

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA BÁSICA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**EFEITO DAS MICROPARTÍCULAS DERIVADAS DE PLAQUETAS NA  
PROLIFERAÇÃO E NO ESTADO REDOX INTRACELULAR DE RASM**

RODRIGO ROSI MENGARELLI

CURITIBA  
2008

**RODRIGO ROSI MENGARELLI**

**EFEITO DAS MICROPARTÍCULAS DERIVADAS DE PLAQUETAS NA  
PROLIFERAÇÃO E NO ESTADO REDOX INTRACELULAR DE RASM**

Dissertação de mestrado apresentada como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre, pelo programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia do Departamento de Patologia Básica do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Silvio Zanata  
Co-orientadora: Profa. Dra. Lia Nakao

**CURITIBA**  
**2008**

## **DEDICATÓRIA**

Dedico a todos que foram, são ou farão parte da minha vida.

Especialmente à minha esposa e meus futuros filhos.

Ao Pinduca.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à UFPR, mais especificamente ao Departamento de Patologia Básica do Setor de Ciências Biológicas pela oportunidade.

Agradeço à todos os colegas de laboratório pela ajuda e pela convivência.

Agradeço à Profa. Lia Nakao e ao Prof. Silvio Zanata pela orientação.

Agradeço ao professor Juarez Gabardo pela orientação estatística.

Agradeço aos Mengarelli, aos Rosi e aos Cavallet.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	vi
<b>LISTA DE FIGURAS, GRÁFICOS E TABELAS</b> .....	vii
<b>RESUMO</b> .....	viii
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	1
1.1 PLAQUETAS: MORFOLOGIA, ATIVAÇÃO, AGREGAÇÃO, SECREÇÃO E O SEU PAPEL NA HEMOSTASE .....	1
1.2 MICROPARTÍCULAS DERIVADAS DE PLAQUETAS.....	5
1.2.1 Formação e características das micropartículas .....	6
1.2.2 Efeitos biológicos das micropartículas.....	8
1.2.3 Micropartículas e as situações patológicas.....	9
1.3 ASPECTOS REDOX E PROLIFERAÇÃO CELULAR .....	13
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	17
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	18
3.1 OBTENÇÃO DE MICROPARTÍCULAS DE PLAQUETAS POR ATIVAÇÃO COM IONÓFORO DE CÁLCIO .....	18
3.2 OBTENÇÃO DE LISADO DE PLAQUETAS .....	19
3.3 SDS-PAGE E WESTERN BLOTTING .....	19
3.4 CULTIVO E TRATAMENTO DE CÉLULAS MUSCULARES LISAS DE AORTA DE COELHO (RASM) .....	20
3.5 ANÁLISE DA PROLIFERAÇÃO CELULAR .....	20
3.6 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE GLUTATIONA REDUZIDA E OXIDADA EM CÉLULA MUSCULAR LISA .....	22
3.7 TRATAMENTO ESTATÍSTICO DOS DADOS .....	23
<b>4 RESULTADOS</b> .....	24
4.1 PROLIFERAÇÃO CELULAR INDUZIDA POR MICROPARTÍCULAS DE PLAQUETAS .....	24
4.2 DETERMINAÇÃO DA PRESENÇA DE PDGF EM MICROPARTÍCULAS DE PLAQUETAS .....	26
4.3 ALTERAÇÃO DO ESTADO REDOX INDUZIDA POR PMPS .....	27
4.4 ALTERAÇÃO DO ESTADO REDOX DAS CÉLULAS RASM INDUZIDA POR NAC E BSO. ....	30
4.5 PROLIFERAÇÃO CELULAR INDUZIDA POR ALTERAÇÃO NO ESTADO REDOX INTRACELULAR .....	31
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	33
<b>6 CONCLUSÕES</b> .....	39
<b>7 REFERÊNCIAS</b> .....	40

## LISTA DE ABREVIATURAS

AA - Ácido aracdônico.

BSO - DL-butionina-SR-sulfoximina.

DMSO – Dimetil sulfóxido

GP – Glicoproteínas.

GSH – Glutationa reduzida.

GSSG – Glutationa oxidada.

HPLC – Cromatografia líquida de alta performance.

MET – Microscopia eletrônica de transmissão.

MTT - Brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazólio.

NAC - N-acetil-cisteína.

Nox - NADPH oxidase.

PBS – Solução salina tamponada com fosfato.

PDGF – Fator de crescimento derivado de plaquetas.

PGE1 – Prostaglandina E1.

PMP – Micropartículas de plaqueta.

PRP – Plasma rico em plaquetas.

RASM – Células musculares lisas de aorta de coelho.

ROS – Espécies reativas de oxigênio

SFB – Soro fetal bovino.

SPP-1 - Fosfatidilserina, esfingosina 1-fosfato.

TBST – Solução salina tamponada com Tris contendo 0,05% de Tween 20.

vWf - Fator von Willebrand.

## LISTA DE FIGURAS, GRÁFICOS E TABELAS

FIGURA 1 - Processo de agregação plaquetária .....	3
FIGURA 2 - Proteoma das PMP .....	7
FIGURA 3 - Ciclo redox da glutathiona .....	14
TABELA 1 - Resultados dos experimentos de proliferação celular induzida por PMP .....	24
GRÁFICO 1 - Resultados dos experimentos de proliferação celular induzida por PMP.....	26
FIGURA 4 - Resultado do <i>western blotting</i> para o anticorpo $\alpha$ -PDGF .....	27
TABELA 2 - Resultados dos experimentos de alteração do estado redox induzida por PMP.....	27
GRÁFICO 2 - Resultados dos experimentos de alteração do estado redox induzida por PMP .....	29
GRÁFICO 3 - Resultado do experimento de alteração do estado redox das células RASM induzida por NAC e BSO .....	30
TABELA 3 - Resultados dos experimentos de proliferação celular induzida por alteração no estado redox intracelular .....	31
GRÁFICO 4 - Resultados dos experimentos de proliferação celular induzida por alteração no estado redox intracelular .....	32

## RESUMO

Micropartículas de plaquetas (PMP) são vesículas membranosas submicroscópicas liberadas por plaquetas ativadas. Apresentam em suas membranas uma grande quantidade de receptores de ligação plaqueta-endotélio, lipídios bioativos e uma gama de diferentes proteínas com diferentes funções e diretamente relacionadas com seus efeitos biológicos. Além do papel pró-coagulante que as PMP exercem na hemostase e no processo trombótico, a interação das PMP com células tem sido associada com respostas biológicas como a indução na proliferação celular e a inibição da apoptose em alguns tipos celulares. Variações anormais na concentração de PMP no plasma têm sido associadas a diversas situações patológicas, onde o risco trombótico é elevado, como lúpus eritematoso sistêmico, esclerose múltipla, mal de Alzheimer, hipertensão, diabetes entre outras. Além disso, estudos recentes têm demonstrado que as PMP poderiam estar atuando através do efeito redox. O estado redox da célula indica o balanço entre as moléculas oxidadas e as moléculas reduzidas encontradas no citoplasma. Esse balanço é influenciado por fatores fisiológicos e ambientais e influencia diretamente a ativação de enzimas, a síntese de DNA, a proliferação celular, os mecanismos de regulação da apoptose, o enovelamento de proteínas, a ativação de fatores transcricionais, entre outras atividades. Este trabalho teve como objetivo confirmar o potencial mitogênico das PMP em células RASM, avaliar se as PMP alteram o estado redox intracelular destas células e verificar se a proliferação celular nestas mesmas células induzida por PMP correlaciona-se com as alterações no estado redox intracelular. Para isso produzimos PMP *in vitro* a partir de plaquetas humanas ativadas com ionóforo de cálcio A23187(Sigma). Células RASM foram cultivadas e tratadas diferentes concentrações (10 µg/mL e 30 µg/mL) de PMP. Para os ensaios de proliferação induzida por redox as células foram tratadas com 2 mM de NAC e com 0,5 mM de BSO. Observamos que o tratamento com 10 µg/mL de PMP aumentou a proliferação celular porém sem diferença estatística significativa quando comparada com o controle negativo. Contudo, o tratamento com 30 µg/mL de PMP estimulou a proliferação significativamente, embora com menor intensidade que o controle positivo. Os resultados também nos indicaram um aumento significativo na proporção GSH/GSSG intracelular no tratamento com 10 µg/mL de PMP quando comparado ao controle negativo. Por sua vez o tratamento com 30 µg/mL de PMP não apresentou alterações significativas na proporção GSH/GSSG intracelular. Foi comprovado também que o estado redox mais reduzido induz a proliferação celular, enquanto o estado redox mais oxidado inibe a proliferação celular. Com isso concluímos que as PMP induzem a proliferação de células musculares lisas de forma correlacionada às alterações no estado redox. Esta correlação pode estar sendo direta através da atuação, no estado redox, dos constituintes das PMP ou através de uma ação sinérgica da alteração redox com o efeito do PDGF como fator proliferativo. Uma vez que foram detectadas pequenas concentrações deste fator de crescimento nas PMP. Assim, sugerimos possíveis efeitos aterogênico e redox das PMP em células musculares lisas.



# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 PLAQUETAS: MORFOLOGIA, ATIVAÇÃO, AGREGAÇÃO, SECREÇÃO E O SEU PAPEL NA HEMOSTASE

Em 1882, Bizzozero e Hayem identificaram as plaquetas como pequenos elementos do sangue circulante. Até então, os microscopistas consideravam as plaquetas fragmentos de eritrócitos ou leucócito. Desde então, muito se tem aprendido sobre a morfologia e a fisiologia das plaquetas, assim como seu papel no controle da hemostase e em condições patológicas. Hoje em dia sabe-se que a hemostase é um processo muito complexo que envolve a agregação plaquetária em lesões da parede vascular no intuito de minimizar a perda de sangue (ÁVILA, 1997). A seguir, serão apresentados alguns aspectos morfológicos das plaquetas, essenciais ao entendimento dos processos de agregação e ativação plaquetária.

As plaquetas são produzidas a partir da fragmentação citoplasmática de megacariócitos na medula óssea. No sangue circulante têm a forma de um disco biconvexo (forma não ativada) com um diâmetro de 2 a 3 micrômetros, sendo assim a menor célula sanguínea. Microtúbulos, logo abaixo da membrana plasmática, auxiliam na manutenção dessa forma. As plaquetas são anucleadas, portanto não se proliferam. O tempo de vida de uma plaqueta in vivo é de aproximadamente 12 dias (RAPAPORT, 1990).

Sua membrana plasmática é uma bicamada de composição fosfolipídica assimétrica. A parte interna da bicamada apresenta fosfatidiletanoaminas, fosfatidilserinas e fosfatidilinositol, enquanto a esfingomiéline é encontrada exclusivamente na camada externa. Aproximadamente 20% dos lipídios da membrana das plaquetas são lipídios neutros, sendo o principal componente o colesterol. A presença dessa concentração de colesterol e a relação dos ácidos graxos saturados com os componentes fosfolipídicos são de grande influência na fluidez da membrana plasmática. Essa membrana é revestida externamente por uma camada amorfa de glicoproteínas (glicocálix). Dentre as glicoproteínas encontradas no glicocálix foram descritas as GP I, II e III (e suas variantes, como a Ib, a IIIa e etc.) como as mais importantes na ativação e na agregação plaquetária (MCNICOL e GERRARD, 1997).

Internamente as plaquetas apresentam sistemas de membranas denominados sistema canalicular aberto e sistema tubular denso. O primeiro é formado por invaginações da membrana plasmática. É através desse sistema que a plaqueta ativada secreta seus produtos. O segundo é constituído de restos do retículo endoplasmático que não se comunicam com o exterior. Ele serve basicamente como um local de armazenamento de cálcio intracelular (MCNICOL e GERRARD, 1997).

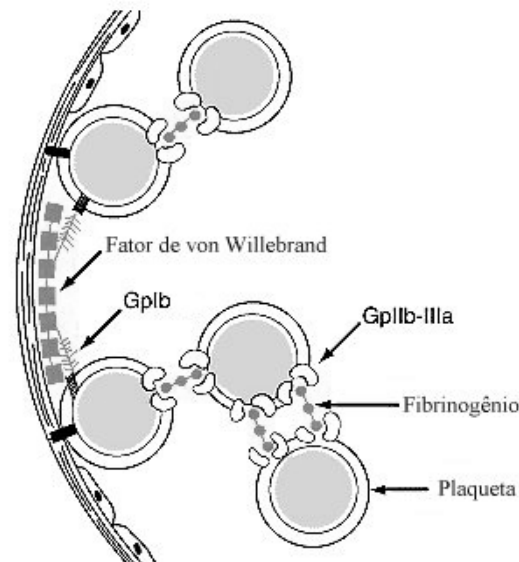
Entre as organelas presentes nas plaquetas estão as mitocôndrias, os grânulos grandes (os quais podem ser de dois tipos: corpúsculos densos ou grânulos alfa) e os grânulos finos de glicogênio. As plaquetas obtêm a sua energia na forma de ATP pelo metabolismo da glicose, seja por glicólise anaeróbica ou pelo processo mais complexo e muito mais eficiente de fosforilação oxidativa nas mitocôndrias. As plaquetas não ativadas utilizam as suas ATPs para realizar o bombeamento de sódio para fora da célula. Isso mantém o número de proteínas plaquetárias fosforiladas e dá uma continuidade na polimerização-despolimerização basal da actina. Uma vez ativadas, as plaquetas passam a produzir mais ATPs necessárias para a alteração da forma celular, para a contração e para a secreção (ÁVILA, 1997).

As plaquetas têm a capacidade de sintetizar glicogênio e ácidos graxos, porém, pela ausência de material genético elas não podem sintetizar qualquer tipo de proteína. Portanto quando uma enzima plaquetária, por algum motivo, é inativada, não é possível a síntese de uma nova proteína para a substituição da mesma (MCNICOL e GERRARD, 1997).

O sistema hemostático consiste em plaquetas, fatores de coagulação e células endoteliais forrando os vasos sanguíneos. Sob condições normais, a resistência da camada de células endoteliais a interações com as plaquetas e com os fatores de coagulação previne a trombose. Quando a continuidade do endotélio é rompida e a matriz sub-endotelial é exposta, uma coordenada série de eventos ocorrem para selar essa falha. As plaquetas realizam um papel primário nesse processo, interagindo com o fator von Willebrand (vWf) de ligação sub-endotelial via complexo Ib (glicoproteína de membrana). Essa interação inicial (adesão plaquetária) permite o próximo estágio, que é uma reação adesiva que leva as plaquetas a interagirem umas com as outras até formar um agregado (DA SILVA e HASHIMOTO, 2006).

O complexo glicoprotéico IIb/IIIa medeia a interação plaqueta-plaqueta (agregação plaquetária). Nas plaquetas em repouso, a glicoproteína IIb/IIIa é incapaz de se ligar ao fibrinogênio ou ao vWf. A ativação das plaquetas permite a ligação dessas proteínas, unindo plaquetas adjacentes (FIGURA 1).

FIGURA 1. PROCESSO DE AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA.



NOTA. Figura adaptada (YIP et al. 2004) demonstrando a adesão plaquetária ao sub-endotélio e a formação de uma ponte entre os receptores GpIb das plaquetas e o colágeno sub-endotelial. A agregação plaquetária é feita através dos receptores GpIIb-IIIa, intermediado pelo fibrinogênio.

À medida que as plaquetas vão aderindo ao subendotélio, elas começam a se ativar, como resultado do contato com o colágeno e com a trombina produzida no local. As plaquetas que forem se agregando às plaquetas já ativadas são também ativadas diretamente. Essa ativação libera substâncias que vão amplificar a ativação plaquetária posterior. Entre essas substâncias estão o Tromboxano  $A_2$ , o PAF (platelets activator factor) ou FAP (fator ativador de plaquetas) e o ADP (difosfato de adenosina).

Morfologicamente, após a ativação, a plaqueta muda drasticamente da forma de disco para uma forma esférica com prolongamentos (como se fossem pseudópodos). Isso ocorre através de uma reorganização do seu citoesqueleto que é predominantemente composto por microtúbulos (ÁVILA, 1997).

Como foi citado anteriormente, as plaquetas contêm dois tipos de grânulos grandes, os grânulos alfa e os grânulos densos. Os grânulos alfa contêm proteínas hemostáticas como o fibrinogênio, o vWf e fatores de crescimento como

o PDGF (Platelet-Derived Growth Factor). Os grânulos densos contêm fatores pró-agregatórios como a adenosina 5'-difosfato (ADP), cálcio e a serotonina. Durante a ativação, os grânulos estão centralizados e o seu conteúdo é descarregado no lúmen por um sistema de canais abertos por onde são liberados para o exterior (reação de liberação). Juntamente à liberação desses grânulos ocorre a liberação de micropartículas (PMP) com atividades pró-coagulantes (DA SILVA e HASHIMOTO, 2006). Essas micropartículas serão detalhadas futuramente neste trabalho.

Após a ativação, as plaquetas têm dois mecanismos principais para recrutar plaquetas adicionais para a formação do tampão hemostático. Elas liberam substâncias pró-agregatórias e sintetizam tromboxano  $A_2$  a partir do ácido aracdônico. Assim, a reação de liberação e a síntese de prostaglandinas consolidam o tampão hemostático inicial promovendo a participação de outras plaquetas na formação do mesmo. Somado a isso, quando as plaquetas são ativadas, fosfolipídios carregados negativamente movem-se para o lado externo da bicamada lipídica da membrana plasmática. Essa superfície negativa forma sítios de ligação para enzimas e cofatores do sistema de coagulação, resultando na formação do coágulo (hemostase secundária) (DA SILVA e HASHIMOTO, 2006).

As doenças plaquetárias levam a um defeito na hemostase primária e apresentam diferentes sinais e sintomas de deficiência nos fatores de coagulação (desordens na hemostase secundária). A reação fisiológica a uma lesão vascular é uma rápida adesão das plaquetas ao sub-endotélio. O tampão hemostático inicial, composto primariamente de plaquetas, é estabilizado mais ainda pela malha de fibrina gerada na hemostase secundária. A apreensão do sangue na superfície da lesão durante o sangramento é quase que exclusivamente resultado do tampão hemostático primário.

Doravante, as desordens hemostáticas primárias são caracterizadas por um período de sangramento prolongado, e os exames de características físicas demonstram petéquias e lesões purpúricas. Em comparação, defeitos na hemostase secundária apresentam um sangramento profundo e demorado (nos músculos por exemplo) e os exames de características físicas demonstram hemartrose. Hemartrose e hematomas musculares geralmente não estão presentes em doenças na hemostase primária (MCNICOL e GERRARD, 1997).

## 1.2 MICROPARTÍCULAS DERIVADAS DE PLAQUETAS

Micropartículas de Plaquetas (PMP) são vesículas membranosas submicroscópicas liberadas por plaquetas durante a sua ativação. Elas apresentam alguns antígenos característicos de plaquetas intactas como GP IIb/IIIa e GP Ib. As PMP são responsáveis por 90% de todas as micropartículas encontradas no plasma de indivíduos saudáveis, enquanto as 10% restantes podem ser derivadas de outros tipos celulares como eritrócitos, granulócitos, monócitos, linfócitos e células endoteliais (GARCIA et al. 2005). Elas não podem ser visualizadas em métodos simples de contagem de plaquetas mas podem ser detectadas por citometria de fluxo e microscopia eletrônica de transmissão (MET) (HORSTMAN e AHN, 1999).

A descoberta das PMP foi realizada por Wolf em 1967 (WOLF, 1967) quando demonstrou que as plaquetas, após sua ativação, liberam pequenos fragmentos lipídicos chamados por ele de “platelet dust” (poeira de plaqueta). Ele descreveu também que estes pequenos fragmentos lipídicos tinham a mesma função pró-coagulatória que as plaquetas ativadas. Essa atividade acabou sendo chamada de “platelet factor 3” ou PF3 (fator de plaqueta 3) (HARDISTY e HUTTON, 1966). Atualmente sabe-se que esta atividade deve-se à presença de fosfolipídios aniônicos como a fosfatidilserina exposta na superfície da PMP, que tornam essa superfície catalítica para o complexo pró-trombinase (DIAMANT, 2004). Wolf, através da utilização de um microscópio eletrônico de transmissão, descreveu que as vesículas apresentam-se com tamanho aproximado menor que 0.1µm e podem estar livres ou agregadas.

Em 1972, Warren e Vales conseguiram demonstrar a liberação das micropartículas por plaquetas após a sua adesão à parede dos vasos sanguíneos (WARREN E VALES, 1972). Após vários outros trabalhos pioneiros, as PMP passaram a ser vistas como uma consequência normal da ativação plaquetária e, com isso, as diferenças observadas no tempo de tromboplastina parcial entre o PRP (platelet-rich-plasma ou plasma rico em plaquetas), o PPP (platelet-poor-plasma ou plasma pobre em plaquetas) e o PFP (platelet-free-plasma ou plasma livre de plaquetas) foram atribuídos às próprias plaquetas e à atividade pró-

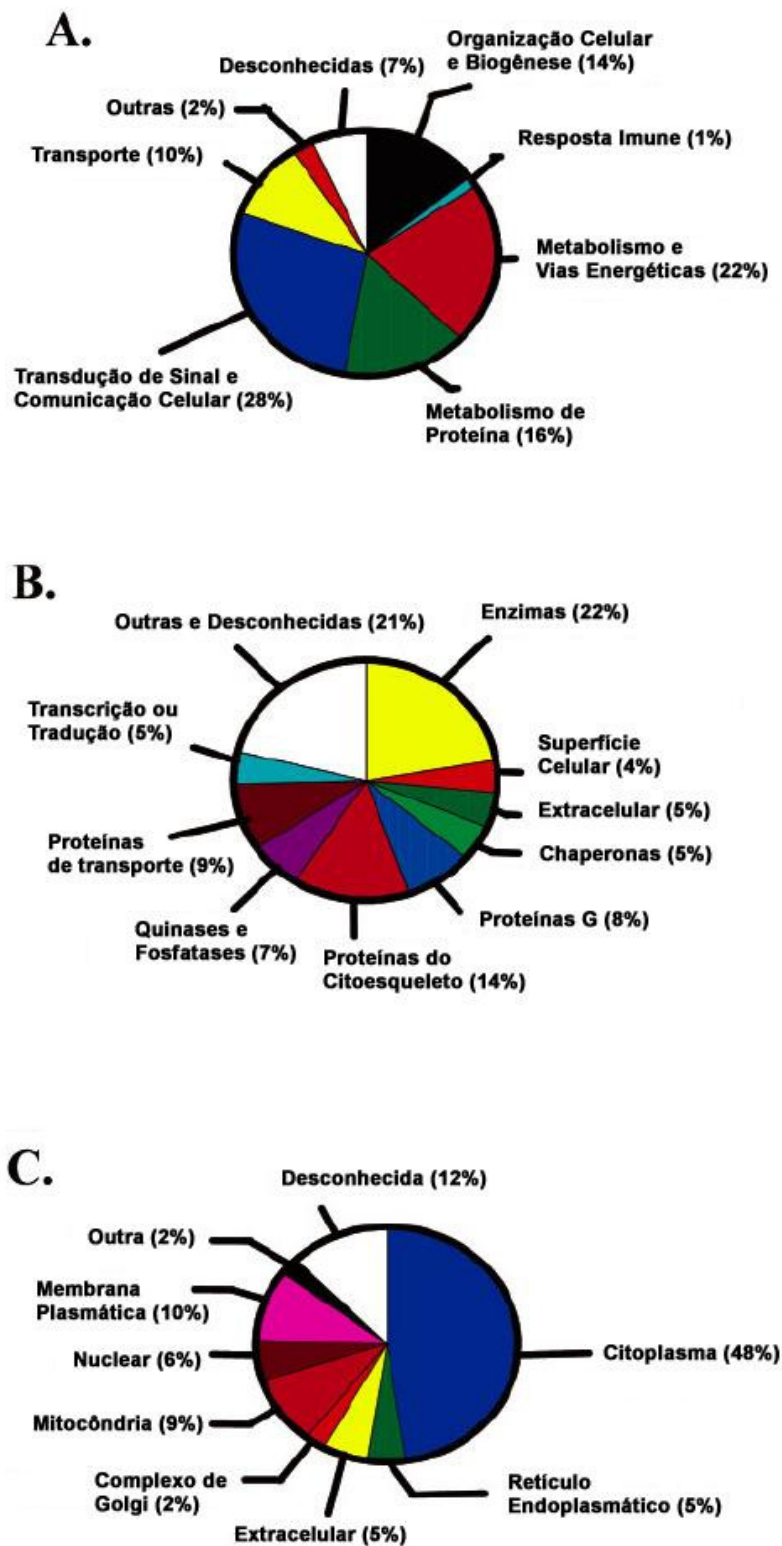
coagulatória (PF3) das PMP. Mas foi somente em 1994 que a terminologia Micropartícula de Plaqueta foi realmente utilizado para se referir a estas pequenas vesículas estudadas por um longo tempo sem um nome apropriado (OWENS,1994).

### **1.2.1 Formação e características das micropartículas**

As plaquetas, ao serem estimuladas por agonistas como a trombina, o ionóforo de cálcio A23187 e colágeno, ou quando elas são expostas a um grande estresse mecânico, liberam vesículas de tamanho entre 0,02 e 1µm denominadas Micropartículas de Plaquetas (PMP) (TAUBE et al, 1999; HOLME et al, 1997; PAKALA, 2004). Durante a ativação das plaquetas ocorre um aumento da concentração intracelular de cálcio, essa alteração de concentração causa a ativação de proteínas quinases seguida da inativação de proteínas fosfatases. Causa também a ativação de calpaínas que degradam talina permitindo ,assim, a formação de vesículas pela membrana plasmática (VAN WIJK, 2003). Essas PMP expressam em sua superfície uma série de receptores da interação plaqueta-endotélio como, por exemplo, as glicoproteínas IIb/IIIa (CD41), Ib e P-selectina (CD62P) (PAKALA, 2004; HORSTMAN et al. 1994). Como já foi citado anteriormente, a membrana das PMP apresenta uma série de fosfolipídios aniônicos como a fosfatidilserina, esfingosina 1-fosfato (SPP-1) e o ácido aracdônico (AA). Muitos dos efeitos das PMP no processo hemostático se devem à presença destes lipídios carregados negativamente expostos na sua membrana.

Até pouco tempo atrás o conhecimento do conteúdo protéico das PMP estava restrito a uma pequena quantidade de proteínas de membrana expostas e que podiam ser monitoradas através de análises de citometria de fluxo. Trabalhos atuais possibilitaram uma melhor exploração do proteoma das PMP. Em um dos mais recentes deles (GARCIA et al. 2005), foi identificada a presença de 578 proteínas diferentes em micropartículas de plaqueta. A identificação dessas proteínas foi realizada. A FIGURA 2 demonstra gráficos de proporção dessas proteínas de acordo com três categorias, (A) papel nos processos celulares, (B) função molecular e (C) localização sub celular.

FIGURA 2. PROTEOMA DAS PMP.



NOTA. Gráfico A - papel das proteínas identificadas nas PMP nos processos celulares. Gráfico B - função molecular das proteínas identificadas nas PMP. Gráfico C - localização sub celular das proteínas identificadas nas PMP (GARCIA et al. 2005).

### 1.2.2 Efeitos biológicos das micropartículas

Como foi citado anteriormente as PMP apresentam em suas membranas uma grande quantidade de receptores de ligação Plaqueta-Endotélio como a glicoproteína IIb/IIIa e a P-selectina. Apresentam também lipídios bioativos como SSP-1 e o AA, além de uma gama de diferentes proteínas com variadas funções que estão diretamente relacionadas com seus efeitos biológicos. O papel pró-coagulante das PMP na hemostase e no processo trombótico é evidente (GAMBIM et al. 2007; SJANDER et al. 1996). Porém, os mecanismos pelos quais essa função é exercida ainda não são muito conhecidos, e por isso são alvos constantes de diversos estudos (MOREL et al., 2004). A interação das PMP com células tem sido associada com algumas respostas biológicas como:

- Ativação de células endoteliais – Esse processo estaria ocorrendo por meio de um mecanismo transcelular de lipídio, onde a ativação plaquetária poderia modular a ativação de plaquetas adjacente e de células endoteliais através do envio de AA as mesmas (BARRY et al., 1997).
- Ativação de leucócitos polimorfonucleares - Uma vez que foi comprovada a associação das PMP a neutrófilos e monócitos por alterações celulares características de uma ativação (MIYAMOTO et al. 1998).
- Ativação e indução de quimiotaxia de monócitos U-937 – (BARRY and FITZGERALD 1999; BARRY et al. 1999)
- Modulação da interação monócito-endotélio – PMP podem estimular a adesão dos monócitos às células endoteliais de forma dose dependente. Esse estímulo ocorre por um aumento na expressão de proteínas de adesão celular. Dessa forma quanto maior a concentração de PMP maior é a velocidade de adesão monócito – endotélio (BARRY et al. 1998).



- Modulação da interação leucócito-leucócito – PMP estimulam a adesão de leucócitos através de um aumento da expressão de moléculas de adesão como a P-selectina que pode formar pontes de ligação com outros leucócitos (FORLOW et al. 2000).
- Inibição da apoptose em leucócitos polimorfonucleares – A presença de TGF-beta1 nas PMP possivelmente acarreta em uma resposta anti-apoptótica através da via p38 MAP quinase. E esta resposta seria dose dependente (BRUNETTI et al. 2000).
- Estimulação da proliferação de células endoteliais, musculares lisas e hematopoiéticas. – Células musculares lisas são estimuladas em sua proliferação pelas PMP por vias independentes de PDGF, como a via p42/p44 MAP quinase. Já as células hematopoiéticas têm sua migração, adesão, proliferação e sobrevivência estimuladas pela PMP por vias como p42/p44 MAP quinase, PI3-K-AKT e STAT (WEBER et al. 2000 e BAJ-KRZYWORZEKA et al. 2002).

As micropartículas, sozinhas, podem ser vistas como um "local de armazenamento". Disseminam, via tecido sanguíneo, fatores de ativação, fosfolípidios pró-coagulantes e proteínas com diversas atividades. O conhecimento das moléculas envolvidas nesses processos aumenta as evidências da existência de ciclos integrados que envolvem eventos muito dinâmicos de trocas e transferências que multiplicam as interações PMP – células. Esse conhecimento, com certeza, irá aumentar com os trabalhos que estão surgindo e provavelmente novos efeitos biológicos serão atribuídos as PMP futuramente (HORSTMAN E AHN, 1999).

### **1.2.3 Micropartículas e as situações patológicas**

A presença de micropartículas em desordens clínicas foi descrita há muito tempo atrás quando foram visualizadas por microscópios eletrônicos de

transmissão (WARREN E VALES, 1972). Mas foi em 1986 que foram observadas, por citometria de fluxo, as primeiras concentrações anormais de PMP em casos clínicos (GEORGE et al. 1986).

A secreção plaquetária de micropartículas tem sido alvo de muitos trabalhos atualmente. O grande motivo desse interesse é a demonstração de alterações na sua concentração plasmática em situações clínicas onde o risco trombótico é elevado (VAN WIJK et al. 2003; MURAKAMI et al. 2007).

A variação da concentração de PMP no plasma pode ocorrer por deficiências na formação de vesículas ou por formação anormal de micropartículas. A seguir, alguns exemplos de desordens clínicas onde, de alguma forma, a concentração de PMP no plasma é verificada como anormal.

#### Deficiências na formação de vesículas.

- Síndrome de Scott – doença hemorrágica rara onde há a deleção ou mutação do gene de uma fosfatidil translocase que está envolvida diretamente com a simetria da membrana plasmática, ativação e liberação de micropartículas em plaquetas. Pacientes com esta síndrome apresentam uma capacidade limitada de ativação plaquetária e, conseqüentemente, uma limitada liberação de PMP (SIMS et al. 1989; DACHARY-PRIGENT et al. 1997).

#### Formação anormal de micropartículas

- Púrpura Trombocitopênica auto-imune - causada pela diminuição de plaquetas no sangue periférico do paciente. Essa destruição ocorre por um mecanismo ainda não conhecido que faz com que as plaquetas tornem-se estranhas ao próprio organismo iniciando uma reação auto-imune. A concentração de PMP em indivíduos portadores desta desordem clínica é significativamente maior que em indivíduos saudáveis (GALLI et al. 1996). Segundo estudos realizados in vitro, essa concentração estaria sendo elevada devido à ligação de anticorpos às glicoproteínas CD41, o que estaria acarretando na liberação de PMP e na conseqüente destruição das plaquetas (JY et al. 1992).

- Ataques isquêmicos transientes – Alguns trabalhos foram realizados visando relacionar a concentração de PMP com acidentes vasculares cerebrais (AVC). Foi encontrada significância principalmente com isquemias em pequenos vasos sanguíneos cerebrais (WANG et al., 1997).
- Síndromes coronárias agudas – A análise da concentração de PMP, da expressão de P-selectina, da interação plaqueta-leucócito e da concentração de  $Ca^{2+}$  plaquetário, foi feita em diversos casos de síndrome coronária aguda. Entre esses casos que foram estudados estão pacientes que sofreram infarto do miocárdio e pacientes com angina instável. A concentração de PMP foi significativamente maior em ambos os casos quando comparados à indivíduos controle (KATAPODIS et al., 1997; MALLAT, Z. et al, 2000).
- Diabetes - Um aumento significativo na concentração plasmática de P-selectina, CD40L, e CD63 (ambas liberadas pelas PMP) foi observado em pacientes portadores de Diabetes Tipo 2 que desenvolveram aterosclerose (TAN et al. 2005). Foi observado também um aumento progressivo na concentração de PMP em portadores de Diabetes Retinopática de acordo com o avanço da doença (OGATA et al, 2005). No entanto, o mecanismo pelo qual o aumento na concentração plasmática de PMP é induzido pela Diabetes não é muito claro.
- Hipertensão – Em estudos realizados, foi observada uma relação significativa da concentração aumentada de PMP em pacientes que apresentam casos severos de hipertensão. Sugeriu-se que os efeitos combinados das PMP e das micropartículas endoteliais na coagulação, dos leucócitos e do próprio endotélio estariam realizando um papel patogênico no órgão danificado pela hipertensão (PRESTON et al, 2003).
- Arteriosclerose – Por apresentar um importante papel no processo trombótico, por possuírem lipídios bioativos que realizam importantes

efeitos na angiogênese e por apresentarem um papel pró-inflamatório, as PMP podem facilmente ser associadas a todas as etapas da aterosclerose (TAN e LIP, 2005; BOULANGER et al, 2006).

- Mal de Alzheimer – Pacientes com o Mal de Alzheimer apresentam uma maior ativação plaquetária (e conseqüente agregação), uma maior concentração de CD62p e uma maior concentração do complexo leucócito-plaqueta. É possível que essa ativação plaquetária esteja sendo promovida pelas células danificadas do endotélio cerebral (SEVUSH et al, 1998). Trabalhos recentes demonstraram que as PMP são a principal fonte de proteínas precursoras de amilóide e peptídeos beta-amilóides no sangue humano. É possível então que a ativação plaquetária do Mal de Alzheimer possa refletir ou até contribuir na patogenicidade da doença (MATSUBARA et al, 2002).
- Esclerose Múltipla – Estudos demonstraram um aumento na concentração de PMP e o aumento da expressão de CD62p em pacientes com esclerose múltipla. Foi detectada também uma grande quantidade de plaquetas associadas com IgM, sugerindo um consumo imuno-mediado de plaquetas em esclerose múltipla (KOLODNY et al, 1996; KIKTENKO et al, 2005).
- Em cirurgia de *bypass* cardiopulmonar e em Hemodiálise – de 40 a 70% dos pacientes que passam por cirurgias que tenham *bypass* cardiopulmonar ou pacientes que passam por hemodiálises constantes apresentam complicações neurológicas resultantes da formação de pequenos coágulos. A ativação plaquetária e conseqüente liberação das PMP pode estar sendo induzida durante a passagem do sangue pelo equipamento médico (GRIECO et al, 1996).
- Lúpus Eritematoso Sistêmico – O aumento no número de PMP circulantes em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico e a sua associação com a produção de trombina e com a ativação do sistema de coagulação sugerem que essas PMP realizam um importante papel na patogenicidade do estado pró-trombótico nesses pacientes (PEREIRA et al, 2006).

- Obesidade – Uma super-produção de PMP e anormalidades fibrinolíticas estão correlacionadas com o índice de massa corporal (IMC), volume de gordura visceral e volume de gordura subcutâneo. Também foi encontrada uma variação nas mesmas características durante a redução do tecido adiposo através de uma dieta de redução calórica (MURAKAMI et al, 2007)

### 1.3 ASPECTOS REDOX E PROLIFERAÇÃO CELULAR

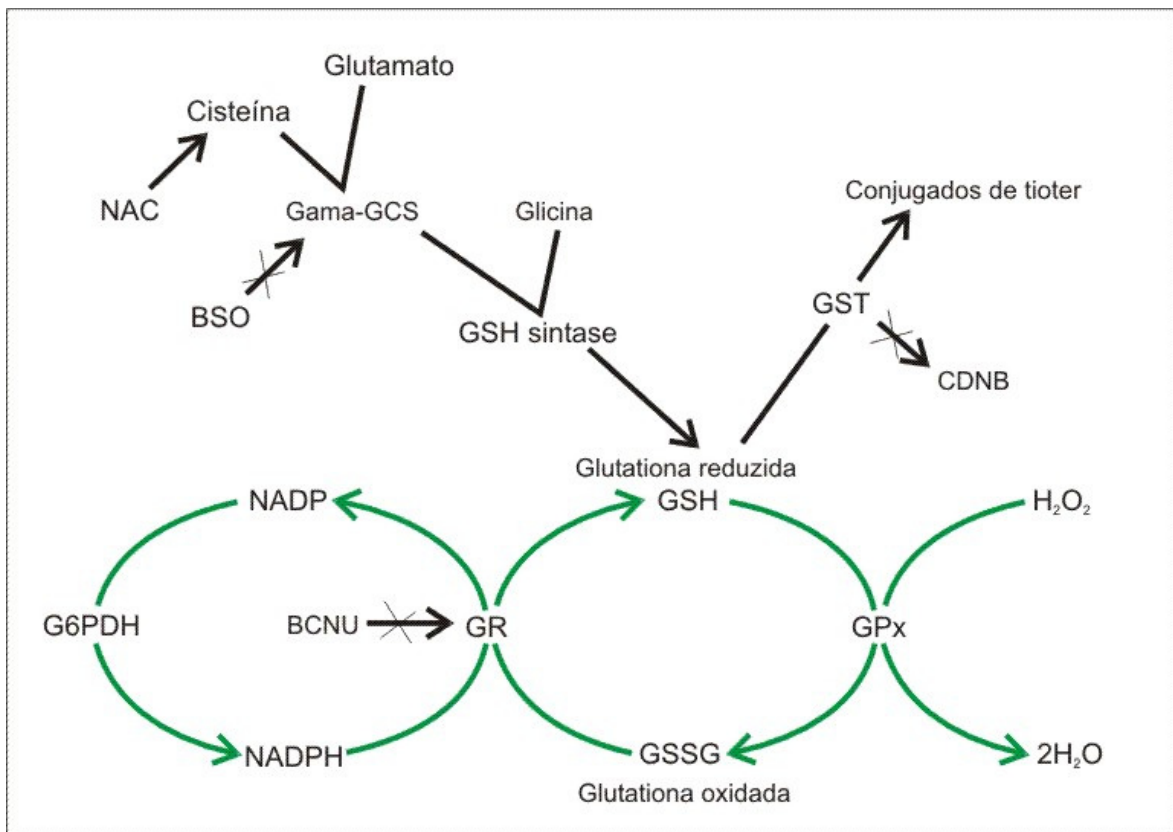
Os efeitos das alterações redox em eventos celulares e moleculares têm sido muito estudados nos últimos anos. O estado redox da célula indica o balanço entre as moléculas oxidadas e as moléculas reduzidas encontradas no citoplasma. Esse balanço é diretamente influenciado por fatores fisiológicos e ambientais e atua diretamente a ativação de enzimas, a síntese de DNA, a proliferação celular, os mecanismos de regulação da apoptose ou morte celular programada, o enovelamento de proteínas, a ativação de fatores transcricionais, entre outras atividades (ALIDOOST et al. 2006). O estado redox e alguns tiol (compostos que apresentam o grupo –SH) regulam a expressão de genes associados a patogenia de algumas doenças, como câncer, aterosclerose, AIDS, diabetes, etc. (SARRASAGUE, 2006; MCCALL e FREI, 1999).

O estado redox intracelular é bastante influenciado pelo par GSH/GSSG (HWANG et al. 1992). A glutathiona é o tiol de baixa massa molecular mais abundante na célula e exerce uma série de funções, entre elas a proteção da célula contra espécies oxidantes (BRAY e TAYLOR, 1993), transdução de sinais (BLACKBURN et al. 1999), expressão de genes (ARRIGO, 1999), modulação da atividade de proteínas (DENU e TANNER, 1998), síntese de desoxirubonucleotídeos (DALTON et al., 1999), necrose (DAVIS et al., 2000) e apoptose (WANG et al., 2000). Está também associada à proliferação celular (HUTTTER et al., 1997; CHANG et al., 1999; ALIDOOST et al. 2006; TIAN et al., 2007) e atua como fator de crescimento (IANTOMASI et al., 1999, KANDA et al., 2006).

A síntese de glutathiona reduzida (GSH) e a oxidação dessa molécula (formando a glutathiona-dissulfeto, GSSG) durante o metabolismo celular contribui

diretamente com a manutenção do estado redox (ARRICK e NATHAN, 1984). A GSH é sintetizada no citoplasma, no entanto, 10 a 15% ficam localizadas nas mitocôndrias para protegê-las da água oxigenada e das demais espécies reativas de oxigênio produzidas durante o metabolismo celular. A GSH é conhecida quimicamente como N-L- $\gamma$ -glutamil-L-cisteinil-glicina, sua fórmula molecular é  $C_{10}H_{17}N_3O_6S$  e sua massa molecular é 307,33 g/mol. A GSSG é conhecida quimicamente como L-  $\gamma$  -glutamil-L-cisteinil-glicina disulfeto e sua fórmula molecular é  $C_{20}H_{32}N_6O_{12}S_2$  (HARLAN et al., 1984; SARRASAGUE, 2006). O ciclo redox da glutatona está demonstrado na FIGURA 3.

FIGURA 3: CICLO REDOX DA GLUTATIONA.



NOTA. Figura adaptada de Harlan et al. 1984.  $\gamma$ -GCS:  $\gamma$ -glutamilcisteína sintase, GST: glutatona S-transferase, G6PDH: glucose-6-fosfato desidrogenase, GR: glutatona redutase, GPx: glutatona peroxidase, BSO: butioniona sulfoximina, CDNB: 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno, BCNU: 1,3-bis(2-cloroetil)-1-nitrosourea, NAC: N-acetil-cisteína.

Estudos anteriores estabeleceram uma ligação entre a concentração de GSH intracelular e a atividade proliferativa. Células em crescimento ativo sofrem um aumento no seu total de GSH celular apresentando-se, assim, com um

potencial mais redutor. Um aumento do total de GSSG e conseqüente diminuição do total de GSH (potencial menos redutor) está associado a uma diminuição da proliferação celular (OBRADOR et al., 1997). Outros estudos indicam que é necessária a manutenção de concentrações elevadas de GSH para a estimulação induzida da proliferação celular (CHANG et al., 1999).

A alteração do estado redox pode ser obtida farmacologicamente por meio da modulação da síntese de glutathione. Já foi demonstrado que a DL-butionina-SR-sulfoximina (BSO) é um inibidor específico da  $\gamma$ -glutamylcisteína sintase, que é a enzima que sintetiza a GSH intracelular (GRIFFITH, 1982). Com a administração de BSO, a concentração de GSH reduz de maneira que a célula torna-se menos redutora. Isso ocorre devido a uma diminuição na proporção GSH/GSSG.

De maneira inversa, a administração de precursores da GSH como a N-acetilcisteína (NAC) aumenta a concentração de GSH intracelular (NEUHAUSER et al., 1986). A NAC tem a habilidade de penetrar na membrana plasmática e ser facilmente convertida em cisteína por desacetilação (DE VRIES e DE FLORA, 1993). Com a presença de grandes quantidades de substrato, a  $\gamma$ -glutamylcisteína sintase produz uma quantidade maior de GSH (que em excesso exerce um *feedback* negativo na enzima) aumentando assim a proporção GSH/GSSG tornando o estado redox intracelular mais redutor (HUTTTER et al., 1997). O mecanismo pelo qual o NAC e o BSO atuam na modulação da produção de GSH também pode ser observado na figura 2.

Alguns estudos foram realizados por meio da modulação do redox celular por NAC e BSO e, em geral, observou-se um aumento na proliferação de diversos tipos celulares diferentes quando o estado redox intracelular sofre uma alteração, não muito grande, para um estado mais redutor. Quando a alteração é para um estado menos redutor observou-se que ocorre uma significativa diminuição na proliferação celular (TIAN et al., 2007; ALIDOOST et al., 2006; KYAW et al., 2004; NODA et al. 2001). O mecanismo pelo qual o GSSG ou a proporção de glutathione reduzida/oxidada influencia na proliferação celular ainda não é muito claro, porém algumas proposições podem ser feitas.

Alterações muito severas do redox celular podem interferir no enovelamento correto de algumas proteínas impedindo a formação de estruturas funcionais na proteína ou impedindo que elas sejam fosforiladas corretamente

(MOUSSAZADEH e GREENE, 2000). A capacidade proliferativa das células é controlada basicamente pela ativação ou inibição de genes reguladores de crescimento. Uma grande quantidade de proteínas que se ligam ao DNA (fatores transcricionais) permite a iniciação transcricional em resposta a sinais intra ou extracelulares, realizando assim um importante papel na regulação desses genes por meio da seleção da síntese dos RNAs mensageiros. Alguns desses fatores transcricionais se associam a outras proteínas ou até podem sofrer alterações pós-transcricionais para obter sua conformação correta (MITCHELL e TJIAN, 1989). Algumas enzimas são ativadas ou desativadas quando espécies reativas de oxigênio interagem com metioninas ou cisteínas expostas (FORMAN, 2007). Com isso, se grandes alterações químicas (como grandes alterações no redox celular) ocorrerem durante o processo transcricional de maneira a alterar a conformação dessas proteínas, a atividade das mesmas pode ser comprometida interrompendo assim o processo. Experimentos comprovaram que alterações no estado redox celular (para mais oxidado) interferem na capacidade de alguns fatores transcricionais de se ligarem aos seus sítios específicos no DNA (CLIVE, D.R e GREENE, 1996).



## 2 OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho são:

- Confirmar o potencial mitogênico de PMP em células musculares lisas de aorta de coelho (RASM).
- Avaliar se as PMP alteram o estado redox intracelular das células RASM.
- Verificar se a proliferação celular em células RASM induzida por PMP correlaciona-se com as alterações no estado redox intracelular.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 OBTENÇÃO DE MICROPARTÍCULAS DE PLAQUETAS POR ATIVAÇÃO COM IONÓFORO DE CÁLCIO

As micropartículas foram isoladas de bolsa de concentrado de plaquetas doadas pelo Hemobanco de Curitiba. As bolsas foram doadas dentro do seu prazo de uso clínico ou próximo do seu vencimento. O volume total da bolsa de plaquetas, que é de aproximadamente 50 mL, foi dividido em 2 tubos com cerca de 25 ml cada. O pH foi ajustado em 6,4 utilizando ácido cítrico 0,15 M e foram adicionados 50 nM de PGE1 (prostaglandina E1) em cada um dos tubos. Os tubos foram centrifugados a 160xg por 10 minutos na temperatura ambiente. O PRP foi coletado e transferido para tubos novos e novamente centrifugado a 1.400xg por 10 minutos na temperatura ambiente. O *pellet* plaquetário foi cuidadosamente (para evitar a ativação plaquetária prematura) ressuspenso em 0,5 mL de tampão CAF (NaCl 2,74 M; KCl 54 mM; NaHCO<sub>3</sub> 0,24 M; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 7,25 mM; MgCl<sub>2</sub> 0,1 M) pH 6,2 com 50 ng/mL de PGE1. Neste momento o cuidado era maior quando haviam hemácias sedimentadas abaixo das plaquetas. O *pellet* de plaqueta foi cuidadosamente ressuspenso para que as hemácias não fossem coletadas junto com as mesmas. Uma alíquota de 10 µL desta suspensão de plaquetas foi utilizada para a contagem do número de células. Para isso, os 10 µL da suspensão foram diluídos com 190 µL de oxalato de amônio 1% e 10 µL desta última suspensão foram aplicados na câmara de Neubauer. As plaquetas quantificadas foram centrifugadas novamente a 1.400xg por 10 minutos na temperatura ambiente e posteriormente ressuspendidas em tampão TAF (NaCl 2,74 M; KCl 54 mM; NaHCO<sub>3</sub> 0,24 M; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 7,25 mM; MgCl<sub>2</sub> 0,1 M; CaCl<sub>2</sub> 100 mM) pH 6,2 com 1 mg/ml de glicose, numa concentração 10<sup>9</sup> células/mL de tampão TAF. Esta suspensão foi ativada com ionóforo de cálcio A23187(Sigma) 18 µM a 37°C, por 15 minutos com um pouco de agitação. Após a ativação plaquetária a suspensão foi centrifugada novamente a 1.400xg por 10 minutos porém dessa vez a uma temperatura de 4°C. Essa centrifugação teve como objetivo a remoção de restos celulares ou células inteiras. O sobrenadante foi por fim ultracentrifugado a 50.000xg por 60 minutos a uma temperatura de 4°C. O

*pellet* contendo as micropartículas de plaquetas foi ressuspenso em PBS, e utilizado imediatamente para ensaios de atividade biológica em células em cultivo ou congeladas a -80°C para análise de GSH e GSSG e *Western blotting*. A concentração protéica nas PMP foi determinada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976).

### 3.2 OBTENÇÃO DE LISADO DE PLAQUETAS

Para obtenção do lisado, as plaquetas foram isoladas como foi descrito anteriormente. Da solução que continham as plaquetas isoladas foi retirada uma alíquota de aproximadamente 0,5 mL. Esta suspensão foi centrifugada a 1400g por 10 minutos a temperatura ambiente. O *pellet* foi lisado com 100 µl de solução de lise (1% NP40 em PBS) gelada contendo o coquetel de inibidores de protease (Roche). O lisado foi mantido no gelo por mais 30 min e centrifugado a 12.000g por 10 min a 4°C para a retirada do debris celular. O sobrenadante foi transferido para novo tubo, sua concentração protéica foi determinada e o lisado foi congelado a -20°C.

### 3.3 SDS-PAGE E WESTERN BLOTTING

Cerca de 8µg de proteínas das micropartículas e do lisado foram aplicadas gel de acrilamida 15% (LAEMMLI, 1970) A corrida eletroforética foi iniciada com uma amperagem constante de 12mA. Quando as amostras entraram no gel de separação, a amperagem foi aumentada para 25 mA. A transferência das proteínas do gel para a membrana de nitrocelulose foi realizada em sistema de cuba, a uma voltagem constante de 25V num período de tempo que variou de 12 a 16 horas. Para verificação da eficiência da transferência e da quantidade de proteína aplicada, a membrana foi corada com Ponceau. Para a realização do *Western blotting*, a membrana foi descorada com TBS-T, e os sítios inespecíficos bloqueados com leite em pó desnatado 10% em TBS-T por um período de no mínimo 2 horas. Após o bloqueio, a membrana foi lavada 3 vezes de 30 minutos com TBS-T. Depois da lavagem a membrana foi incubada com o anticorpo

primário  $\alpha$ -PDGF (1:1000) diluído em TBST contendo 1% de leite desnatado, por 16 horas a 4°C. Após o período de incubação a membrana foi novamente lavada 3 vezes de 30 minutos com TBS-T e posteriormente incubada com o anticorpo secundário  $\alpha$ -goat (1:1000) diluído em TBST contendo 1% de leite desnatado, por 16 horas a 4°C. A revelação foi feita com o kit Super Signal® West Pico (Pierce).

### 3.4 CULTIVO E TRATAMENTO DE CÉLULAS MUSCULARES LISAS DE AORTA DE COELHO (RASM)

As células RASM, que são células musculares lisas de aorta de coelho (doadas pela Dra. Helena Nader da Unifesp), foram cultivadas em meio F12 contendo 10% de soro fetal bovino (SFB) e antibiótico e foram distribuídas em placa de 96 poços ou em placas P60 (placas de poliestireno com 60 mm de diâmetro). Ao atingirem uma confluência de aproximadamente 70%, foi feito um carenciamento de SFB por 12 horas. Então foram realizados os tratamentos com micropartículas de plaquetas (10  $\mu$ g/mL e 30  $\mu$ g/mL), NAC (2 mM) e BSO (0,5 mM). Foram realizados controles positivos (Células com meio F12 contendo 10% de SFB) e controles negativos (Células com meio F12 sem SFB). Os períodos de tratamento variaram de acordo com os experimentos. Os períodos de tratamento para os ensaios de proliferação celular foram de 24 e 48 horas, enquanto os períodos de tratamento para a análise do redox celular (proporção GSH/GSSG) variaram entre 1 hora, 3 horas e 24 horas.

### 3.5 ANÁLISE DA PROLIFERAÇÃO CELULAR

A proliferação celular foi analisada pelo método do MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazólio) (DENIZOT e LANG, 1986). O método se baseia na análise da atividade da enzima desidrogenase mitocondrial, que é capaz de metabolizar o reagente MTT em um composto colorido denominado de formazan. Esse composto pode ser diluído e posteriormente quantificado por um

leitor óptico, evidenciando o metabolismo mitocondrial e conseqüentemente a quantidade de células vivas.

Para isso, após os devidos tratamentos das células em placas de 96 poços, o MTT (0,1 mg/poço) foi adicionado ao meio de cultivo e a placa foi incubada em estufa de CO<sub>2</sub> por 3 a 4 horas. Após este período, o meio contendo MTT foi aspirado, as células foram lavadas com PBS e lisadas com 200 µL de DMSO. Os lisados foram transferidos para placas de 96 poços e as absorbâncias do metabólito do MTT foram determinados em leitor de placas, contendo dois filtros diferentes (em referência de  $\lambda=550$  nm e amostra  $\lambda=690$  nm). As leituras, sempre em triplicata, foram corrigidas, considerando o controle negativo (células cultivadas em meio sem soro) como 100%.

Para a análise da atividade proliferativa das PMP foram realizados 3 ensaios de MTT com quatro repetições de cada tratamento. Os tratamentos realizados foram os seguintes: 1 – Meio de cultivo celular F12 sem SFB; 2 – Meio de cultivo celular F12 com 10% de SFB; 3 – Meio de cultivo celular F12 sem SFB + 10µg/mL de PMP e 4 - Meio de cultivo celular F12 sem SFB + 30µg/mL de PMP. Foram feitas quadruplicatas para serem analisadas após 24 horas e quadruplicatas para serem analisadas após 48 horas. Os resultados obtidos através dos ensaios de MTT nas células RASM estimuladas por micropartículas de plaquetas foram analisados estatisticamente através de uma ANOVA de experimento fatorial, onde os dois fatores analisados foram o período de incubação das células na estufa (24 e 48 horas) e o tratamento aplicado na cultura celular.

Para a análise da proliferação celular induzida por alteração do estado redox foram realizados 3 ensaios de MTT com duas repetições de cada tratamento. Os tratamentos realizados foram os seguintes: 1 – Meio de cultivo celular F12 com 1% de soro fetal bovino; 2 – Meio de cultivo celular F12 com 2mM de NAC; 3 – Meio de cultivo celular F12 com 0,5mM de BSO. Foram feitas duplicatas para serem analisadas após 24 horas e duplicatas para serem analisadas após 48 horas. Os resultados obtidos através dos ensaios de MTT nas células RASM estimuladas por alterações do estado redox intracelular foram analisados estatisticamente através de uma ANOVA de experimento fatorial, onde os dois fatores analisados foram o período de incubação das células na estufa (24 e 48 horas) e o tratamento aplicado na cultura celular.

### 3.6 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE GLUTATIONA REDUZIDA E OXIDADA EM CÉLULA MUSCULAR LISA

As células foram cultivadas em meio F12 com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) e antibiótico e foram colocadas em placas P60 (placas de poliestireno com 60 mm de diâmetro). Ao atingirem uma confluência de aproximadamente 70%, foi aspirado o meio (F12 com 10% SFB) e colocado um novo meio F12 com 1% SFB. Foram realizados os tratamentos com PMP (10 µg/mL e 30 µg/mL), NAC (2 mM), BSO 0,5 mM e controles positivos (células com meio F12 contendo 1% SFB) e negativos (células com meio F12 sem SFB). Os períodos de tratamento variaram entre 1 hora, 3 horas e 24 horas. Após o tratamento as células foram tripsinizadas, centrifugadas e congeladas no ultrafreezer -80°C para posterior análise por HPLC.

Para a análise da alteração do estado redox induzida por PMP foram realizados 6 ensaios com três repetições de cada tratamento. Os tratamentos realizados foram os seguintes: 1 – Meio de cultivo celular F12 sem SFB (controle negativo); 2 – Meio de cultivo celular F12 sem SFB + 10 µg/mL de PMP e 3 - Meio de cultivo celular F12 SFB + 30 µg/mL de PMP. Foram feitas triplicatas para serem analisadas após 1 hora e triplicatas para serem analisadas após 3 horas. Os resultados obtidos através do HPLC nas células RASM estimuladas por micropartículas de plaquetas foram analisados estatisticamente através de uma ANOVA de experimento fatorial, onde os dois fatores analisados foram o período de incubação das células na estufa (1 e 3 horas) e o tratamento aplicado na cultura celular.

Para a análise da alteração do estado redox induzida por NAC e BSO foi realizado um ensaio com três repetições de cada tratamento. Os tratamentos realizados foram: 1 – Meio de cultivo sem SFB (controle negativo); 2 – Meio de cultivo com 10% de SFB (controle positivo); 3 - Meio de cultivo sem SFB com 2 mM de NAC; e 4 – Meio de cultivo sem SFB com 0,5 mM de BSO. O período em que as células foram expostas aos tratamentos foi de 24 horas. As três repetições de cada tratamento foram injetadas simultaneamente no HPLC.

### 3.7 TRATAMENTO ESTATÍSTICO DOS DADOS.

Os dados obtidos através dos ensaios de MTT nas células RASM e os obtidos no HPLC de proporção GSH/GSSG foram analisados com o auxílio do sistema estatístico ASSISTAT versão 7.3 beta (2006). Foram realizadas ANOVAs para experimento fatorial. Os dois fatores analisados no MTT foram o período de incubação das células na estufa (24 e 48 horas) e o tratamento aplicado na cultura celular (10% SFB, 10 µg/mL PMP, 30 µg/mL PMP, 2 mM NAC e 0,5 mM BSO). O fator analisado para o estudo do estado redox variou de acordo com o experimento. Para o experimento único do efeito do NAC e do BSO no redox não foi necessária a realização da análise estatística. Para o estudo do efeito das PMP no estado redox foram analisados os fatores tratamentos e período de incubação das células na estufa (1 e 3 horas).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 PROLIFERAÇÃO CELULAR INDUZIDA POR MICROPARTÍCULAS DE PLAQUETAS.

Os resultados dos experimentos de MTT para a análise da proliferação celular induzida por micropartículas de plaquetas foram analisados estatisticamente e o quadro de análise obtido está representado na TABELA 1.

TABELA 1. RESULTADOS DOS EXPERIMENTOS DE PROLIFERAÇÃO CELULAR INDUZIDA POR PMP.

F.V.	G.L.	S.M.	Q.M.	F
Blocos	2	1,19540	0,59770	24,0574 **
Fator 1 (tratamento)	3	0,71097	0,23699	9,5388 **
Fator 2 (24 e 48h)	1	0,15137	0,15137	6,0926 *
Interação F1 x F2	3	0,13144	0,04381	1,7635 ns
Resíduo	14	0,34783	0,02484	
Total	23	2,53700		

NOTA. \*\* - significativo ao nível de 1% de probabilidade (p-valor < 0.01), \* - significativo ao nível de 5% de probabilidade (p-valor < 0.05), ns – não significativo (p-valor > 0.05), C.V. = 20,78%  
F.V.: fator de variância, G.L.: grau de liberdade, S.M.: desvio médio, Q.M.: quadrado médio.

As significâncias encontradas na análise demonstram:

- Os resultados dos 3 experimentos se assemelham em sua maioria.
- Com relação aos tratamentos foram encontrados 3 valores diferentes, e esses valores recebem as letras A, B e C como indicadores. O tratamento 2 (meio de cultivo com 10% de SBF) foi o que atingiu a maior eficiência na proliferação de células RASM e por assim ser recebe o valor "A". O tratamento 4 (meio de cultivo + 30 µg/mL de PMP) se assemelha ao tratamento 2 porém não são iguais, por isso recebe o valor "AB". O tratamento 3 (meio de cultivo + 10 µg/mL de PMP) se assemelha ao tratamento 4 porém difere muito do tratamento 2, assim recebe o valor "BC". Já o tratamento 1 (meio de cultivo sem SBF) difere muito dos tratamentos 2 e 4, se assemelha ao tratamento 3 mas mesmo assim são diferentes, ou seja, recebe o valor "C". A interpretação desses dados nos indica



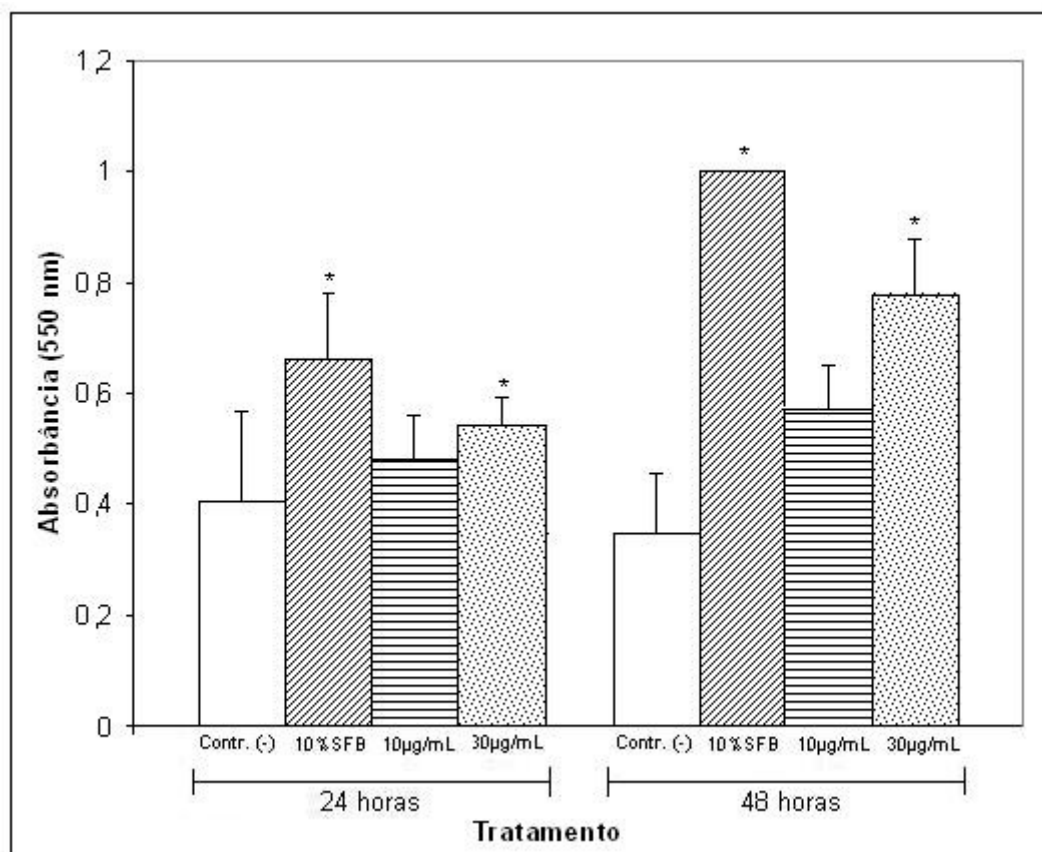
que o tratamento com 10% de SFB promoveu um aumento significativo na taxa de proliferação celular tanto em 24 quanto em 48 horas quando comparado à célula incubada somente com meio de cultivo. O tratamento com com 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de PMP aumentou a proliferação, em 24 e 48 horas, porém sem diferença estatística significativa. Contudo, o tratamento com 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de PMP estimulou a proliferação significativamente, embora com menor intensidade que o SFB.

- Sobre os períodos de exposição ao tratamento a análise encontrou dois valores bem distintos. Isso comprova que há uma significativa diferença nos dois diferentes tempos de exposição, 24 e 48 horas.

- A respeito da interação entre os dois fatores, tratamento e o período de incubação, não foi encontrada nenhuma significância. Ou seja, o período de exposição não varia o tipo ou a intensidade do estímulo realizado pelos tratamentos.

Com a análise geral dos dados obtido foi possível a realização de um gráfico geral dos experimentos realizado. Para a realização deste gráfico foram atribuídos valores proporcionais aos valores das absorbâncias obtidas nos experimentos (Gráfico 1).

GRÁFICO 1. RESULTADOS DOS EXPERIMENTOS DE PROLIFERAÇÃO CELULAR INDUZIDA POR PMP.



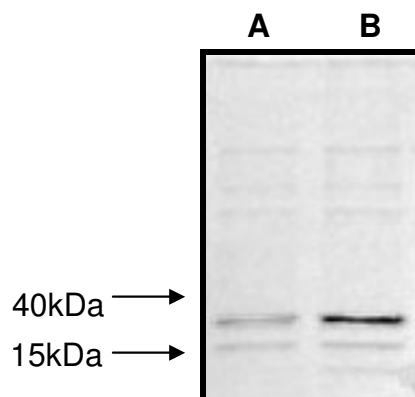
NOTA. Efeitos das PMP (10 – 30 µg protein/mL) na proliferação de células RASM em 24 e 48 horas. Os dados representam resultados de 3 experimentos com 3 diferentes culturas de células RASM e 3 diferentes obtenções de PMP.

#### 4.2 DETERMINAÇÃO DA PRESENÇA DE PDGF EM MICROPARTÍCULAS DE PLAQUETAS.

Como foi citado anteriormente, um dos efeitos biológicos atribuídos às micropartículas de plaquetas é o de induzir a proliferação celular. Alguns trabalhos estudaram a influencia do PDGF neste efeito mitogênico e relatam que a indução na proliferação realizada pelas PMP pode ser independente deste fator de crescimento ( PAKALA, 2004; GRUBER et al., 2002; WEBER et al., 2000).

Para verificar se o potencial mitogênico das PMP era devido à presença de PDGF, foi realizada uma série de 3 ensaios de Western blotting utilizando o anticorpo anti-PDGF e como controle positivo um lisado de plaquetas, foram detectadas pequenas concentrações de PDGF nas amostras de PMP analisadas. Isso pode ser observado na FIGURA 4.

FIGURA 4. RESULTADO DO WESTERN BLOTTING PARA O ANTICORPO ANTI-PDGF.



NOTA. Amostras indicadas: (A) 22 $\mu$ g de proteínas de PMP em tampão de amostra não redutor e (B) 12 $\mu$ g de proteínas obtidas de um lisado de plaquetas em tampão de amostra não redutor. As concentrações de proteínas foram mensuradas por Bradford. A figura é de um experimento representativo de um n=3.

#### 4.3 ALTERAÇÃO DO ESTADO REDOX INDUZIDA POR PMP.

Os resultados obtidos nos experimentos para análise da alteração no estado redox da célula induzida por PMP foram analisados estatisticamente e o quadro de análise obtido está representado na TABELA 2.

TABELA 2. RESULTADOS DOS EXPERIMENTOS DE ALTERAÇÃO DO ESTADO REDOX INDUZIDA POR PMP.

F.V.	G.L.	S.M.	Q.M.	F	
Blocos	4	7,94649	1,98662	5,8900	**
Fator 1 (1 e 3h)	1	1,39144	1,39144	4,1254	ns
Fator 2 (tratamento)	2	2,81329	1,40665	4,1705	*
Interação F1 x F2	2	0,91303	0,45651	1,3535	ns
Resíduo	20	6,74570	0,33729		
Total	29	2,53700			

NOTA. \*\* - significativo ao nível de 1% de probabilidade (p-valor < 0.01), \* - significativo ao nível de 5% de probabilidade (p-valor < 0.05), ns – não significativo (p-valor > 0.05), CV = 13,28% F.V.: fator de variância, G.L.: grau de liberdade, S.M.: desvio médio, Q.M.: quadrado médio.

As significâncias encontradas na análise demonstram:

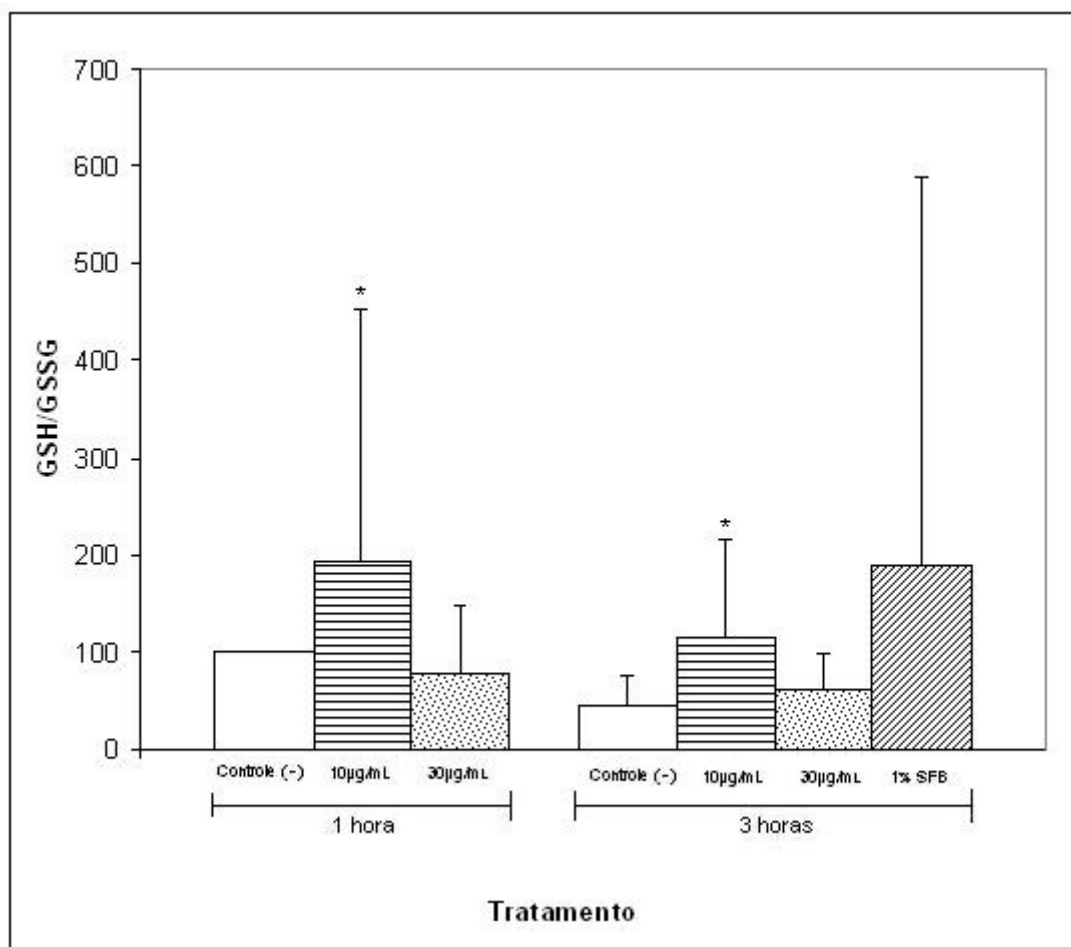
- Os resultados dos 3 experimentos se assemelham em sua maioria.
- Com relação aos tratamentos foram encontrados 2 valores diferentes, e esses valores recebem as letras A e B como indicadores. O tratamento 2 (Meio de cultivo celular F12 sem soro fetal bovino + 10 µg/mL de PMP) foi o que apresentou a maior eficiência indução da alteração do estado redox de células RASM e por assim ser recebe o valor "A". Os tratamentos 1 (Meio de cultivo celular F12 sem soro fetal bovino) e 3 (meio de cultivo + 30 µg/mL de PMP) se assemelham mas por sua vez diferem do tratamento 2 por apresentarem menor eficiência na indução do estado redox das células RASM, por isso recebem o valor "B". A interpretação desses dados nos indica um aumento significativo na proporção GSH/GSSG intracelular no tratamento com 10 µg/mL de PMP quando comparado ao tratamento com meio de cultura sem SFB. Por sua vez o tratamento com 30 µg/mL de PMP não apresentou alterações significativas na proporção GSH/GSSG intracelular quando comparado ao tratamento com meio de cultura sem SFB.

- Sobre os períodos de exposição ao tratamento, a análise encontrou um único valor. Isso comprova que não há diferença significativa entre os períodos de exposição, 1 e 3 horas.

- A respeito da interação entre os dois fatores, tratamento e o período de incubação, não foi encontrada nenhuma significância, ou seja, o período de exposição não varia o tipo ou a intensidade do estímulo realizado pelos tratamentos.

Com a análise geral dos dados obtidos foi possível a realização de um gráfico geral dos experimentos realizados. Para a realização deste gráfico os valores obtidos no HPLC foram padronizados (Gráfico 2).

GRÁFICO 2. RESULTADOS DOS EXPERIMENTOS DE ALTERAÇÃO DO ESTADO REDOX INDUZIDA POR PMP.



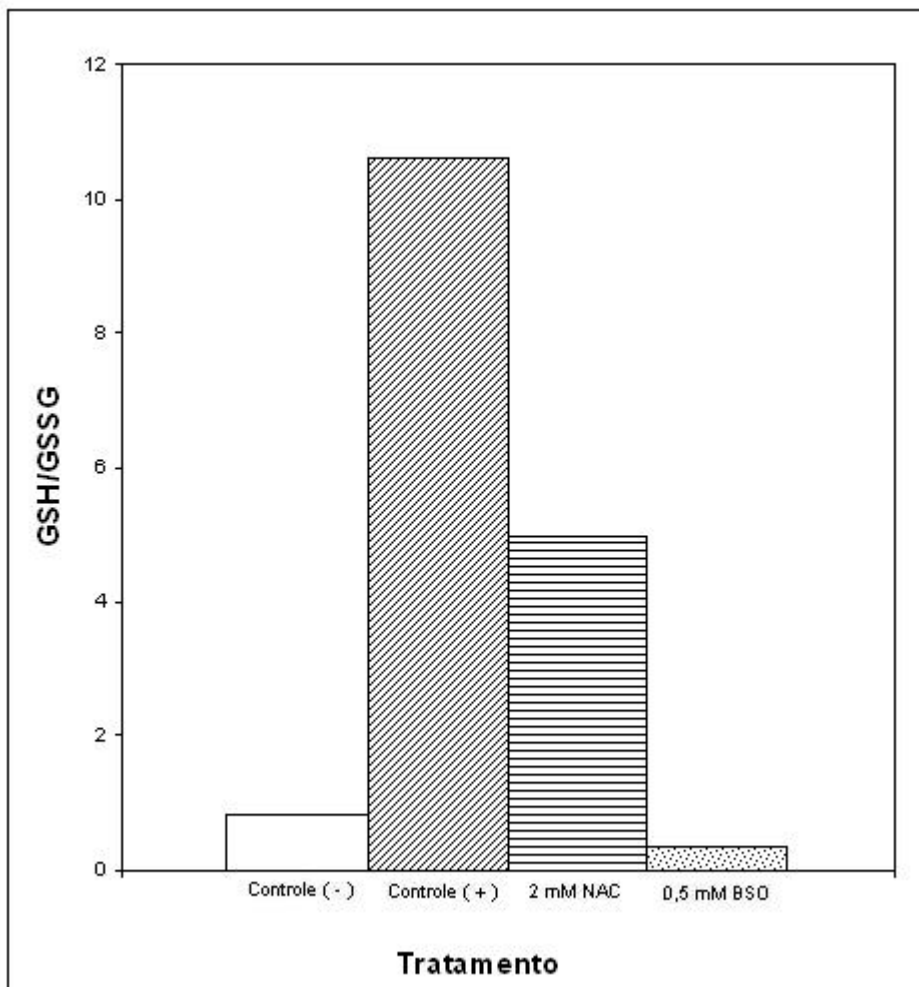
NOTA. Efeitos das PMP (10 – 30 µg/mL) na alteração do estado redox de células RASM em 1 e 3 horas. Os dados representam resultados de 6 experimentos com 6 diferentes culturas de células RASM e 6 diferentes obtenções de PMP.

Separadamente também foram analisadas 3 amostras de PMP quanto a sua proporção GSH/GSSG. Verificou-se que as PMP apresentam um potencial altamente redutor apresentando uma proporção GSH/GSSG elevada.

#### 4.4 ALTERAÇÃO DO ESTADO REDOX DAS CÉLULAS RASM INDUZIDA POR NAC E BSO.

O resultado obtido através da leitura em HPLC da proporção GSH/GSSG está representada no gráfico 3.

GRÁFICO 3. RESULTADO DO EXPERIMENTO DE ALTERAÇÃO DO ESTADO REDOX DAS CÉLULAS RASM INDUZIDA POR NAC E BSO.



NOTA. Efeitos do NAC (2mM) e do BSO (0,5mM) na proporção GSH/GSSG das células RASM. Os dados representam resultados de 1 experimento com 3 repetições de cada tratamento. Controle (-):Meio de cultivo celular F12 sem soro fetal bovino, Controle (+):Meio de cultivo celular F12 com 1% de soro fetal bovino.

#### 4.5 PROLIFERAÇÃO CELULAR INDUZIDA POR ALTERAÇÃO NO ESTADO REDOX INTRACELULAR.

Os resultados dos experimentos de MTT para a análise da proliferação celular induzida por alteração no estado redox da célula foram analisados estatisticamente e o quadro de análise obtido está representado na TABELA 3.

TABELA 3. RESULTADOS DOS EXPERIMENTOS DE PROLIFERAÇÃO CELULAR INDUZIDA POR ALTERAÇÃO NO ESTADO REDOX INTRACELULAR.

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Fator 1 (tratamento)	3	0,74963	0,24988	35,9988 **
Fator 2 (24 e 48h)	1	0,63766	0,63766	91,8647 **
Interação F1 x F2	3	0,05442	0,01814	2,6132 ns
Resíduo	16	0,11106	0,00694	
Total	23	1,55276		

NOTA. \*\* - significativo ao nível de 1% de probabilidade (p-valor < 0.01), ns – não significativo (p-valor > 0.05), C.V. = 15,56% F.V.: fator de variância, G.L.: grau de liberdade, S.M.: desvio médio, Q.M.: quadrado médio.

As significâncias encontradas na análise demonstram:

- Os resultados dos 3 experimentos se assemelham em sua maioria.
- Com relação aos tratamentos foram encontrados 3 valores diferentes, e esses valores recebem as letras A, B e C como indicadores. O tratamento 1 (meio de cultivo com 1% de SBF) foi o que atingiu a maior eficiência na proliferação de células RASM e por assim ser recebe o valor “A”. O tratamento 2 (meio de cultivo + 2mM de NAC) foi considerado igual ao tratamento 1 com relação á eficiência na proliferação de células RASM e por assim ser também recebe o valor “A”. O tratamento 3 (meio de cultivo sem SBF) obteve uma menor eficiência na proliferação das células RASM e recebeu o valor “B”. O tratamento 4 (meio de cultivo + 0,5mM de BSO) por sua vez foi o que apresentou o pior desempenho na estimulação da proliferação das células RASM recebendo assim o valor “C”. A interpretação desses dados nos indica uma diminuição significativa na proliferação celular no tratamento com BSO quando comparados ao tratamento com meio de cultura sem SFB. Indica também um aumento significativo na proliferação celular no tratamento com NAC quando comparados ao tratamento com meio de cultura

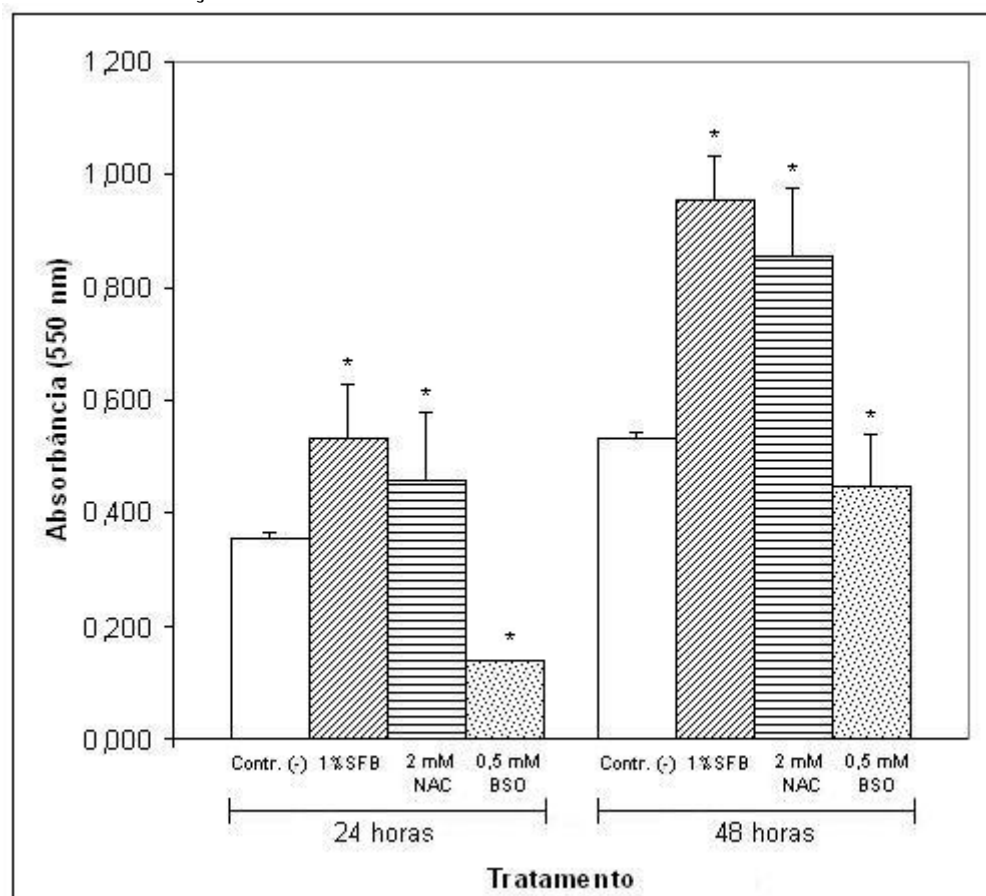
sem SFB. O tratamento com 1% de SFB foi ainda mais efetivo na indução da proliferação que o tratamento com NAC.

- Sobre os períodos de exposição ao tratamento a análise encontrou dois valores bem distintos. Isso comprova que há uma significativa diferença nos dois diferentes tempos de exposição, 24 e 48 horas.

- A respeito da interação entre os dois fatores, tratamento e o período de incubação, não foi encontrada nenhuma significância. Ou seja, o período de exposição não altera a intensidade do estímulo realizado pelos tratamentos.

Com a análise geral dos dados obtidos foi possível a realização de um gráfico geral dos experimentos realizados. Para a realização deste gráfico foram atribuídos valores proporcionais aos valores das absorbâncias obtidas nos experimentos (Gráfico 4).

GRÁFICO 4. RESULTADOS DOS EXPERIMENTOS DE PROLIFERAÇÃO CELULAR INDUZIDA POR ALTERAÇÃO NO ESTADO REDOX INTRACELULAR.



NOTA. Efeitos do NAC (2mM) e do BSO (0,5mM) na proliferação de células RASM em 24 e 48 horas. Os dados representam resultados de 3 experimentos com 3 diferentes culturas de células RASM.



## 5 DISCUSSÃO

Em 2000, Weber e colaboradores mostraram que PMP induzem proliferação de células musculares lisas de modo independente de PDGF (Weber et al. 2000). Neste trabalho, confirmamos os dados de Weber, mostrando que PMP obtidas pela ativação de plaquetas por A23187 são também capazes de estimular a proliferação de células musculares lisas de aorta de coelho. As concentrações protéicas de PMP utilizadas nos tratamentos foram inspiradas em trabalhos anteriores bem sucedidos como o de Pakala em 2004. Observou-se uma diferença significativa do tratamento com 30  $\mu\text{g/mL}$  de PMP quando comparado ao tratamento com meio de cultura sem SFB (controle negativo), evidenciando assim o poder mitogênico das PMP. Com relação aos períodos de exposição ao tratamento (24 e 48 horas) não foi observada qualquer forma de interação com os tratamentos, ou seja, o período de exposição não varia o tipo ou a intensidade do estímulo realizado pelos tratamentos. O fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF) é um agente reconhecidamente mitogênico para as células musculares lisas e poderia ser o fator responsável por este efeito nos trabalhos de Weber e no nosso. Entretanto, o trabalho citado evidenciou que o efeito mitogênico das PMP difere do efeito mitogênico do PDGF, uma vez que a estimulação das PMP é sensível a variações na temperatura, enquanto a proliferação celular induzida pelo PDGF não se altera sobre as mesmas variações térmicas. Como o PDGF foi recentemente caracterizado em PMP (Garcia et al 2005), decidimos avaliar a presença deste fator em nossas PMP. Em três preparações de PMP distintas detectou-se a presença do PDGF em concentrações muito mais baixas quando comparadas às concentrações observadas em lisados de plaquetas. Com isso pudemos verificar que as PMP, mesmo que em níveis mais baixos do que em plaquetas íntegras, apresentam PDGF. A diferença no comportamento das células tratadas com PDGF puro e com as PMP observadas por Weber pode ser devido a esta baixa concentração de PDGF.

Independentemente do fator estimulador da proliferação celular, diversos estudos têm demonstrado que a proliferação, assim como outros estados fenotípicos celulares, estão intimamente associados a determinados estados

redox celulares (TIAN et al., 2007; ALIDOOST et al., 2006). De um modo geral, estados mais reduzidos estão associados à proliferação celular, enquanto que proliferação lenta, quiescência, diferenciação e morte celular estão associados aos estados redox progressivamente mais oxidantes (BLANCO et al., 2007; KYAW et al., 2004; NODA et al. 2001). Para avaliarmos se a proliferação das RASM induzida pelas PMP está de alguma forma relacionada a alterações no estado redox celular, analisamos a razão GSH/GSSG nas RASM tratadas com duas concentrações de PMP. Foram realizados seis experimentos visando verificar a influência das PMP no estado redox celular. As células foram tratadas com as mesmas concentrações de micropartículas (10 µg/mL e 30 µg/mL) que foram utilizadas nos ensaios de proliferação celular. Os resultados variaram bastante de experimento para experimento, porém, pôde-se observar um aumento significativo na relação GSH/GSSG do tratamento com 10 µg/mL de PMP quando comparado ao controle negativo (meio de cultivo F12 sem SFB). Não foi encontrada nenhuma diferença significativa na relação GSH/GSSG do controle negativo e do tratamento com 30 µg/mL de PMP. Um possível motivo da detecção de um aumento da proporção GSH/GSSG no tratamento com 10 µg/mL de PMP e da não ocorrência do mesmo fato no tratamento com 30 µg/mL de PMP seja que o tratamento com a menor concentração não tenha sido capaz de alterar a velocidade do ciclo celular, indicando uma tolerância celular a pequenas variações do redox. Por sua vez o tratamento com a maior concentração de PMP estaria induzindo um aumento na velocidade da proliferação celular (como foi observado nos resultados deste trabalho) o que estaria expondo a célula a uma maior quantidade de eventos oxidativos resultantes do metabolismo celular. Isso poderia estar influenciando em uma diminuição rápida da relação GSH/GSSG celular de maneira a estabelecer uma homeostase redox mais rápida. Outro motivo para a obtenção desses resultados poderia ser o fato de que a cinética de indução do estado mais redutivo nas RASM pelas PMP poderia ser mais lenta quando se incubam as células com a concentração de 30 µg/ml. Quando analisadas isoladamente, as PMP apresentaram um potencial redutor, de acordo com o observado para a concentração de 10 µg/ml.

Os resultados obtidos indicam que as PMP alteram o estado redox das RASM após 1h de incubação, induzindo um potencial mais redutor nas células. Para testar se a redução do potencial redox seria o responsável pelo aumento na

taxa de proliferação celular, analisamos se alterações no estado redox modificariam a taxa de proliferação. Para isso, primeiramente analisamos as razões GSH/GSSG nas RASM incubadas com moduladores do estado redox intracelular NAC e BSO. Foi realizado um experimento único utilizando como moduladores da síntese de glutathione a BSO (DL-butionina-SR-sulfoximina) inibidora das enzimas que sintetizam o GSH induzindo uma oxidação celular e a NAC (N-acetil-cisteína), molécula precursora do GSH induzindo a redução celular. Ambos os moduladores da síntese de glutathione foram efetivos. As células tratadas com BSO apresentaram uma relação GSH/GSSG menor que as células do controle negativo (meio de cultivo F12 sem SFB). Já as células tratadas com NAC apresentaram uma relação GSH/GSSG muito maior que o controle negativo. Esse experimento não foi repetido pois seus resultados foram semelhantes aos descritos pela literatura (TIAN et al., 2007; ALIDOOST et al., 2006; KYAW et al., 2004; NODA et al. 2001).

Finalmente, avaliamos se RASM com estado redox mais redutor, ou seja, incubada com NAC, estaria mais estimulada a proliferar. Os resultados demonstraram uma diferença significativa no crescimento celular entre os tratamentos com NAC e BSO quando comparados ao tratamento com meio de cultura sem SFB (controle negativo). Assim sendo, estes dados confirmam o que é descrito pela literatura, onde um aumento na proliferação celular é observado quando o estado redox intracelular sofre uma alteração, não muito grande, para um estado mais redutor. E quando a alteração é para um estado menos redutor observou-se que ocorre uma significativa diminuição na proliferação celular (TIAN et al., 2007; ALIDOOST et al., 2006;).

Como foi comentada anteriormente alterações muito severas do redox celular podem interferir no enovelamento correto de algumas proteínas impedindo a formação de estruturas funcionais na proteína ou impedindo que elas sejam fosforiladas corretamente (MOUSSAZADEH e GREENE, 2000). Uma vez que a capacidade proliferativa das células é perfeitamente controlada pela ativação ou inibição de genes reguladores de crescimento e esses dependem diretamente de uma grande quantidade de proteínas que se ligam ao DNA (fatores transcricionais). Se grandes alterações químicas (como grandes alterações no redox celular) ocorrerem durante este organizado processo transcricional de maneira a alterar a conformação dessas proteínas, atividade das mesmas pode

ser alterada, interrompendo ou acelerando assim o processo. Esse poderia ser um dos mecanismos pelo qual o estado redox poderia estar influenciando na proliferação celular.

Sabe-se que o PDGF estimula um aumento na produção intracelular de espécies reativas de oxigênio (ROS) (ADACHI et al, 2005) e que essas por sua vez influenciam em uma variedade de atividades celulares, incluindo mudanças na localidade de fatores regulatórios, modificações nas proteínas e alterações na expressão de genes. O comportamento celular e sua regulação envolvem uma série de fatores transcricionais sensíveis a variações no estado redox celular (EYRIES et al, 2004). Foram realizados experimentos que comprovaram que o PDGF estimula a proliferação de hepatócitos e que essa proliferação é diretamente relacionada com a ativação de NADPH oxidases (Nox) e pela sua produção de ROS (ADACHI et al, 2005). Vias como ERK, Akt e Src, ativadas pela sinalização do receptor de PDGF (rPDGF) são diretamente influenciadas pela ação de diversas kinases e fosfatases. Hoje em dia sabe-se que muitas dessas kinases (como c-Src kinase, a PI3K e a PKC) e fosfatases são reguladas e/ou influenciadas por redox celular (CATARZI et al, 2007; CHEN et al, 2007; ASLAN e OZBEN, 2003). Sabe-se, inclusive, que uma das atividades induzidas por PDGF e realizada via ativação da PKC pela produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pela Nox é a síntese da gamma-glutamilcisteína sintase (GCS) pela célula. Esta enzima, como foi visto anteriormente, é uma das responsáveis pelo mecanismo GSH/GSSG de controle do redox celular. Recentemente Catarzi e colaboradores identificaram um aumento na concentração de GSH celular após a estimulação por PDGF (CATARZI et al 2002). Também existem trabalhos que afirmam que o GSH estaria envolvido na atividade de autofosforilação do rPDGF (IANTOMASI et al, 1999), evidenciando ainda mais um papel importante exercido pela glutatona na regulação redox da proliferação induzida por PDGF.

Em 2000, Garlach e colaboradores descreveram um aumento na concentração de ROS em células tratadas com PMP. Eles atribuíram esse aumento principalmente a atividade do PDGF e do TGF-Beta1. Podemos considerar os novos dados fornecidos pelo proteoma das PMP (GARCIA et al. 2005) e atribuir uma parte da responsabilidade (pelo aumento na concentração de ROS) aos demais constituintes das micropartículas que são encontrados em grande quantidade. As PMP apresentam uma grande concentração de enzimas

que atuam na regulação do redox celular como a glutathiona sintase, a glutathiona redutase, NADPH oxidase e várias outras oxiredutases assim como apresentam, também, uma grande concentração de GSH como foi detectado nesse trabalho. Elas têm como constituinte significativa diversas kinases como a MAPK1, PKC, Src entre outras e também diversas fosfatases importantes na ativação e desativação de vias proliferativas dependentes de redox celular. Além disso, as PMP apresentam uma grande quantidade de proteínas relacionadas com a transcrição e a tradução de genes. Dessa maneira, as PMP poderiam estar alterando o estado redox intracelular e conseqüentemente a proliferação celular tanto pela ação do PDGF e/ou por outros componentes. Alternativamente, o GSH contido em seu interior poderia estar sendo transferido para a célula alvo, como descrito para receptores de adesão transferidos para células endoteliais (ESSEX e LI, 2006). O aumento na produção de GSH detectado neste trabalho também pode ser um mecanismo compensatório ao estímulo na produção de ROS, ou mesmo uma estimulação realizada pelo PDGF visando a reversibilidade de oxidações protéicas resultantes do processo de proliferação, como ocorre com proteínas fosfatases de baixa massa molecular (CHIARUGI, 2001; MENG et al, 2002).

PMP são produzidas durante a ativação plaquetaria. Diversas doenças apresentam um aumento nos processos de coagulação ou ativação plaquetaria, e que recentemente tem sido descritas por apresentarem, também, um aumento significativo no nível de PMP circulantes (PRESTON et al, 2003; TAN e LIP, 2005; BOULANGER et al, 2006). Sabe-se inclusive que as micropartículas são capazes de induzir a apoptose em células vasculares através da estimulação da produção de ROS pelas Nox (GAMBIM et al, 2007). Interessantemente, devido a sua composição química, estas PMP também apresentam um potencial trombótico (VAN WIJK et al. 2003; MURAKAMI et al. 2007). Aliado a todas essas atividades, com esse trabalho confirmamos o potencial aterogenico das PMP, ao estimular a proliferação de células musculares lisas. Ao mesmo tempo descrevemos um possível mecanismo redox associado ao estímulo proliferativo das PMP, confirmando resultados de recentes trabalhos que demonstram que alterações no redox intracelular e extracelular estão diretamente associados a eventos relacionados com a aterosclerose, como indução da adesão plaquetária da

proliferação celular (BLANCO et al, 2007; ASHFAQ et al., 2006; GO e JONES, 2005; TAN e LIP, 2005)

## 6 CONCLUSÕES

- PMP induzem a proliferação de células musculares lisas de forma correlacionada às alterações no estado redox.
- Esta correlação pode estar sendo direta através da atuação no estado redox dos constituintes das PMP ou através de uma ação sinérgica da alteração redox com o efeito do PDGF como fator proliferativo. Uma vez que foram detectadas pequenas concentrações deste fator de crescimento nas PMP.
- Assim, sugerimos possível efeito aterogênico e redox das PMP em células musculares lisas.

## 7 REFERÊNCIAS

ADACHI, T.; TOGASHI, H.; SUZUKI, A.; KASAI, S.; ITO, J.; SUGAHARA, K.; KAWATA, S. **NAD(P)H oxidase plays a crucial role in PDGF-induced proliferation of hepatic stellate cells.** Hepatology, v.41(6) p.1272-1281, 2005.

ALIDOOST, F.; GHARAGOZLOO, M.; BAGHERPOUR, B.; JAFARIAN, A.; SAJJADI, S.E.; HOURFAR, H.; MOAYEDI, B. **Effects of silymarin on the proliferation and glutathione levels of peripheral blood mononuclear cells from beta-thalassemia major patients.** Int. Immunopharmacol. V. 8, p. 1305-1310, 2006.

ARRICK, B.A.; NATHAN C.F. **Glutathione metabolism as a determinant of therapeutic efficacy: a review.** Cancer Res., v. 44(10), p.4224-4232, 1984.

ARRIGO, A.P. **Gene expression and thiolredox state.** Free Radic. Biol. Med., v.27, p.936-944, 1999.

ASHFAQ, S.; ABRAMSON, J.L.; JONES, D.P.; RHODES, S.D.; WEINTRAUB, W.S.; HOOPER, W.C.; VACCARINO, V.; HARRISON, D.G.; QUYYUMI, A.A. **The relationship between plasma levels of oxidized and reduced thiols and early atherosclerosis in healthy adults.** J. Am. Coll. Cardiol., v.47(5), p.1005-1011, 2006.

ASLAN, M.; OZBEN, T. **Oxidants in receptor tyrosine kinase signal transduction pathways.** Antioxid. Redox Signal, v.5(6), p.781-788, 2003.

ÁVILA, R.I.. **El descubrimiento de las plaquetas.** Rev. Biomed., v.8, p.197-208, 1997.

BAJ-KRZYWORZEKA, M.; MAJKA, M.; PRATICO, D.; RATAJCZAK, J.; VILAIRE, G.; KIJOWSKI, J.; RECA, R.; JANOWSKA-WIECZOREK, A.; RATAJCZAK, M.Z.. **Platelet-derived microparticles stimulate proliferation, survival, adhesion and chemotaxis of hematopoietic cells.** Exp. Hematol., v.30, p. 450-459, 2002.



BARRY, O.P.; FITZGERALD, G.A. **Mechanisms of cellular activation by platelets microparticles.** Thromb. Haemost., v.82, p. 794-800, 1999.

BARRY, O.P.; KAZANIETZ, M.G.; PRATICO, FITZGERALD, G.A. **Arachdonic acid in platelet microparticles up-regulates cyclooxygenase-2-dependent prostaglandin formation via a protein kinase c/mitogen-activated protein kinase-dependent pathway.** J. Biol. Chem, v.274, p. 7545-7556, 1999.

BARRY, O.P.; PRATICO, D.; LAWSON, J.A., FITZGERALD, G.A. **Transcellular activation of platelets and endothelial cells by bioactive lipids in platelet microparticles.** J. Clin. Invest., v.99, p. 2118-2127, 1997.

BARRY, O.P.; SAVANI, R.C.; PRATICO, FITZGERALD, G.A. **Modulation of monocyte-endothelial cell interaction by platelets microparticles.** J. Clin. Invest., v.102, p.136-144, 1998.

BLACKBURN, R.V.; SPITZ, D.R.; LIU, X.; GALOFORO, S.S.; SIM, J.E.; RIDNOUR, L.A.; CHEN, J.C.; DAVIS, B.H.; CORRY, P.M.; LEE, Y.J. **Metabolic oxidative stress activates signal transduction and gene expression during glucose deprivation in human tumor cells.** Free Radic. Biol. Med. V. 26, p.419-430, 1999.

BLANCO, R.A.; ZIEGLER, T.R.; CARLSON, B.A.; CHENG, P.Y.; PARK, Y.; COTSONIS, G.A.; ACCARDI, C.J.; JONES, D.P. **Diurnal variation in glutathione and cysteine redox states in human plasma.** Am. J. Clin. Nutr., v.86(4), p.1016-1023, 2007.

BOULANGER, C.M.; AMABILE, N.; TEDGUI, A. **Circulating microparticles: a potential prognostic marker for atherosclerotic vascular disease.** Hypertension., v.48(2), p.180-186, 2006.

BRADFORD, M.M.. **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** Anal Biochem., v.72, p.248-254, 1976.

BRAY, T.M.; TAYLOR, C.G. **Tissue glutathione, nutrition, and oxidative stress.** Can. J. Physiol. Pharmacol. v.71(9), p.746-751, 1993.

BRUNETTI, M.; MARTELLI, N.; MANARINI, S.; MASCETRA, N.; MUSIANI, P.; CERLETTI, C.; AIELLO, F.B.; EVANGELISTA, V.. **Polymorphonuclear leukocyte apoptosis is inhibited by platelet-released mediators, role TGF $\beta$ -1.** Thromb. Haemost., v.84p.478-483, 2000.

CATARZI, S.; GIANNONI, E.; FAVILLI, F.; MEACCI, E.; IANTOMASI, T.; VINCENZINI, M.T. **Sphingosine 1-phosphate stimulation of NADPH oxidase activity: relationship with platelet-derived growth factor receptor and c-Src kinase.** Biochim. Biophys. Acta, v.1770(6), p.872-883, 2007.

CHANG, W.K.; YANG, K.D.; SHAIQ, M.F. **Lymphocyte proliferation modulated by glutamine: involved in endogenous redox reaction.** Clin. Exp. Immunol., v.117, p.482-488, 1999.

CHEN, K.C.; ZHOU, Y.; ZHANG, W.; LOU, M.F. **Control of PDGF-induced reactive oxygen species (ROS) generation and signal transduction in human lens epithelial cells.** Mol. Vis., v. 14, p. 374-387, 2007.

CHIARUGI, P. **The redox regulation of LMW-PTP during cell proliferation or growth inhibition.** IUBMB Life, v.52(1):55-59, 2001.

CLIVE, D.R.; GREENE, J.J. **Cooperation of protein disulfide isomerase and redox environment in the regulation of NF-kappaB and AP1 binding to DNA.** Cell Biochem. Funct., v.14(1), p.49-55, 1996.

DA SILVA, P.H.; HASHIMOTO, Y. **Coagulação. Visão laboratorial da hemostasia primária e secundária.** Ed. Revinter Ltda., Rio de Janeiro, RJ, 2006. p. 1-110.

DACHARY-PRIGENT, J.; PASQUET, J.M.; FRESSINAUD, E.; TOTI, F.; FREYSSINET, J.M. **Aminophospholipid exposure, microvesiculation and abnormal protein tyrosine phosphorylation in the platelets of a patient with Scott syndrome: a study using physiologic agonists and local anaesthetics.** Br. J. Haematology, v.99, p.959-967, 1997.

DALTON, T.P.; SHERTZER, H.G.; PUGA, A. **Regulation of gene expression by reactive oxygen.** Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol., v.39, p.67-101, 1999.

DAVIS, M.A.; FLAWS, J.A.; YOUNG, M.; COLLINS, K.; COLBURN, N.H. **Effect of ceramide on intracellular glutathione determines apoptotic or necrotic cell death of JB6 tumor cells.** Toxicol. Sci. V. 53(1), p.48-55, 2000.

DE VRIES, N.; DE FLORA, S. **N-acetyl-l-cysteine.** J. Cell Biochem. Suppl., v.17, p.270-277, 1993.

DENIZOT F, LANG R. **Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability.** J. Immunol. Methods, v.89(2), p.271-277, 1986.

DENU, J.M.; TANNER, K.G. **Specific and reversible inactivation of protein tyrosine phosphatases by hydrogen peroxide: evidence for a sulfenic acid intermediate and implications for redox regulation.** J. Biol. Chem. V. 37(16), p. 5633-5642, 1998.

DIAMANT, M.; TUSHUIZEN, M.E.; NIEUWLAND, R. **Cellular microparticles: new players in the field of vascular disease?** Eur.j.Clin.Invest. v.34, p.392-401, 2004.

ESSEX, D., W.; LI, M. **Redox modification of platelet glycoproteins.** Curr. Drug Targets, v.7(10), p.1233-1241, 2006.

FORLOW, S.B.; MCEVER, R.P.; NOLLERT, M.U.. **Leukocyte-leukocyte interaction mediated by platelet microparticles under flow.** Blood, v.95, p.1317-1323, 2000.

FORMAN, H.J. **Use and abuse of exogenous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in studies of signal transduction.** Free. Radic. Biol. Med., v. 42(7), p. 926-932. 2007.

GALLI, M.; GRASSI, A.; BARBUI, T. **Platelet-derived microvesicles in thrombotic thrombocytopenic purpura and hemolytic uremic syndrome.** Thromb. Haemost. V.75, p.427-431, 1996.

GAMBIM, M.H.; CARMO, A.O.; MARTI, L.; VERISSIMO-FILHO, S.; LOPES, L.R.; JANISZEWSKI, M. **Platelet-derived exosomes induce endothelial cell apoptosis through peroxynitrite generation: experimental evidence for a novel mechanism of septic vascular dysfunction.** Crit. Care, v.11(5), p.107, 2007.

GARCIA, B.A; SAMALLEY, D.M.; CHO, H.; SHABANOWITZ, J.; LEY, K.; MHUNT, D.F.. **The platelet Microparticle Proteome.** J. of Proteome Res., v.04, p.1515-1521,2005.

GEORGE, J.N.; PICKETT, E.B.; SAUCERMAN, S.; McEVER, R.P.; KUNIKI, T.J.; KIEFFER, N.; NEWMAN, P.J. **Platelet surface glycoproteins: studies on resting and activated platelets and platelet membrane microparticles in normal subjects, and observations in patients during adult respiratory distress syndrome and cardiac surgery.** J. Clin. Invest., v.78, p.340-348, 1986.

GO, Y.M.; JONES, D.P. **Intracellular proatherogenic events and cell adhesion modulated by extracellular thiol/disulfide redox state.** Circulation, v.111(22), p. 2973-2980, 2005.

GRIECO, G.; D'HOLLOSY, M.; CULLIFORD, A.T.; JONAS, S.. **Evaluating neuroprotective agents for clinical anti-ischemic benefit using neurological and neuropsychological changes after cardiac surgery under cardiopulmonary bypass.** Stroke, v.27(5), p.858-874, 1996.

GRIFFITH, O.W. **Mechanism of action, metabolism, and toxicity of buthionine sulfoximine and its higher homologs, potent inhibitors of glutathione synthesis.** J. Biol. Chem., v.257(22), p.13704-13712, 1982.

GRUBER, R.; WATZEK, G.; FISCHER, M.B. **Platelets stimulate proliferation of bone cells: involvement of platelet-derived growth factor, microparticles and membranes.** Clin. Oral Impl. Res. v.13(5), p.529-535, 2002.

HARDISTY, R.M. HUTTON, R.A. **Platelet aggregation and the availability of platelet factor 3.** Br. J. Haematology, v.12, p.764-776, 1966.

HARLAN, J.M.; LEVINE, J.D.; CALLAHAN, K.S.; SCHWARTZ, B.R.; HARKER, L.A. **Glutathione redox cycle protects cultured endothelial cells against lysis by extracellularly generated hydrogen peroxide.** J. Clin. Invest., v.73(3), p.706-713, 1984.

HOLME, P.A. et al. **Shear-induced platelet activation and platelet microparticle formation at blood flow conditions as in arteries with a severe stenosis.** Thromb. Vasc. Biol., v.17, p.646-653, 1997

HORSTMAN, L.L.; AHN, Y.S.. **Platelet microparticles: a wide-angle perspective.** Crit. Rev. In Oncology/Hematology, v.30, p.111-142, 1999.

HORSTMAN, L.L.; JY, W.; SCHULTZ, D.R.; MAO, W.W.; AHN, Y.S. **Complement-induced vesiculation and lysis of opsonized platelets: gender differences in sensitivity.** J. Lab. Clin. Med., v.123, p.515-525, 1994.

HUTTTER, H.E.; TILL, B.G.; GREENE, J.J. **Redox changes in density-dependent regulation of proliferation.** Exp. Cell Res., v.232, p.435-438, 1997.

HWANG, C.; SINSKEY, A.J.; LODISH, H.F. **Oxidized redox state of glutathione in the endoplasmic reticulum.** Science, v. 11, p.1496-1502, 1992.

IANTOMASI T, FAVILLI F, DEGL'INNOCENTI D, VINCENZINI MT. **Increased glutathione synthesis associated with platelet-derived growth factor stimulation of NIH3T3 fibroblasts.** Biochim. Biophys. Acta, v. 1452(3), p.303-312, 1999.

IANTOMASI, T.; FAVILLI, F.; DEGL'INNOCENTI, D.; VINCENZINI, M.T. **Increased glutathione synthesis associated with platelet-derived growth factor stimulation of NIH3T3 fibroblasts.** Biochim. Biophys. Acta, v.1452(3), p.303-312, 1999.

JY, W.; HORSTMAN, L.L.; ARCE, M.; AHN, Y.S. **Clinical significance of platelet microparticles in autoimmune thrombocytopenias.** J. Lab. Clin. Med., v.119, p.334-345, 1992.

KANDA, M.; IHARA, Y.; MURATA, H.; URATA, Y.; KONO, T.; YODOI, J.; SETO, S.; YANO, K.; KONDO, T. **Glutaredoxin modulates platelet-derived growth factor-dependent cell signaling by regulating the redox status of low molecular weight protein-tyrosine phosphatase.** J. Biol. Chem., v.281(39) p.28518-28528, 2006.

KATAPODIS, J.N.; KOLODNY, L.; JY, W.; et al. **Platelet microparticles and calcium homeostasis in acute coronary ischemias.** Am. J. Hematol., v.54, p.95-101, 1997.

KIKTENKO, A.I.; ZLOBINA, G.P.; BRUSOV, O.S.; ZAKHAROVA, M.N.. **Structure of peripheral blood platelets surface in patients with amyotrophic lateral sclerosis and multiple sclerosis.** Zh. Nevrol. Psikhiatr. Im. S. S. Korsakova., v.105(3), p.40-52, 2005.

KOLODNY, L.; AHN, Y.S.; SHEREMATA, W.A. **Evidence of platelet activation in multiple sclerosis.** Ann. Neurol., v.40, p.520-529, 1996.

KYAW, M.; YOSHIKUMI, M.; TSUCHIYA, K.; IZAWA, Y.; KANEMATSU, Y.; ALI, N.; ISHIZAWA, K.; YAMAUCHI, A.; TAMAKI, T.; FUJITA, Y. **Antioxidant effects of stereoisomers of N-Acetylcysteine (NAC), L-NAC and D-NAC, on angiotensin II-stimulated MAP kinase activation and vascular smooth muscle cell proliferation.** J. Pharmacol. Sci. v.95, p.483–486, 2004.

MALLAT, Z. et al. **Elevated levels of shed membrane microparticles with procoagulant potential in the peripheral circulating blood of patients with acute coronary syndromes.** Circulation, v.101, p.841-843, 2000.

MATSUBARA, E.; SHOJI, M.; MURAKAMI, T.; ABE, K.; FRANGIONE, B.; GHISO, J.. **Platelet microparticles as carriers of soluble Alzheimer's amyloid beta (sAbeta).** Ann. NY Acad. Sci., v.977, p.340-348, 2002.

MCCALL, M.; FREI, B. **Can antioxidant vitamins materially reduce oxidative damage in humans?** Free Rad. Biol. Med., v.26 (7-8), p.1034-1053, 1999.

MCCNICOL, A.; GERRARD, J.M.. **Platelet morphology, aggregation, and secretion.** Adv. In Mol. And Cell Biol., v.18, p.1-29, 1997.

MENG, T.C.; FUKADA, T.; TONKS, N.K. **Reversible oxidation and inactivation of protein tyrosine phosphatases in vivo.** Mol. Cell, v.9(2), p.387-399, 2002.

MITCHELL, P.J.; TJIAN, R. **Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins.** Science, v.245, p.371-378, 1989.

MIYAMOTO, S.; KOWALSKA, M.A.; MARCINKIEWICZ, C.; MARCINKIEWICZ, M.M.; MOSSER, D.; EDMUNDS, L.H.; NIEWIAROWSKI, S.. **Interaction of leukocytes with platelet microparticles derived from outdated platelet concentrates.** Thromb. Haemost., v.80, p.982-988, 1998.

MOREL, O.; TOTI, F.; HUGEL, B.; FREYSSINET, J.M. **Cellular microparticles: a disseminated storage pool of bioactive vascular effectors.** *Curr. Opin. Hematol.*, v. 11, p.156-164, 2004.

MOUSSAZADEH, M.; GREENE, J.J. **Redox regulation of casein kinase II autophosphorylation and its effect on Jun-DNA binding.** *Cell Mol Biol* , v.46(7), p.1265-1275, 2000.

MURAKAMI, T.; HORIGOME, H.; TANAKA, K.; NAKATA, Y.; OHKAWARA, K.; KATAYAMA, Y.; MATSUI, A.. **Impact of weight reduction on production of platelet-derived microparticles and fibrinolytic parameters in obesity.** *Thromb. Res.*, v.119(1), p.45-53, 2007.

NEUHAUSER, M.; GROTZ, K.A.; WANDIRA, J.A.; BASSLER, K.H.; LANGER, K. **Utilization of methionine and N-acetyl-L-cysteine during long-term parenteral nutrition in the growing rat.** *Metabolism*, v35, p.869–873, 1986.

NODA, T.; IWAKIRI, R.; FUJIMOTO, K.; AW, T.Y. **Induction of mild intracellular redox imbalance inhibits proliferation of CaCo-2 cells.** *FASEB J.* v.15(12), p.2131-2139, 2001.

OBRADOR, E.; NAVARRO, J.; MOMPO, J.; ASENSI, M.; PELLICER, J.A.; ESTRELA, J.M. **Glutathione and the rate of cellular proliferation determine tumour cell sensitivity to tumour necrosis factor in vivo.** *Biochem. J.*, v.325, p.183-189, 1997.

OGATA, N.; IMAIZUMI, M.; NOMURA, S.; SHOZU, A.; ARICHI, M.; MATSUOKA, M.; MATSUMURA, M.. **Increased levels of platelet-derived microparticles in patients with diabetic retinopathy.** *Diabetes Res. Clin. Pract.*, v.68(3), p.193-201, 2005.

OWENS, M;R. **The role of platelet microparticles in hemostasis.** *Transf. Med. Rev.*, v.8, p.37-44, 1994.



PAKALA, R. **Serotonin and thromboxane A2 stimulate platelet-derived microparticle-induced smooth muscle cell proliferation.** Cardiovasc. Radiat. Med. V.5(1), p.20-26, 2004

PEREIRA, J.; ALFARO, G.; GOYCOOLEA, M.; QUIROGA, T.; OCQUETEAU, M.; MASSARDO, L.; PÉREZ, C.; SÁEZ, C.; PANES, O.; MATUS, V.; MEZZANO, D.. **Circulating platelet-derived microparticles in systemic lupus erythematosus. Association with increased thrombin generation and procoagulant state.** Thromb. Haemost., V.95(1), P.94-99, 2006.

PRESTON, R.A.; JY, W.; JIMENEZ, J.J.; MAURO, L.M.; HORSTMAN, L.L.; VALLE, M.; AIME, G.; AHN, Y.S.. **Effects of severe hypertension on endothelial and platelet microparticles.** Hypertension, v.41(2), p.211-217, 2003.  
RAPAPORT, S.I. **Hematologia introdução.** Ed. Roca Ltda, 2ª edição, São Paulo, SP, 1990. p.330-401.

SARRASAGUE, M.M.; BARRADO, D.A.; ZUBILLAGA, M.; HAGER, A.; DE PAOLI, T.; BOCCIO, J. **Conceptos actuales del metabolismo del glutatión: Utilización de los isótopos estables para la evaluación de su homeostasis.** Acta Bioqu m. Cl n. Latinoam., v. 40 (1), p. 45-51, 2006.

SEVUSH, S.; JY, W.; HORSTMAN, L.L.; MAO, W.W.; KOLODNY, L.; AHN, Y.S.. **Platelet activation in Alzheimer disease.** Arch. Neurol., v.55(4),p.530-536, 1998.

SILJANDER, P.;CARPEN, O.; LASSILA, R.. **Platelet-derived microparticles associated with fibrin during thrombosis.** Blood v.87, p.4651-4663,1996.

SIMS, P.J.; WIEDMER, T.; ESMON, C.T.; WEISS, H.J.; SHATTIL; S.J. **Assembly of the platelet prothrombinase complex is linked to vesiculation of the platelet plasma membrane. Studies in Scott syndrome: an isolated defect in platelet procoagulant activity.** J Biol Chem. v.170, p.49– 57,1989.

TAN, K.T.; LIP, G.Y.. **The potential role of platelet microparticles in atherosclerosis.** Thromb. Haemost., v.94(3), p.488-492, 2005.

TAN, K.T.; TAYEBJEE, M.H.; LIM, H.S.; LIP, G.Y.. **Clinically apparent atherosclerotic disease in diabetes is associated with an increase in platelet microparticle levels.** Diabet. Med., v.22(12), p.1657-1662, 2005.

TAUBE, J. et al. **Activated protein C resistance: effect of platelet activation, platelet-derived microparticles and atherogenic lipoproteins.** Blood, v.93, p.3792-3797, 1999.

TIAN, J.; WASHIZAWA, N.; GU, L.H.; LEVIN, M.S.; WANG, L.; RUBIN, D.C.; MWANGI, S.; SRINIVASAN, S.; GAO, Y.; JONES, D.P.; ZIEGLER, T.R. **Stimulation of colonic mucosal growth associated with oxidized redox status in rats.** Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol., v.292(3), p.1081-1091, 2007.

VAN WIJK, M.J.; VANBAVEL, E.; STURK, A.; NIEUWLAND, R. **Microparticles in cardiovascular diseases.** Cardiovasc. Res. v.59,p.277-287, 2003.

WANG, L.; TRAN, N.D.; KITAKA, M.; FISHER, M.J.; SCHREIBER, S.S.; ZLOKOVIC, B.V. **Thrombomodulin expression in bovine brain capillaries: anticoagulant function of the blood-brain barrier, regional differences, and regulatory mechanisms.** Arterioscl. Thromb. Vasc. Biol., v.17, p.3139-3146, 1997.

WANG, T.G.; GOTOH, Y.; JENNINGS, M.H.; RHOADS, C.A.; AW, T.Y. **Lipid hydroperoxide-induced apoptosis in human colonic CaCo-2 cells is associated with an early loss of cellular redox balance.** FASEB J., v.14(11), p.1567-1576, 2000.

WARREN, B.A.; VALES, O. **The release of vesicles from platelets following adhesion to vessel wall in vitro.** Br. J. Exp. Pathol. V.53, p.206-215, 1972.

WEBER, A.A.; KÖPPEN, H.O.; SCHRÖR, K. **Platelet-derived microparticles stimulate coronary artery smooth muscle cell mitogenesis by a PDGF-independent mechanism.** Thromb. Res. v.98, p.461-466, 2000.

WOLF, P. **The nature and significance of platelet products in human plasma.** Br. J. Haematology, v.13, p.269-288, 1967.

YIP, J.; SHEN, Y.; ANDREWS, R.K. **Primary Platelet Adhesion Receptors.** Australian Biochem., v.35, p.04-08, 2004.