Os grânulos terciários e destacam-se como reservatórios de enzimas de degradação de componentes do tecido conjuntivo e de receptores de membrana, necessários durante extravasamento e diapedese do neutrófilo (Borregaard et al., 1997; kang et al., 2000; Cascão et al., 2009; Freitas et al., 2009). Quando atingem a última fase da maturação os neutrófilos desenvolvem vesículas secretórias altamente mobilizáveis, ricas em citocromo b558, receptores e proteínas sinalizadoras, não se dividem e contém núcleos lobulados.

Essas células são de curta duração, e a capacidade dos neutrófilos de matar micróbios fagocitados é bem maior do que de qualquer outro fagócito (Kauffman, 1993; Levy, 2004; Segal, 2005) assim os neutrófilos, além de possuírem

como principais atividades funcionais a migração orientada para o local da infecção (quimiotaxia), aderência e englobamento de agentes patogênicos (fagocitose), e a destruição dos microrganismos invasores através da liberação de EROs e de substâncias tóxicas presentes em seus grânulos, também são capazes de controlar as funções de outras células do sistema imunológico, contribuindo, de forma crucial, para a resolução da resposta imune. Em virtude deste seu duplo papel anti-infeccioso e pró-inflamatório, são “células-chave” tanto na imunidade inata como na humoral (Kuijpers, 2002; Okpala, 2004; nagatomi, 2006; cascão et al., 2009; Pedrosa, 2013).

1.6.2 FAGOCITOSE

A fagocitose é um mecanismo de defesa essencial da resposta imune inata. Em princípio a desgranulação se assemelha a uma fusão da membrana, e acontece na membrana plasmática. Esse processo ocorre a partir do contato da célula fagocitária com o agente invasor e é acompanhado de sinais que ativam processos celulares tais como rearranjo do citoesqueleto, ativação de mecanismos microbicidas, produção de citocinas pró e anti-inflamatórias, ativação de apoptose celular e mecanismos de apresentação de antígenos para as células do sistema imune adaptativo (Underhill et al, 2002; oliveira, 2012). A fagocitose acontece após o reconhecimento e captação do patógeno, sinalização intracelular e junção da atividade fagocitária à resposta inflamatória local e sistêmica.

Na fagocitose intracelular, as sinalizações da presença de partículas sinalizadoras induzem a polimerização de moléculas de actina e a membrana citoplasmática estende-se por toda a partícula invasora, levando-a ao centro da célula. Assim o fagossoma se transforma em fagolisossoma resultando na liberação do conteúdo enzimático de grânulos primários e secundários que são ricos de hidrolases ácidas, enzimas microbicidas, mieloperoxidase (MPO), lisosima, proteinases neutras (elastase, catepsina G e proteinase 3 - PR3), levando o patógeno a ser morto e digerido (Aderem, 2003; Pedroza, 2013) (figura 4).

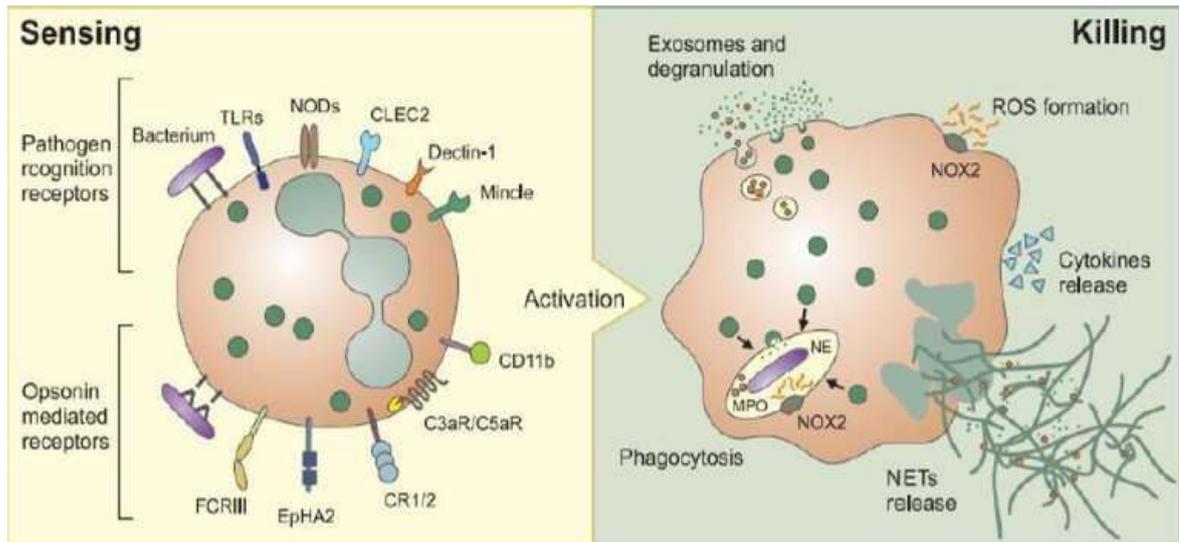


Figura 4: ilustração de Receptores de patógenos em neutrófilo inativo e exposição de patógenos ao seu vasto arsenal de substâncias tóxicas após fagocitose como MPO, ROS e citocina. Fonte: Adaptado de the neutrophil 2021.

Em adultos saudáveis, os neutrófilos circulantes encontram-se em estado de repouso, o que garante que seu conteúdo intracelular tóxico não seja acidentalmente liberado e provoque danos aos tecidos adjacentes, porém, podem ser ativados por produtos bacterianos, citocinas ou quimiocinas, como por exemplo: fator de necrose tumoral- α (TNF- α), GM-CSF, interleucina-1 (IL-1), IL-6, IL-8 e interferon- γ (IFN- γ) ou outras substâncias produzidas pelas próprias células do tecido lesado, e migrarem em número elevado para as áreas de inflamação (Medzhitov, 2010; Wright et al., 2010; Okin et al., 2012). Uma vez ativados, os neutrófilos participam da regulação da amplitude e duração da resposta imune (Souza, 2007).

1.6.3 NADPH OXIDASE E ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ERO)

A NADPH oxidase (Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina) é um complexo enzimático localizado na membrana plasmática dos fagócitos, e é composto pela junção de vários constituintes na membrana citoplasmática em resposta a um sinal que ativa o neutrófilo. Dentre estes compostos estão as proteínas citosólicas de 47 KD, 67 KD, denominadas respectivamente p47-phox e p67-phox, uma proteína G citossólica, denominada p21 rac, e um citocromo b558 ligado à membrana, sendo este constituído por uma subunidade protéica de 22 KD, p22phox, e uma subunidade de glicoproteína de 91

KD, gp91phox, ambas contendo o grupo heme (Rosen et al. 1999; pessoa, 2009; Sarges ES 2018).

O NADPH oxidase permanece inativo nas células em estado de repouso, a partir do momento em que há presença de um patógeno ou um estímulo externo, o seu estado se torna ativado, promovendo o mecanismo microbicida oxidante, que catalisa a produção de ânion superóxido (O_2^-) no fagossoma (Karlsson et al. 2000; Orso, 2013). A função desse complexo enzimático, é transportar elétrons do NADPH no sítio citoplasmático para o oxigênio no fluido extracelular, ou no espaço intra-fagossômico para formar O_2^- . Quando estimulados seja por fatores ambientais, mediadores inflamatórios ou durante o processo de fagocitose, os neutrófilos aumentam o consumo de oxigênio, acarretando em um conjunto de alterações metabólicas que culminam na formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), ou „burst“ oxidativo ou explosão respiratória.

O aumento do consumo de oxigênio e de ATP (trifosfato de adenosina), aumento da oxidação da glicose pela via da hexose monofosfato, do transporte de elétrons e da origem de radicais livres é caracterizado como explosão respiratória onde se destaca EROs e as espécies reativas de nitrogênio (ERN). A produção de O_2^- a partir do oxigênio molecular (O_2), leva à formação de H_2O_2 e radicais de OH, os quais podem, eventualmente serem convertidos pela enzima MPO em outros oxidantes reativos, como ácido hipocloroso (HOCl) (Pedrosa, 2013). a MPO por sua vez é capaz de catalizar peróxido de hidrogênio como co-substrato, transformando-o em $HOCl^-$, este é um poderoso oxidante, que trabalha na defesa imune inata do organismo (Hampton et al., 1998; Pessoa, 2009). Em uma explosão de ROS o NADPH é necessário e esgotado rapidamente; portanto sua (re)geração é fundamental na funcionalidade dos neutrófilos. (Azevedo et al., 2015)

1.7 Hidróxiuréia

As possibilidades terapêuticas até o presente momento para a PV e TE, não são curativas, apenas prolongam a sobrevida e diminui a morbidade da doença (Beer; Green, 2009). Os tratamentos para estas patologias baseiam-se nos fatores de risco dos pacientes de acordo com a classificação da OMS. Deste modo, dever ser claro tanto para o médico como para o doente que os fármacos utilizados têm

como principal objetivo a prevenção de fenômenos trombóticos e o alívio dos sintomas, se presentes (Tefferi et al., 2015). A HU é um agente basilar da terapêutica citorrredutora. Tem um perfil de toxicidade de curto prazo aceitável na maioria dos pacientes e atualmente é usada como agente de primeira linha em neoplasias hematológicas, como neoplasia mieloproliferativa (MPN) caracterizada por uma mutação na Janus quinase 2 (JAK2), calreticulina (CALR), e genes do oncogene do vírus da leucemia mieloproliferativa (MPL) (Sokol et al., 2018), HU tem sido alvo de interesse científico há mais de 100 anos.

Foi sintetizado pela primeira vez, em 1869, na Alemanha, por Dresler e Stein. Somente no século seguinte, no ano de 1967, este medicamento foi aprovado pelo FDA para o tratamento de doenças neoplásicas, e, nos anos posteriores, para o tratamento de pacientes com leucemia mieloide crônica, psoríase, doenças reumáticas e PV, dentre outras (Pedrosa, 2013). Há quatro décadas tem sido o agente de escolha de primeira linha nas NMPs Ph1 negativas devido a sua fácil administração, a baixa toxicidade, bem como o baixo custo e os múltiplos benefícios de ordem clínica, garantem à hidroxiureia lugar de destaque em vários esquemas terapêuticos (McGann; Ware, 2011; Vital, 2015). A escolha da hidroxiureia como terapêutica de primeira-linha assenta em diversos estudos que demonstram uma superioridade da hidroxiureia em relação ao placebo e a outros agentes terapêuticos alternativos (Castilho BEM, 2017).

A HU é absorvida pelo trato gastrointestinal, e após 1h 30 minutos da ingestão atinge picos sanguíneos tendo disponibilidade de quase 100% possui solubilidade em água e entra na célula por meio de difusão passiva, possui uma meia vida de 3 a 4 horas no organismo sendo excretado via sistema renal (Rodriguez et al., 1998; Gwilt; Tracewell, 1998; Seguin, 2017). A utilização deste fármaco em pacientes com PV e TE é justificada por induzir a citorredução, no qual, inibe a síntese de DNA, através de bloqueio da enzima ribonucleoside redutase, que converte os ribonucleotídeos para desoxiribonucleotídeos que são necessários para a síntese de DNA (Naoum, 2000; Silva; Shimauti, 2006).

Diversos estudos demonstraram que a HU diminui a expressão de moléculas de adesão na fibronectina e o ICAM-1 são significativamente diminuídos quando comparados a pacientes sem o uso do HU (Sarges ES, 2018). Esse fármaco reduz a

progressão da forquilha de replicação e a taxa de replicação do DNA, elimina seletivamente as células na fase S de células altamente proliferativas que são mais sensíveis ao fármaco, os efeitos citotóxicos da HU também dependem da dose e duração da exposição (Vladan, 2021).

Sabe-se que este fármaco pode exercer efeitos citotóxicos através de reações em cadeia de radicais via H₂O₂ e iniciadas por seu grupo hidroxilamina. Por outro lado, os sequestradores de radicais reduzem substancialmente as atividades citotóxicas e teratogênicas de HU. Ainda que os mecanismos moleculares envolvidos pelos quais a HU regula a expressão dessas proteínas, não tenham sido bem elucidados até o momento, a deficiência induzida dessas proteínas reguladoras do estresse oxidativo contribui significativamente para a elevação de ERO pela HU e o estabelecimento da senescência celular (Vladan et al 2021).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral:

Analisar *in vitro* as alterações qualitativas nos neutrófilos circulantes obtido de pacientes com Policitemia Vera e Trombocitemia Essencial em uso de hidroxiuréia.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o número de neutrófilos circulantes de pacientes portadores de policitemia vera e trombocitemia essencial, após o início do tratamento com hidroxiuréia, através do hemograma a fim de determinar se há aumento ou diminuição desse tipo celular;
- Avaliar o efeito do tratamento com hidroxiuréia sobre a função fagocítica, *in vitro*, dos neutrófilo a fim de avaliar a qualidade dessas células;
- Avaliar se a hidróxiuréia afeta além da capacidade fagocítica, a função citotóxica da célula;
- Avaliar o metabolismo oxidativo através da ativação do sistema NADPH-oxidase dos neutrófilos pelo teste de redução do tetrazólio nitro azul , para avaliar se há comprometimento de funções bactericidas dos neutrófilos.

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 Casuística

Todos os pacientes incluídos no estudo aceitaram participar da pesquisa e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Todos atenderam aos critérios de inclusão e as amostras foram obtidas no ambulatório de hemoterapia do hospital Ophir Loyola (HOL). Foram incluídos no estudo, pacientes portadores de PV e TE de ambos os sexos, com idade entre 30 e 80 anos, com presença de comorbidades aceitáveis para o estudo (hipertensão e diabetes) e pacientes que estavam utilizando somente HU como citoreduzidor para o tratamento. A captação necessária de amostra foi baseado na fórmula do cálculo amostral (vide anexo A). Foi então realizada divisão em grupos de acordo com a doença. Totalizando 11(44%) pacientes com PV 14 (56%) com TE. Não foram incluídos pacientes que apresentaram recusa em participar do estudo, e/ou aqueles em estado de imunossupressão (diagnóstico de doença imunossupressora), pacientes em estado terminal e pacientes período de tratamento menor que 12 meses.

O grupo controle foi constituído por amostras de 24 indivíduos, oriundos da região metropolitana de Belém, que assinaram o TCLE e não apresentaram alterações hematológicas, para assim serem pareados de acordo com o gênero e idade junto aos pacientes com PV e TE. Foram excluídos indivíduos que relataram ter apresentado febre ou refriado no mês antecedente a coleta, pois essas condições podem desencadear ativações na produção de vários tipos celulares.

3.2 Aspectos éticos

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisas envolvendo seres humanos (CEP) do Hospital Universitário João de Barros Barreto, sob o número de parecer 2.035.172 e CAAE: 64964917.6.0000.0017. Todos os participantes foram orientados especificamente sobre os objetivos do estudo, assim como todos os benefícios, riscos e procedimentos envolvidos no protocolo de pesquisa.

3.3 Amostras biológicas

As coletas de material biológico foram realizadas durante o período de Abril de 2018 a Setembro de 2019. Conforme consultas das especialidades mieloproliferativas, no ambulatório de atendimento do HOL. Foram coletados 10mL de sangue periférico em tubos a vácuo contendo EDTA (sistema Vacutainer®). Sendo mantidas em temperatura adequada entre e 2 °C e 6 °C e encaminhadas ao laboratório de hematologia da faculdade de farmácia da UFPA.

3.3.1 REAGENTES

No presente estudo foram utilizados ácido etilenodiaminotetracetato (EDTA) 2% (BIOLAB) como anticoagulante da amostra em tubo de coleta sanguínea, Histopaque®-1077 (SIGMA-ALDRICH®), tampão fosfato salina (PBS) 10x (16 g de NaCl, 0,4 g de KCl, 4,336 g de Na₂HPO₄·7H₂O e 0,4 g de KH₂PO₄ em 200 mL de água destilada), para purificação dos neutrófilos, solução de hemólise (16,05 g de NH₄CL, 1,680 g de NaHCO₃, 0,74 g de EDTA em 2 litros de água destilada) para obtenção de células neutrofílicas RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), soro fetal bovino (SFB) 0,01% e penicilina estreptomicina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), para estimativa dos neutrófilos, corante leishman (1,5 g de Eosina Azul de Metileno segundo Giemsa em 1 litro de Metanol) para coloração da distensão sanguínea. Tetrazólio nitroazul (Sigma-Aldrich), anti-CD45 (PerCP), anti-CD16 (PE) (BD Pharmingen TM California, USA, Exbio), para o teste de fagocitose.

3.3.2 DETERMINAÇÃO DO HEMOGRAMA

As amostras foram analisadas no laboratório de hematologia da faculdade de farmácia da UFPA por meio de metodologia, semi- automatizada utilizando o contador ABX micros 60, que analisou dos seguintes parâmetros: hemácias, hemoglobina, hematócrito, Volume Corpuscular Média (VCM), CHCM (Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média), RDW (Redcell volume DistributionWidth),

leucócitos totais e plaquetas. Foi realizado distensão de esfregaço em todas as amostras. Em seguida as lamínas foram coradas com Leishmann (corante padrão do laboratório de hematologia da farmácia-UFPA). As lâminas com distensão sanguínea foram submetidas à microscopia óptica como método para a visualização dos elementos celulares como contagem diferencial. Com a obtenção dos resultados deste exame, foram analisados o valor absoluto de neutrófilos e linfócitos com o objetivo de avaliar quantitativamente estas células sob efeito do tratamento. Foi definido como neutropenia número de neutrófilos absolutos <1.000-1500 e de linfopenia número de linfócitos absolutos <1.000 de acordo como critério da avaliação médica do HOL.

3.4 Avaliação da função fagocítica de neutrófilos circulantes

3.4.1 OBTENÇÃO E PREPARO DOS NEUTRÓFILOS CIRCULANTES

A fim de realizar a obtenção de neutrófilos foi adicionado 5 ml de sangue com 5 mL de solução salina 0,9% (proporção 1:1) e homogeneizado suavemente em tubo Falcon® 15mL , a solução homogeneizada foi transferida para um novo tubo falcon contendo 3mL de Histopaque®-1077 (Figura 5-A), e centrifugado por 30 minutos à 1500 RPM (Figura 5-B) em seguida o sobrenadante foi descartado e a camada dos neutrófilos foi transferida para um novo tubo Falcon®, no qual foi acrescentado a solução de hemólise (Figura 5-C) e centrifugado por 10 minutos à 1400 RPM, em dois ciclos sequenciais.

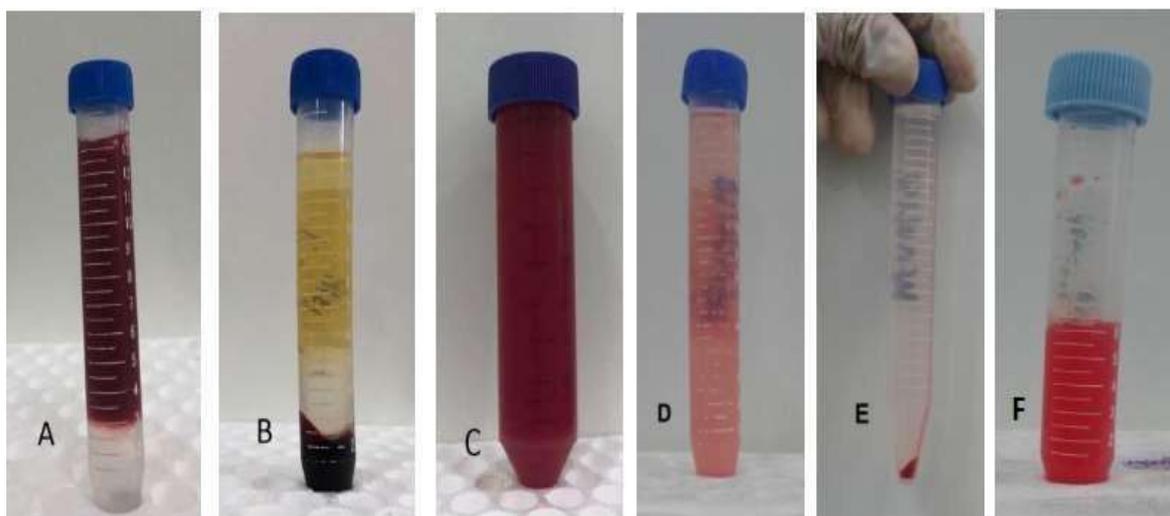


Figura 5: Ilustração da obtenção de leucócitos do sangue periférico. (A) tubo falcon contendo sangue:salina (1:1) com histopaque. (B) Após centrifugação. (C) Lavagem das células com solução de hemólise. (D) Lavagem das células com solução salina. (E) Após centrifugação pellet de células. (E) Pellet ressuspendido em 5 mL de RPMI completo. Fonte: autor.

Após processo de obtenção dos neutrófilos, foi adicionado PBS 1x até completar o volume do tubo para a realização da „lavagem“ da célula (Figura 5-D), então centrifugado novamente por 10 minutos à 1400 RPM, sendo então descartado o sobrenadante, deixando apenas o pellet de células (Figura 5-E) que foi ressuspenso em 5 ml de RPMI completo (Figura 5-F). Foi realizada a contagem total e diferencial das células obtidas. Para contagem total foi utilizado 20 μ l da solução de células e foram adicionados à solução de Turk (380 μ l), e contadas em câmara de Neubauer. A contagem diferencial foi realizada em lâmina preparada com 20 μ l da solução de células em citocentrífuga (150 x g, 10 min, Cito-Spin) e corada com Leishmann.

Foram contadas 100 células em microscópio de luz, com objetiva em óleo de imersão (100x) diferenciando-se os tipos celulares em mononucleares, neutrófilos, eosinófilos e basófilos. contagem diferencial foi realizada em lâmina preparada com 20 μ l da solução de células em citocentrífuga (150 x g, 10 min, Cito-Spin) e corada com Leishmann. Foram contadas 100 células em microscópio de luz, com objetiva em óleo de imersão 100x) diferenciando-se os tipos celulares em mononucleares, neutrófilos, eosinófilos e basófilos.

3.4.2 AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO FAGOCÍTICA

Os neutrófilos obtidos foram utilizados na concentração de $1,0 \times 10^6/\text{ml}$, e o zimosan sensibilizado com plasma normal fresco, utilizado como partícula fagocítica. Para o preparo de solução de células e partículas foi pesado 0,014g de partículas de zimosan e diluídas em 50 mL de PBS1x. Desta suspensão, foram pipetados 142 μl e então adicionados em 142 μl de plasma dos pacientes em eppendorf, então foram levados a incubação na câmara de CO_2 (37°C , 5% CO_2). A solução de células e partículas foi incubada em uma placa de cultura de 96 poços por uma hora (1h) (37°C , 5% CO_2), em seguida, as células foram cito centrifugadas e coradas. Foram contadas 100 neutrófilos em cada lâmina, com e sem fagocitose, como também o número de partículas fagocitadas (figura 6). Os resultados foram expressos por meio do Índice Fagocítico (IF): $\text{IF} = \% \text{ neutrófilos em fagocitose} \times \text{número médio de partículas fagocitadas}$ (Fernandes J, 2006).

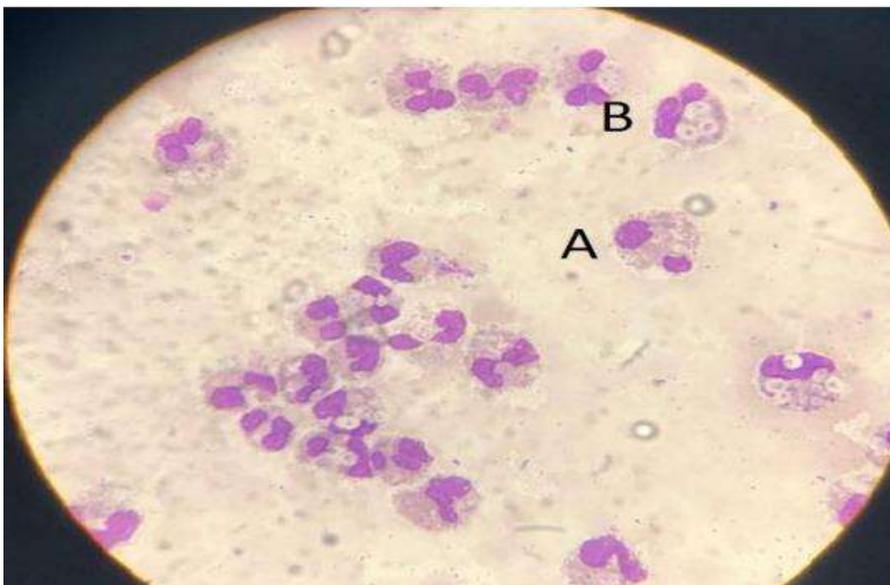


Figura 6: Neutrófilo sem partícula fagocitada (A); neutrófilo fagocitando partículas de zimosan(B)
Fonte: Sarges E.S (2018).

3.4.3 ENSAIO DE REDUÇÃO NITROBLUE TETRAZOLIUM (NBT)

O metabolismo oxidativo dos neutrófilos foi estimado através da produção de superóxido pelo teste citotóxico de redução espontânea do tetrazólio nitroazul (NBT). Esse composto solúvel de coloração amarela quando reduzido dentro da célula, é convertido em grânulos insolúveis de formazan decoloração preto- azulada (Nathan, 1973; Joandes, 2015). Para realização do método, foi utilizada uma placa de petri onde foi colocada um recipiente de polipropileno com capacidade para 5ml de solução, bem no centro da placa e ao redor colocava-se gaze umidificada. Após a organização do material adicionava-se 200 µl de sangue total e 200 µl de solução de trabalho de NBT no recipiente de polipropileno (5 ml), após homogeneização foram levadas para a estufa de CO₂ (5%) a 37°C durante 25 minutos e após 10 minutos em temperatura ambiente era realizada distensão sanguínea, nesse momento era utilizado corante através do método wright para realização decoloração. O esfregaço sanguíneo foi examinado por microscópio de luz (40 x e 100x imersão em óleo). A contagem de 100 neutrófilos por meio de microscopia óptica foi realizada a fim de determinar o número percentual de neutrófilos reativos ao NBT.

3.5 Análise estatística

Os dados obtidos nos grupos estudados foram comparados através de testes estatísticos, dependendo de como foi avaliada sua distribuição. No caso de distribuição gaussiana foi utilizado o teste — t de Student II e ANOVA. Nas análises efetuadas os parâmetros analisados foram considerados significativamente diferentes quando $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Perfil clínico e hematológico dos grupos de pacientes e controle.

A tabela 3 mostra os dados epidemiológicos e clínico dos indivíduos controles e pacientes. Houve prevalência do sexo feminino em ambas as doenças com 64% em PV e TE. A média de idade é predominante na sexta década de vida para pacientes com PV e quinta década para portadores de TE. Quanto a raça houve predominância de pardos: em PV 46% pardos, 27% brancos e 27% negro, e em TE apresentaram-se 79% pardos 14% brancos e 1% negros.

Tabela 3: Perfil epidemiológico dos grupos de pacientes e controles com os seguintes dados: sexo, raça, idade em média e desvio padrão e tratamento.

	GRUPO CONTROLE N=24	PACIENTES COM PV N=11	PACIENTES COM TE N=14
SEXO			
FEMININO	14(58%)	7(64%)	21(64%)
MASCULINO	10(42%)	4(36%)	8(36%)
RAÇA			
BRANCO	6 (25%)	3(27%)	2(14%)
PARDO	14(58%)	5(46%)	11(79%)
NEGRO	4 (17%)	3(27%)	1(7%)
IDADE			
-	51±17	68±12	59±13
TRATAMENTO			
HU	-	11(100%)	14(100%)

4.2 Dados do hemograma

Destaca-se que 55% dos pacientes deste estudo apresentaram eritrose sustentada com Hb>18.5 g/dL em PV (ANEXO C) e contagem plaquetária > 450 x 10⁹/L em TE.

Tabela 4: Média e desvio padrão de dados hematológicos

PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS	GRUPO CONTROLE N=24	PACIENTES COM PV N=11	PACIENTES COM TE N=14
HEMOGLOBINA (g/dl)	13,7±0,5	8±3,75	12,2±2,5
HEMATÓCRITO (%)	44,3±2,0	45,7±3,75	38,6±5,5
LEUCÓCITOS (mil/mm ³)	4,265±0,1	5,610±2,5	5,180±2,0
PLAQUETAS (mil/mm ³)	223±16,2	337±114,2	468±222,7

0,05 ≤ P < 0,010 quando Comparados grupo controle,05 e pacientes com PV E TE.

É possível observar que nos pacientes do estudo a média de Hemoglobina, hematócrito e leucócitos, encontra-se dentro dos parâmetros de referência aceitáveis para o controle da doença (vide tabela 1 e 2) e se assemelham aos resultados do grupo controle, porém a média das plaquetas apresenta-se elevada

A tabela 5 mostra a média e desvio padrão de números absolutos de neutrófilos e linfócitos, sobre a influência de diferentes doses administradas de HU conforme cada fase de tratamento da doença. Os números absolutos dessas células são importantes prognósticos para avaliar o estadiamento de PV e TE.

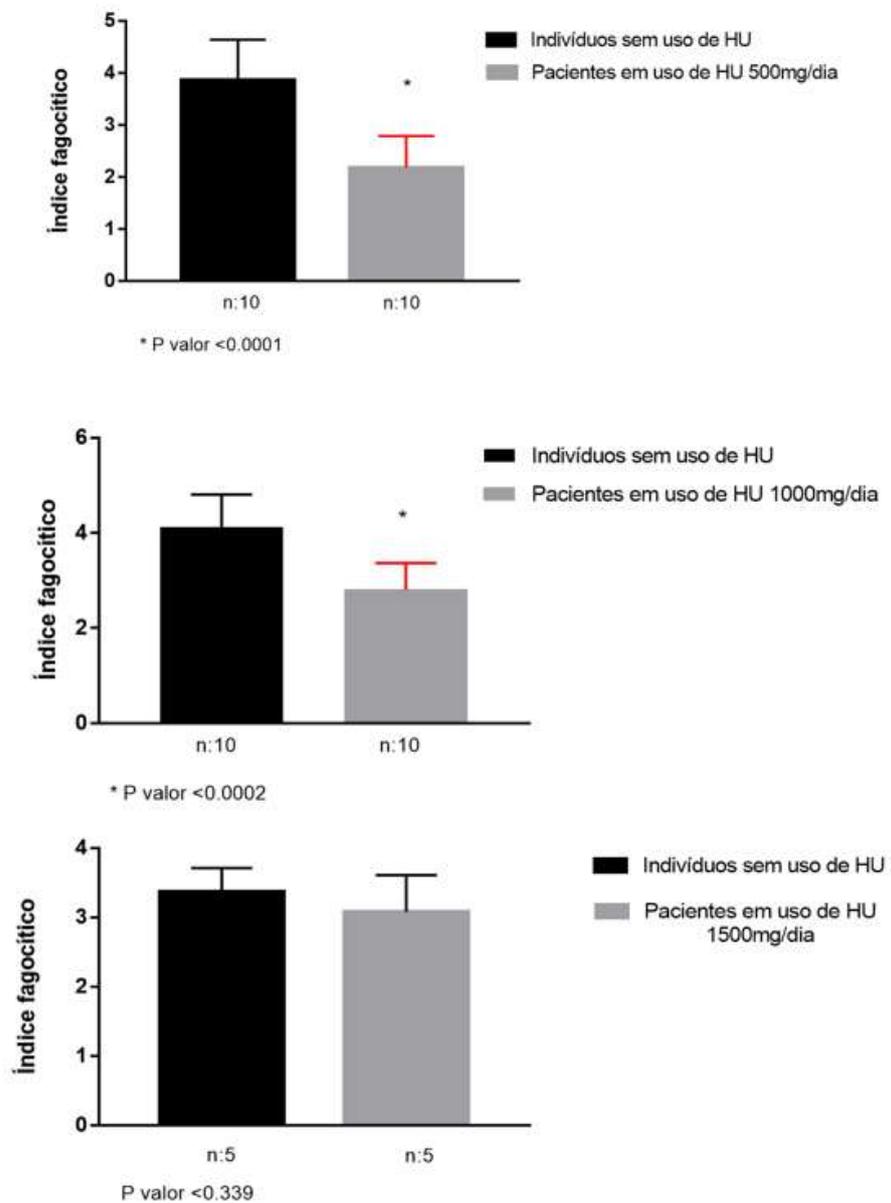
Tabela 5: média e desvio padrão dos neutrófilos e linfócitos absolutos, sobre a influência de diferentes dosagens de HU administradas nos pacientes.

Dose – mg	Média e Desvio padrão neutrófilos absolutos	p-valor	Média e Desvio padrão dos linfócitos absolutos	p-valor
500	7,42±6,3	<0.001	6,11±3,1	<0.001
1000	6,47±5,6	<0.001	5,93±5,6	<0.001
1500	5,14 ±2,1	<0.001	3,00±2,1	<0.001

4.3 Avaliação da Função Fagocítica

Para avaliar a capacidade funcional do neutrófilo de fagocitar um agente invasor, foi realizado o teste de fagocitose em todas as amostras, foram comparados os IFs nos indivíduos controles e nos pacientes respectivamente de acordo com as doses utilizadas: 500mg (2,17±0,19; 3.85±0,24) p<0,001, 1000mg (2,80±0,17;4,12±0,21) p<0,002 e 1500mg (3,07±0,23;3,36±0,15) p <0,339.

Figura 7 : Capacidade fagocítica de controle (25) e pacientes com PV(11) e TE(14). As barras representam as medianas (linha horizontal) e os percentis, e as linhas verticais os valores mínimos e máximos. * $p < 0,05$ (t-student)



4.4 Nitroazul Tetrazólio – NBT

O teste de NBT foi realizado a fim de avaliar se além da fagocitose outras funções de neutrófilos poderiam estar comprometidas, como a capacidade citotóxica da célula neutrofilica, foi realizado o teste em todos os grupos: TE, PV e Controle (Figura 8). Os pacientes portadores de PV e TE não apresentaram diferença significativa quando comparados aos indivíduos controles ($6 \pm 1,17$ - 5 ± 2) $p=0,22$ e ($5.5 \pm 1,94$ - 5 ± 2) $p=0,55$ respectivamente. Considerou-se neutrófilo NBT-positivo quando este apresentou qualquer grânulo intracitoplasmático de coloração azul a negro, independente do número e tamanho, desde que estes fossem claramente diferenciados das granulações tóxicas e corpúsculos de Döhle.

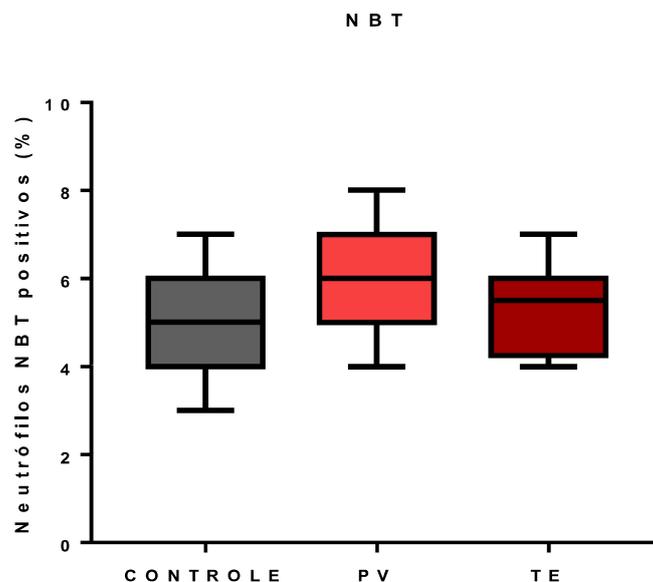


Figura 8: Média neutrófilos positivos para teste com NBT. Na linha horizontal os grupos do estudo em vertical resultados das médias e %.

5. DISCUSSÃO

O objetivo do presente trabalho foi avaliar função fagocítica de neutrófilos circulantes e também avaliar o metabolismo oxidativo dos pacientes com PV e TE. Foi realizado inicialmente através do pareamento de acordo com idade que variou entre a faixa etária de 30 a 80 anos no grupo controle e 40 a 80 no grupo de PV e TE. Quanto a média de idade dos pacientes, mostrou-se semelhante aos achados de Hurtado-Nedelec et al. (2013) em que eles demonstram uma média de idade de 74 anos em PV e 68 em TE. Em seu estudo Byun et al, (2016) perceberam que na Coreia do Sul, nos anos entre 2004 e 2013, a média de idade do diagnóstico tem reduzido para 35 anos, ele compara seus achados com os encontrados nas bases de dados epidemiológicos de outros países, e aponta para a importância em termos de escassez de entendimento da patologia no sistema de saúde.

Chauffaille, (2010) afirma que as NMPs Ph1 negativas são patologias essencialmente do adulto (50-70 anos). Porém, há uma incidência de aproximadamente 15% abaixo dos 40 anos para pacientes com TE e PV, pode também surgir em idades abaixo dessa faixa etária, (Bittencourt et al. 2010). Portanto é importante frisar que estes resultados são relevantes para a manutenção de dados epidemiológicos destas patologias na região norte, uma vez que ainda não há na literatura nenhum dado publicado sobre ambas as doenças com perfil epidemiológico da região nortista.

houve predominância do sexo feminino tanto em PV quanto em TE. Em um grande levantamento epidemiológico realizado na Coreia do Sul comandado por Byun et al, (2016), foi observado que o número crescente no diagnóstico de TE e PV foi acompanhado da prevalência na população feminina e masculina respectivamente, em contra partida Cardoso ANS, (2018) observou a predominância do sexo masculino em TE. Ao passo que Stein et al, (2010) aponta para o fato de que o gênero não é um fator determinante dessas patologias. Não há achados robustos na literatura quanto a relação do sexo com essas NMPs PH⁻. Nossos resultados corroboram com mesmos estudos de Chauffaille, 2010 e Bittencourt et al(2010) Declarados pardos, somaram o maior percentual das médias de ambas as doenças, seguidos da população branca, e a população negra apresentou o menor percentual.

Não há estudos que correlacionem a base dessas doenças as raças e

etnias. Byun et al, (2016) observou, que de modo geral Brancos eram predominantes nas NMPs, ele observou também que leste asiáticos e negros apresentam maior incidência de TE. Demonstrando que a doença não é predominante em nenhuma raça definida de maneira geral. Vale salientar que, o manual de doenças mais importantes por razões étnicas na população brasileira afro-descendente, (2001), destaca algumas doenças hematológicas com maior percentual em negros e pardos da população brasileira, em decorrência da nossa conhecida miscigenação e alerta para os riscos de uso da Hidroxiuréia em pacientes falciforme, apesar das bases genéticas da doença possuírem mecanismos opostos de PV e TE o manual alerta para os riscos na diminuição de leucócitos dessa população quando em uso de HU alertando também para evolução de neoplasias.

Diretrizes para o manejo de PV e TE sugerem controle do hematócrito e normalização da contagem de plaquetas respectivamente, além do controle da contagem de leucócitos, pois é um fator de risco para surgimento de trombose. De acordo com o protocolo utilizado pela clínica médica do HOL, os neutrófilos devem estar acima de 1.000-1.500 e linfócitos devem estar acima de 1.000. Esses valores norteiam a continuação do tratamento ou uma possível troca de medicação. Junto a esses dados hematológicos na contagem diferencial por distensão sanguínea, foi observado que eles não apresentaram neutropenia e nem linfopenia. Os cuidados com o controle desses parâmetros são extremamente importantes, pois a expectativa de vida é reduzida em pacientes de alto risco, e com cuidados cotidianos, a sobrevida média é de 10,9 anos para pacientes com PV, porém, para TE com baixo risco, alguns pesquisadores relatam uma razão de mortalidade padronizada (Vannucchi e Harrison, 2017).

Os pacientes apresentaram uma média do hematócrito menor que 45%, as plaquetas de ambos os grupos apresentaram-se dentro dos resultados preconizados após o início do tratamento conforme estimativas da OMS, e a contagem de leucócitos estava próximo dos valores normais, o que justifica que 84%(21) dos pacientes apresentavam-se assintomáticos, 16%(4) apresentaram uma alteração de um ou outro parâmetro. A redução de apenas um parâmetro é considerado sub-ótimo quando o outro parâmetro ainda é elevado (Buxhofer-ausch, 2018). A análise hematológica é uma ferramenta de auxílio para avaliar o estado imunológico do paciente e observar se há toxicidade devido ao tratamento, portanto, possui grande valor para manter ou

suspender a terapia utilizada.

Vários estudos começam a emergir quanto ao papel dos neutrófilos nas NMPs Ph1 negativas, que é uma célula que exerce importante indução e resposta, na inflamação. Quanto ao número absoluto de neutrófilos e linfócitos diferentes estudos demonstraram que são importantes para o prognóstico e estadiamento da doença. A relação neutrófilo/linfócito (RNL) é considerada um teste preditor de prognóstico avaliados em alguns tipos de câncer, é recomendado como uma ferramenta auxiliar na definição quanto à escolha do tratamento adjuvante (Goldstein et al. 2015; Valpione et al. 2015; Faria, 2016). Em nossos resultados (brutos e médias), a contagem de desses números não caracterizaram neutropenia ou linfopenia, e quando comparados com as diferentes doses administradas de ambas as doenças, aponta para um valor significativo da relação dose e número de células, essa é um preditor importante para manutenção do tratamento. Por possuírem manifestações clínicas semelhantes as terapias atuais empregadas para o tratamento têm como objetivo prevenir algumas manifestações clínicas, como eventos trombóticos, tromboembólicos e hemorrágicos (Vannucchi e Harrison, 2017).

Vital (2015) ao estudar o efeito da HU na adesão celular in vitro de neutrófilos, sob condições inflamatórias observou em seus resultados que o tratamento crônico com a HU diminui as propriedades adesivas dos neutrófilos. Além da diminuição do número global de neutrófilos, a HU pode ter algum efeito direto sobre funções essenciais desta célula, visto que o neutrófilo é um dos alvos principais do medicamento. A fim de avaliar a função fagocítica após os experimentos realizados com partículas de zimosan sensibilizado, foi comparado o IF dos grupos portadores de PV e TE com grupo controle obtivemos resultado significativamente menor em pacientes com PV e TE. Esse resultado demonstra que, frente à uma partícula estranha a capacidade desta célula de fagocitar apresentou-se diminuída. O Resultado corrobora com achados de Sarges et al., (2018). Nestas neoplasias uma das características é a maturação celular preservada, podendo apresentar alterações nas suas funções. Sugere-se que a utilização de HU pode estar alterando a fagocitose de neutrófilos, ainda que quantitativamente os valores estejam dentro dos limites desejáveis para estes pacientes, a sua capacidade moduladora em resposta a inflamação pode estar comprometida podendo ser prejudicial ao paciente que muitas vezes encontra-se imunodeprimido.

A fim de avaliar se além da fagocitose outras funções de neutrófilos poderiam estar comprometidas, foi realizado o teste de NBT que permite visualizar se o sistema NADPH oxidase (essencial no mecanismo celular neutrofilico) está produzindo ERO. Através desse teste é possível saber se o sistema NADPH oxidase inicia um processo denominado explosão respiratória. Os neutrófilos quando estimulados, manifestam um aumento do consumo de oxigênio esse mecanismo produz grandes quantidades de supéroxido e peróxido de hidrogênio, apresentam extrema importância para a função bactericida dos neutrófilos (Zinkl e Kabbur 1997; Afonso et al. 2002).

Nossos resultados mostraram que não houve diferença significativa entre o grupo controle e os grupos dos pacientes com PV e TE, embora haja descrito na literatura que a exposição prolongada a HU predisponha citotoxicidade, esse resultado significa que a produção de EROs pelo sistema NADPH oxidase não se apresenta alterada e corrobora com achados de Afonso et al. (2002) e Pedrosa et al. (2020)

Em estudo Hurtado-Nedelec et al. (2013), pacientes com PV e TE associados à mutação JAK2 V617F apresentaram um aumento na produção de EROs. A mutação JAK2 V617F resulta em um ganho de função e induz a tirosina a ter uma constante atividade de quinase desse modo induz uma hiper ativação de neutrófilos, esse resultado justifica o fato de independente da menor capacidade de fagocitose dos neutrófilos encontrada neste estudo, a formação de EROs, não se encontra alterada. Pedrosa et al (2020) alerta para o fato de que essa justificativa de hiper ativação independente de quise, também abre caminho para um ciclo celular vicioso em que essa ativação independente pode promover uma disfunção orgânica.

6.CONCLUSÃO

Em conclusão, apresentamos dados que indicam que o tratamento com HU apresenta diminuição na capacidade de fagocitar dos neutrófilos, afetando na qualidade de resposta dessa célula frente a uma infecção. Sugere-se que a diminuição da fagocitose esteja relacionada diretamente a diminuição de moléculas de adesão. Através do teste de NBT foi possível observar que não houve alteração no processo oxidativo, e que tão logo a capacidade citotóxica não estaria comprometida. Portanto, esta funcionalidade está sendo afetada pela ação de HU sobre as moléculas de adesão. Estudos sobre HU tem mostrado sua capacidade de modular mecanismos oxidativos e inflamatórios relacionados aos neutrófilos. Apesar das diferentes doses administradas de HU, os números de neutrófilos se mantiveram dentro do estabelecido para o controle da doença, no entanto a qualidade desta célula é questionável. Estudos maiores são necessários para melhor elucidar de que forma o tratamento com HU pode estar alterando a função fagocítica dos neutrófilos, além disso o ganho em termos científico e clínico é de suma importância nessa temática.

7.REFERÊNCIA

- Arber, D.A.; Orazi, A.; Hasserjian, R.; Et Al. **The 2016 revision to the world health organization (who) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia.** *Blood*, v. 127, n. 20, p. 2391-2405, 2016.
- Almeida, C.B.; Scheiermann, C.; Jung-Eun, J.; Et Al. **Hydroxyurea and a cgmp- amplifying agent have immediate benefits on acute vaso-occlusive events in sickle cell disease mice.** *Blood*, v. 120, n. 14, p. 2879-2888, 2012.
- Afonso, J.A.B.; Ciarlini, P.C.; Kuchembuck, M.R.G.; et al. **Metabolismo oxidativo dos neutrófilos de ovinos tratados com monensina sódica e experimentalmente submetidos à acidose ruminal.** *Pesq. Vet. Bras*, v. 22, n. 4, p.129-134, out/dez. 2002.
- Burn, Garth Lawrence; Foti, Alessandro; Marsman, Gerben; Patel, Dhiren Ferise; Zychlinsky, Arturo. **The neutrophil. Immunity**, [s.l.], v. 54, n. 7, p. 1377-1391, jul. 2021. Elsevier bv. [Http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2021.06.006](http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2021.06.006). Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2021.06.006>. Acesso em: 17 jul. 2022.
- Barbui, T.; Thiele, J.; Gisslinger, H.; Finazzi, G.; Vannucchi, A.M.; Tefferi, a **The 2016revision of who classification of myeloproliferative neoplasms: clinical and molecular advances.** *Blood reviews*, [s.l.], v. 30, n. 6, p. 453-459, nov. 2016. Mensal. Elsevier bv. [Http://dx.doi.org/10.1016/j.blre.2016.06.001](http://dx.doi.org/10.1016/j.blre.2016.06.001)
- Barbui, T.; Thiele, J.; Passamonti, F.; et al. **Survival and disease progression in essential thrombocythemia are significantly influenced by accurate morphologic diagnosis: an international study.** *J clin oncol*, v. 29, n. 23, p. 3179-84,ago. 2011.
- Barbui, T.; Carobbio, A.; Rambaldi, A.; Finazzi, G. **Perspectivas sobre a trombose na trombocitemia essencial e policitemia vera: a leucocitose é um fator causador?** *Sangue* 2009, 114, 759-763.
- Beer, P.A.; Green, A.R. **Pathogenesis and management of essential thrombocythemia.** *Ash education program book*, v. 2009, n. 1, p. 621-628, 2009.
- Boyiadzis, M; Frame, J; Kohler, D; Fojo, T. **Hematology-Oncology Therapy**, 2 Ed.Usa: New York, Mc Graw Hill, 2007
- Boyer J. T(8;9)(P12;Q33) Cntrl/Fgfr1. **Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol.** V.8,N.2, P.9-93, 2004.
- Benjamin Cummings. **Parotid Tumors.** 2004. Disponível Em: [<Www.Downstatesurgery.Org/Files/Cases/Parotid Tumors.Pdf>](http://www.Downstatesurgery.Org/Files/Cases/Parotid_Tumors.Pdf). Bittencourt, R. I.;Poncelet, K.; Almeida, A.C.C.; Fassina, K.;
- Byun Jm, Kim Yj, Youk T, Yang Jj, Jongha Yoo J, Park Ts. **Real world epidemiology of myeloproliferative neoplasms: a population based study in korea 2004–2013.***Ann hematol.* 2016 dec; 96(3): 373-81 doi: 10.1007/s00277-016-2902-9
- Buzzas, C Et Al. **Budd Chiari Syndrome Secondary To Polycythemia Vera**, *Journal of gastrointestinal And Liver Diseases*, Romenia, 18(3):363-6. Buxhofer-Ausch, V.; Steurer, M.; Sormann, S. **Impact Of White Blood Cells On Thrombotic Risk In Patients With Optimised Platelet Count In Essential Thrombocythemia.** [Eur J Haematol](http://www.eurjhaematol.com), Mar. 2018.

Cardoso, Adalberto Nuno Santos. **Neoplasias mieloproliferativas cromossoma filadélfia negativas: do diagnóstico ao prognóstico**. 2018. 32 f. Dissertação (mestrado) - curso de medicina, faculdade de medicina, universidade de lisboa, lisboa, 2018. Cap. 1. Disponível em: <http://hdl.handle.net/10451/41746>. Acesso em: 28 jun. 2022

Castilho, Bruno Eduardo De Miranda. **Essential thrombocythemia: etiopathogenesis and therapeutic** 2017. 58 f. Dissertação (mestrado) - curso de medicina, faculdade de medicina da universidade de coimbra, coimbra, 2017. Disponível em: <http://hdl.handle.net/10316/82095>. Acesso em: 12 jun. 2022.

Carobbio, A.; Ferrari, A.; Masciulli, A.; Ghirardi, A.; Barosi, G.; Barbui, T. **Leucocitose E Trombose Em Trombocitemia Essencial E Policitemia Vera: Uma Revisão Sistemática e Meta-Análise**. *Sangue Adv.* 201 3, 1729-1737

Campo, E.; Swerdlow, S. H.; Harris, N. L.; Pileri, S.; Et Al. **The 2008 Who classification of lymphoid neoplasms and beyond: Evolving Concepts And Practical Applications**. *Blood*, V, 117, N. 19, P. 5019-5032, Mai. 2022.

Campbell, P. J.; Green, A. R. **The myeloproliferative disorders**. *N engl j med*, v. 355, n. 23, p. 2452-66, dez. 2006.

Campbell, Peter J. et al. **Definition of subtypes of essential thrombocythaemia and relation to polycythaemia vera based on JAK2 V617F mutation status: a prospective study**. *The lancet*, v. 366, n. 9501, p. 1945- 1953, 2005.

Canalli, A.A. **Função e expressão das integrinas nos eosinófilos de pacientes com anemia falciforme**. 2004.dissertação (mestrado em clínica médica) — faculdade de ciências médicas, universidade estadual de campinas, campinas, 2004.

Chauffaille, M.L.L.F. **Neoplasias mieloproliferativas: revisão dos critérios diagnósticos e dos aspectos clínicos**. *Revista brasileira de hematologia e hemoterapia. Revisão . Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* 2010; SP

Covas, D.T.; Angulo, I.L.; Palma, P.V.B.; Zago, M.A.; Et Al. **Effects of hydroxyurea on the membrane of erythrocytes and platelets in sickle cell anemia**. *Haematologic*, V. 89, N. 3, P. 273-280, 2004.

Defour, J.P.; Itaya, M.; Gryshkova, V.; Et Al. **Tryptophan at the transmembrane– cytosolic junction modulates thrombopoietin receptor dimerization and activation**. *Pnas*, V. 110, N. 7, P. 2540-2545, Fev. 2013.

Delhommeau F, Dupont S, Tonetti C, Massé A, Godin I, Couedic J, Et Al. **Evidence That The Jak2 G1849 (V617f) mutation occurs in a lymphomyeloid progenitor in polycythemia vera and idiopathic myelofibrosis**. *Blood* 2007;109:8.

SARGES, ES. **Avaliação de neutrófilos circulantes em pacientes com neoplasias mieloproliferativas philadelphia negativas em tratamento**

quimioterápico. 2018. 64 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Pará, Belém, 2018.

Faria, S.S. **Relação neutrófilo/linfócito como ferramenta prognóstica em pacientes com câncer de mama**. 2016. 95 F. Dissertação (Mestrado Em Ciências Da Saúde) — Faculdade De Medicina, Universidade Federal De Uberlândia, Uberlândia, 2016.

Falanga, A.; Marchetti, M. **Trombose Em Neoplasias Mieloproliferativas**. *Semin. Pulso. Hemos.*

2014, 40, 3

Francisca Ferrer-Marín; Ernesto José Cuenca-Zamora; Pedro Jesús Guijarro- Carrillo; Raúl Teruel-Montoya; (2021). **Emerging role of neutrophils in the thrombosis of chronic myeloproliferative neoplasms** . International Journal Of Molecular Sciences, , -. Doi:10.3390/Ijms22031143

Fda. Agrylin. 063 0117 019. 08 De jul. De 2022. Disponível Em:<<Http://Https://Www.Accessdata.Fda.Gov/Drugsatfda.../020333s017Ibl.Pdf>>.

Gángó, Ambrus; Mózes, Réka; Boha, Zsófia; Kajtár, Béla; Timár, Botond; Király, Péter Attila; Kiss, Richárd; Fésüs, Viktória; Nagy, Noémi; Demeter, Judit. Quantitative Assessment Of Jak2 V617f And Calr Mutations In **philadelphia negative myeloproliferative neoplasms**. **Leukemia research, budapest**, V. 65, P. 42-48, 05 Fev. 2018. Elsevier Bv. <Http://Dx.Doi.Org/10.1016/J.Leukres.2017.12.005>.

Delhommeau F, Dupont S, Tonetti C, Massé A, Godin I, Couedic J, Et Al. Evidence That The Jak2 G1849 (v617f) **Mutation Occurs In A Lymphomyeloid Progenitor In Polycythemia vera And Idiopathic Myelofibrosis**. Blood 2007;109:8.

Fernandes Júnior, P. C. **Avaliação de neutrófilos circulantes em pacientes com neoplasia pré-invasiva e invasiva de colo uterino**. 2006. 106 f. Dissertação (mestrado em patologia) — curso de pós-graduação em patologia, universidade federal do triângulo mineiro, minas gerais, 2006.

Grinfeld J, Godfrey Al. (2017) **After 10 years Of Jak2v617f: Disease Biology And Current Management Strategies In Polycythemia Vera**. Blood Rev. May;31(3):101-118

Gambero, S.; Canalli, A.A.; Traina, F.; Et Al. **Therapy with hydroxyurea is associated with reduced adhesion molecule gene and protein expression in sickle red cells with a concomitant reduction in adhesive properties**. European journal of haematology, V. 78, N. 2, P. 144-15, 2007.

Gasparotto, E.P.L. Expressão De Genes E Proteínas Anti-E-Pró- **Apoptóticas Em Células Precursoras Da Medula Óssea E Leucócitos Do Sangue Periférico De Pacientes Portadores De Policitemia Vera**. 2009. 185 F. Tese (Doutorado Em Biociências Aplicadas À Farmácia) — Faculdade De Ciências Farmacêuticas De Ribeirão Preto, Universidade De São Paulo, São Paulo, 2009.

Hallett, W.J.; Wilson, J.W.; **Nitroblue Tetrazolium Reduction By Neutrophils In Experimental Hemorrhagic Shock**. American Journal Of Pathology, V.73, N.1, P. 173-180, 1973.

Hurtado-Nedelec, M.; Csillag-Grange, M-J.; Boussetta, T.; et al Increased Reactive Oxygen Species Production And P47phox **Phosphorylation In Neutrophils From Myeloproliferative Disorders Patients With Jak2 (v617f) Mutation**. Haematologica, V. 98, N. 10, P. 1517-1524, 2013.

Jones, A. V.; Cross, N. C. **Inherited Predisposition To Myeloproliferative Neoplasms**. Ther Adv Hematol, V. 4, N. 4, P. 237-53, Ago. 2013.

Kobayashi, S.D.; DeLeo, F.R. **RE of neutrophils in innate immunity: a systems biology-level approach**. Wiley interdisciplinary reviews: systems biology and medicine, v. 1, n. 3, p. 309-333, 2009.

Kolaczowska, Elzbieta; Kubes, Paul. **Neutrophil recruitment and function In Health And Inflammation**. Nature Reviews Immunology, V. 13, N. 3, P. 159- 175, 2013.

Landolfi, R.; Di Gennaro, L.; Barbui, T.; De Stefano, V.; Finazzi, G.; Marfisi, R.; Tognoni, G.; Marchioli,

R. **Leucocitose como principal fator de risco trombótico em pacientes com policitemia vera.** Sangue 2007, 109, 2446-2452

Levine, R.L.; Wadleigh, M.; Benjamin, J.C. et al. **Activating mutation in the tyrosine kinase jak2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis.** Cancer Cell, V. 7, P. 387-397, Abr. 2005.

Levine, R.L.; Gilliland, D.G. **Myeloproliferative disorders.** Blood, V. 112, N. 6, P.2190-2198, Set. 2008. Monte-Mór, B.C.R.; Costa, F.F. A Mutação Jak2 V617f E As Síndromes Mieloproliferativas. Rev. Bras. Hematol. Hemoter, V. 30, N.3, P. 241-248, 2008.

Moulard O, Mehta J, Fryzek J, Olivares R, Iqbal U, Mesa Ra. **Epidemiology of myelofibrosis, essential thrombocythemia, and polycythemia vera in the european union eur j haematol.** 2013 Dec;92(4), 289–97. Doi:10.1111/Ejh.12256.

Brasília; Ministério Da Saúde; 2001. 78 P. Ilus, Tab, Graf.(A. Normas E Manuais Técnicos, N. 123).

Monografia Em Português | Ministério Da Saúde | Id: Mis-3444

Moura, L. G. **Expressão de galectinas-1 e 3 em neoplasias mieloproliferativas.** 2012. 115 F. Dissertação (Mestrado Em Ciências) — Faculdade De Ciências Farmacêuticas De Ribeirão Preto, Universidade De São Paulo, São Paulo, 2012.

Onsten, T.G. **Trombocitose essencial: o que é essencial saber.** Rev bras hematol. Hemoter. Porto alegre. V. 32, n. 2, p. 162-70, 2010.

Oliveira, C.R.A. **Avaliação prospectiva das atividades fagocitária e quimiotática de neutrófilos humanos quando submetidos ao plasma de pacientes sépticos.** 2012. 75f. Tese (Doutorado Em Ciências Da Saúde: Infectologia E Medicina Tropical) – Faculdade De Medicina, Universidade Federal De Minas Gerais, Minas Gerais, 2012.

Paz, Damien Luque; Chauveau, Aurélie; Boyer, Françoise; Buors, Caroline; Samaison, Laura; Cottin, Laurane; Seegers, Valérie; Férec, Claude; Maréchal, Cédric.Le; Gueguen, Paul. **Sequential analysis of 18 genes in polycythemia vera and essential thrombocythemia reveals an association between mutational status and clinical outcome.** genes, chromosomes and cancer, [S.L.], V. 56, N. 5, P. 354-362, 1 Fev. 2017. Wiley. Http://Dx.Doi.Org/10.1002/Gcc.22437.

Pedrazzani, F.S. **Impacto Da Análise Molecular Da Mutação Jak2v617f No Diagnóstico De Neoplasias mieloproliferativas Crônicas De Acordo Com Os Critérios Da Oms 2016.** 2016. 63 F. Dissertação (Mestrado Em Medicina) — Faculdade De Medicina, Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul, Porto Alegre, 2016.

Pedrosa, A.M. **Estudo de citotoxicidade, inflamação e estresse oxidativo em neutrófilos de pacientes com anemia falciforme: influência do tratamento com hidroxiureia.** 2013. 110 F. Dissertação (Mestrado Em Ciências Farmacêuticas). Faculdade De Farmácia, Odontologia E Enfermagem, Universidade Federal Do Ceará, Fortaleza, 2013.

Pessoa, A.S. **Apocinina versus diapocinina como inibidor da produção de peróxido de hidrogênio e ácido hipocloroso por neutrófilos ativados.** 2009. 56 f.monografia (graduação em departamento de química). faculdade de ciências, departamento de química, universidade estadual paulista, bauru, 2009.

Phillipson, M.; Kubes, P. The Neutrophil In Vascular Inflammation. Nature Medicine, V.17, N. 11, P. 1381-1390, 2011.

Reikvam, H.; Tiu, Rv. **Venous thromboembolism in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera.** *Leukemia*, v. 26, p. 563–571, 2012.

Rumi e, cazzola m. **Diagnosis, risk stratification, and response evaluation in classical myeloproliferative neoplasms.** *Blood*. 2017 fev;129(6):680-92. Doi:10.1182/blood-2016-10-695957.

Santos, L.C. **estudo citogenético e pesquisa de mutações nos genes jak2 e mpl em policitemia vera, mielofibrose primária e trombocitemia essencial.** 2010. 116

f. Dissertação (mestrado em ciências) — Faculdade paulista de medicina, universidade federal de são paulo, são paulo, 2010.

Seguin, C.S. **influência da hidroxiuréia nas propriedades adesivas de neutrófilos e plaquetas.** 2017. 79 f. Dissertação (mestrado em ciências) —faculdade de ciências médicas, universidade estadual de campinas, campinas, 2017.

Silva, Ítala Cristine. **Neutrophils: classical aspects, plasticity and new immunoregulatory functions.** *Revista interdisciplinar de estudos experimentais, juiz de fora*, v. 7, n. 1, p. 35-46, 05 dez. 2016. Disponível em: <https://docs.bvsalud.org/biblioref/2018/11/964819/2872-8861-1-sm.pdf>. Acesso em: 16 ago. 2022.

Tefferi, A.; Barbui, T. **Personalized Management Of Essential Thrombocythemia—Application Of Recent Evidence To Clinical Practice.** *Leukemia*, V. 27, N. 8, P. 1617-acesso em 05 jun. 2022.

Tefferi, A.; Pardanani, a. **Myeloproliferative neoplasms a contemporary review.** *Jama oncology*. V.1, n. 1, p. 97-105, acesso em: 16 ago. 2022

Vital, D.M. **Efeito Da Hidroxiureiana Adesão In Vitro De Neutrófilos, Sob Condições Inflamatórias.** 2015. 76 F. Dissertação (Mestrado Em Ciências) — Faculdade De Ciências Médicas, Universidade Estadual De Campinas, Campinas, 2015.

Vannucchi, A.M.; Guglielmelli, P.; Tefferi, A. **Advances In Understanding And Management Of Myeloproliferative Neoplasms.** *Ca Cancer J Clin.* V. 59, P. 171-191, Mai/Jun. 2009vannucchi, A.M.; Harrison, C.N. **Myeloproliferative Neoplasms: Emerging Treatments For Classical Myeloproliferative Neoplasms.** *Blood*, V. 129, N. 6, Fev. P. 693-703, 2022.

Valente, Ana Carolina Menezes Mendonça; Ribeiro, Raquel Tognon. **Diagnóstico hematológico e molecular das neoplasias mieloproliferativas crônicas bcr-abl negativas.** *Revista brasileira de análises clínicas, governador valadares*, v. 53, n. 20 jul. 2021. Trimestral. *Revista brasileira de análises clínicas.* [Http://dx.doi.org/10.21877/2448-3877.202202168](http://dx.doi.org/10.21877/2448-3877.202202168)

ANEXO A

Fórmula do Cálculo Amostral Fórmula = $N \times \frac{N_0}{N + N_0}$

n= número de amostra necessário
para a pesquisa

N= População global

N₀= Fator de erro

Dados necessários:Fator de erro= 44

N= 105

n= $105.44 / 105 + 44 = 31$

ANEXO B

MODELO DE QUESTIONÁRIO UTILIZADO PARA COLETAR DADOS

NOME COMPLETO:

IDADE:

SEXO:

NOME DA MÃE:

ALGUMA COMORBIDADE?

DIABETE () HIPERTENSÃO () DISLIPIDEMIA () DOENÇA

CORONARIANA()

OUTROS

USO DE CITORREDUTOR ?

ANAGRELIDE () HIDROXIURÉIA () INTERFERON α ()

SE ASSOCIAÇÃO QUAIS?

FAMLIAR DE PRIMEIRO OU SEGUNDO GRAU DIAGNOSTICADO COM ALGUMA
DOENÇA HEMATOLÓGICA?

IDADE DO DIAGNÓSTICO:

IDADE ATUAL:

ANO DO DIAGNÓSTICO:

TEMPO DE TRATAMENTO:

VOCÊ SE CONSIDERA

BRANCO () PARDO () NEGRO() SEM DEFINIÇÃO ()

INFORMAÇÕES A CERCA DE CRITÉRIOS DE DIAGNÓSTICO, MANEJOS TERAPÊUTICOS, DOSES DIÁRIAS, TROCA DE TERAPIA COM OU SEM ASSOCIAÇÃO DE OUTRO CITORREDUTOR, FORAM DISPONIBILIZADOS PELO SETOR DE ARQUIVOS APÓS AUTORIZAÇÃO DE PACIENTE E EQUIPE MÉDICA, TENDO EM VISTA QUE O HCL É REFERÊNCIA A CERCA DE DADOS ONCOLÓGICOS NA REGIÃO NORTE.

ANEXO C

DADOS BRUTOS DO HEMOGRAMA DE PACIENTES COM PV

	HB	HT	LEUCO	Nº <i>AB/SEGME</i>	Nº AB/LINF	PLT
P1	13,8	40,70	5,030	2,927	1,610	485,000
P2	14,8	41,70	5,070	2,479	1,931	374,000
P3	15,8	42,70	8,310	6,548	1,93	402,000
P4	16,8	43,70	4,810	3,641	1,500	180,000
P5	17,8	44,70	6,150	4,003	1,722	218,000
P6	18,8	45,70	3,430	1,780	1,279	230,000
P7	19,8	46,70	12,450	10,209	1,743	337,000
P8	21,8	48,70	7,430	5,141	1,590	351,000
P9	22,8	49,70	5,610	3,562	1,683	166,000
P10	23,8	50,70	5,770	3,462	1,609	473,000
P11	24,8	51,70	3,760	2,282	1,94	232,000

ANEXO D DADOS BRUTOS DO HEMOGRAMA

	HB	HT	LEUCO	Nº AB/SEGME	Nº AB/LINF	PLT
P1	13,9	40,90	4.860	2.872	1.438	469.000
P2	13,00	39,10	3.610	1.542	1.438	470.000
P3	14,00	39,90	3.300	1.542	869	582.000
P4	14,20	40,10	3.617	2.055	1.248	281.000
P5	12,2	38,8	5.710	3.352	1.638	419.000
P6	12,1	36,5	4.250	2.167	1.742	447.000
P7	13,7	42,2	5.200	2.620	1.882	537.000
P8	11,9	38,5	3.810	2.080	1.078	319.000
P9	11,4	35	6.570	4.060	2.103	493.000
P10	14,3	41	5.220	1.879	1.790	861.000
P11	3,97	41,10	5.680	2.930	5.680	468.000
P12	11,5	33,5	4.700	2.838	1.931	565.000
P13	12,1	35,5	5.680	3.788	1.448	495.000
P14	12,5	36,9	5.500	3.437	1.600	547.000

NEXO E

O PRESENTE ESTUDO UTILIZOU AS SEGUINTE BASES DE

DADOSLILACS

PUBMED

SCIELO

PERIÓDICOS CAPES

BRAZILLIAN JOURNAL