



**FIOCRUZ**

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**

**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA EM  
SAÚDE E MEDICINA INVESTIGATIVA**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**MICROPARTÍCULAS DERIVADAS DE MONÓCITOS COMO  
POTENCIAIS DIRECIONADORAS DE MIELOPEROXIDASE  
PARA SUPERFÍCIE ENDOTELIAL**

**THAYNA MEIRELLES SANTOS**

**Salvador - Bahia – Brasil  
2009**

THAYNA MEIRELLES SANTOS

**MICROPARTÍCULAS DERIVADAS DE MONÓCITOS COMO  
POTENCIAIS DIRECIONADORAS DE MIELOPEROXIDASE  
PARA SUPERFÍCIE ENDOTELIAL**

Dissertação apresentada ao Curso de  
Pós-Graduação em Biotecnologia e  
Medicina Investigativa do Centro de  
Pesquisa Gonçalo Moniz/FIOCRUZ  
como requisito para obtenção do  
título de Mestre.

Orientador: Dr. Alberto Augusto Noronha Dutra  
Coorientador: Dr. Lain Carlos Pontes de Carvalho

**Salvador - Bahia – Brasil  
2009**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pois tudo que acontece em minha vida é sua vontade, independente de parecerem situações “boas” ou “ruins”, quando reflito, sei que todas são apenas para contribuir com meu amadurecimento e evolução.

Ao Dr. Lain Carlos Pontes de Carvalho, por todos os anos de orientação, e por me “re-acolher” em seu laboratório, permitindo que eu escolhesse meu caminho, me apoiando sempre, independente da sua verdadeira vontade.

Ao Dr. Alberto Noronha Dutra, por me ajudar a ver que não existem fronteiras, por acreditar na minha capacidade, por estimular minha criatividade, por todas as histórias que me contou e por tudo que me ensinou.

À Pilar Veras pela ajuda durante a execução dos experimentos

À Paula pela cumplicidade no isolamento dos monócitos humanos

À equipe do HEMOBA pela compreensão e ajuda na obtenção dos “buffy-coats”

À Micely Hermida pela ajuda com as aquisições iniciais no citômetro de fluxo e por tudo que me ensinou, foi possível continuar meus experimentos com “independência”.

Ao Dr. José Mengel pela colaboração, sugestões e por todas as dúvidas que me esclareceu pessoalmente ou por e-mail, a respeito dos experimentos em citometria de fluxo.

À Claudio Figueira e Diego Menezes pela ajuda com a realização da microscopia eletrônica de transmissão.

Ao Dr. Marcos André Vannier pela ajuda na aquisição das imagens na microscopia eletrônica

À Tiago Landim pelas vezes que me esperou terminar os experimentos, pela discussão que esclareceu muitas dúvidas e pelo “enquadramento” nas normas.

Aos meus amigos Pablo e Virgínia, que desde o início, há 5 anos, me acompanham e me ensinam muito não só sobre ciência, mas sobre a vida.

À Tiana Baqueiro, Rodrigo Feitosa e Joílson de Jesus também, junto com Pablo e Virgínia, pelos melhores momentos que vivi no laboratório.

À Thassila Pitanga e Felipe Miranda pela cumplicidade em tantos momentos.

À Viviane e Luciana Aragão pelas conversas tão agradáveis e ajuda sempre que necessário.

*"Foi o caminho, não que eu tracei para mim, mas que minha caminhada traçou: Caminhante, não há caminho, o caminho se faz ao caminhar".*

Edgar Morin

## RESUMO

A Mieloperoxidase (MPO) é uma enzima catiônica presente nos grânulos azurófilos de neutrófilos e monócitos responsável pela formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) envolvidas na diminuição da biodisponibilidade do NO, modulando a resposta inflamatória vascular. Micropartículas (MPs) são vesículas derivadas da membrana plasmática, durante ativação celular ou apoptose, e atuam como mensageiras intercelulares por interação específica com as células alvo. MPs de diversas origens parecem afetar a função vascular por mecanismos dependentes do estresse oxidativo. MPs derivadas de monócitos humanos (MoMPs) foram produzidas por ativação celular *in vitro* com ionóforo de cálcio e caracterizadas por microscopia eletrônica de transmissão como estruturas delimitadas por bimembrana lipídica e diâmetro característico menor que 1  $\mu\text{m}$ . Detectamos por quimioluminescência, em reação dependente de luminol e  $\text{H}_2\text{O}_2$ , inibida por azida sódica, atividade de mieloperoxidase associada às MoMPs. A exposição das MoMPs a pH 10,7 ou ao aumento da força iônica do meio resultou em dissociação da MPO da sua superfície, enquanto nenhuma dissociação ocorreu após exposição a pH 3,0, demonstrando que esta associação depende de interações eletrostáticas. A MPO não foi capaz de religar-se nas MoMPs após tratamento com pH 10,7, indicando a necessidade de uma determinada distribuição de cargas na superfície das MoMPs. Além disso, não foi capaz de se ligar na superfície de linfócitos e hemácias, sugerindo a participação de molécula(s) específica(s) nas MoMPs responsáveis por esta interação. Identificamos a expressão das integrinas LFA-1 e MAC-1 na superfície das MoMPs ricas em MPO por citometria de fluxo, demonstrando seu potencial em aderir especificamente à superfície do endotélio ativado. Estes resultados sugerem que as MPs derivadas de monócitos podem atuar como carreadoras da MPO para superfície endotelial, sugerindo assim sua contribuição na disfunção do endotélio vascular.

## ABSTRACT

The myeloperoxidase (MPO) is a cationic enzyme present in azurophilic granules of neutrophils and monocytes. This enzyme is responsible for the formation of reactive oxygen species (ROS) involved in decreased NO bioavailability and modulates the vascular inflammatory response. Microparticles (MPs) are shed membrane vesicles arising from cell activation or apoptosis, and act as intercellular messengers, specifically interact with target cells. MPs from various cells could affect vascular function through mechanisms triggered by oxidative stress. Monocytes derived MPs (MoMPs) were obtained from calcium ionophore activated human monocytes *in vitro* and characterized by transmission electron microscopy as vesicles bounded by bilayer lipid membrane and diameter less than 1  $\mu\text{m}$ . We detected by chemiluminescence MPO activity MoMPs associated, by luminol with added  $\text{H}_2\text{O}_2$  and inhibited by sodium azide. Treating of MoMPs with buffer at pH 10.7 or increased ionic strength resulted in releasing of the MPO from the MPs surface, whereas no release occurred with buffer at pH 3.0, demonstrating that nature of association between MPO and these MPs is electrostatic. MPO was not able to re-attach to MoMPs after treatment with pH 10.7, indicating the need for a specific charge distribution on the MoMPs surface. Moreover, MPO was not able to bind on the lymphocytes and erythrocytes surface, suggesting the involvement of specific (s) molecule (s) in MoMPs responsible for this association. We identified the expression of integrins LFA-1 and MAC-1 on the MPO enrich MoMPs surface by flow cytometry, demonstrating their potential to adhere specifically to activated endothelium adding the MPO to them, suggesting their contribution to endothelial dysfunction.

## LISTA DE ABREVIATURAS

**DCV:** Doença cardiovascular

**HBSS:** Solução salina balanceada de Hank, do inglês “Hank’s balanced salt solution”

**LDL:** Lipoproteína de baixa densidade

**LPS:** Lipopolissacarídeo

**HBSSM:** HBSS modificado sem vermelho fenol nem glicose e com 1mM de HEPES

**MoMPs:** Micropartículas derivadas de monócitos

**MPs:** Micropartículas

**MPO:** Mieloperoxidase

**NO:** Óxido nítrico

**PBS:** Salina tamponada com fosfato

**SMA:** Sobrenadante de monócitos ativados rico em MoMPs

**SOD:** Superóxido dismutase

**SRMPO:** Sobrenadante de monócitos ativados livre de MoMPs e rico em MPO

**ROS:** Espécies reativas de oxigênio, do inglês “reactive oxygen species”



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>12</b>
<b>1.1. Aspectos Gerais .....</b>	<b>12</b>
<b>1.2. Mieloperoxidase.....</b>	<b>14</b>
<b>1.3. Micropartículas .....</b>	<b>17</b>
<b>1.4. Mieloperoxidase e micropartículas na disfunção endotelial .....</b>	<b>20</b>
<b>2. OBJETIVO GERAL.....</b>	<b>22</b>
<b>2.1. Objetivos específicos .....</b>	<b>22</b>
<b>3. METODOLOGIA.....</b>	<b>23</b>
<b>3.1. Obtenção das células humanas .....</b>	<b>23</b>
3.1.1. Monócitos.....	23
3.1.2. Polimorfonucleares.....	24
3.1.3. Hemácias .....	25
<b>3.2. Obtenção das Micropartículas (MPs).....</b>	<b>25</b>
3.2.1. Estratégia para remoção dos debris celulares.....	26
3.2.2. Determinação da efetividade da ultracentrifugação a 100.000g .....	27
3.2.3. Efeito do congelamento na manutenção da integridade das MoMPs.....	27
<b>3.3. Microscopia eletrônica de transmissão .....</b>	<b>28</b>
<b>3.4. Detecção da atividade da mieloperoxidase nas MoMPs e nos sobrenadantes dos monócitos ativados.....</b>	<b>29</b>
<b>3.5. Associação da mpo à MoMPs liberadas por diferentes estímulos</b>	<b>30</b>
<b>3.6. Análise físicoquímica da associação da MPO com as MoMPs.....</b>	<b>30</b>
3.6.1. Efeito do pH .....	30

3.6.2.	Efeito da força iônica .....	31
3.6.3.	Re-adsorção da MPO à superfície das MoMPs.....	32
<b>3.7.</b>	<b>Ligação das MoMPs à anexina V.....</b>	<b>33</b>
<b>3.8.</b>	<b>Associação da MPO com outras superfícies celulares .....</b>	<b>33</b>
3.8.1.	Hemácias .....	33
3.8.2.	Células mononucleares de sangue periférico .....	34
<b>3.9.</b>	<b>Detecção das moléculas de adesão .....</b>	<b>34</b>
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>36</b>
<b>4.1.</b>	<b>Obtenção das micropartículas .....</b>	<b>36</b>
4.1.1.	Aumento na liberação de MPs por monócitos após estímulo com ionóforo de cálcio 36	
4.1.2.	Estratégia para remoção dos debris celulares.....	37
4.1.3.	Determinação da efetividade da ultracentrifugação a 100.000 g .....	38
4.1.4.	Efeito do congelamento na manutenção da integridade das MoMPs.....	39
<b>4.2.</b>	<b>Microscopia eletrônica de transmissão .....</b>	<b>41</b>
<b>4.3.</b>	<b>Associação da mieloperoxidase às MoMPs .....</b>	<b>42</b>
<b>4.4.</b>	<b>Análise fisicoquímica da associação da mieloperoxidase às MoMPs</b>	<b>44</b>
4.4.1.	Efeito da variação de pH .....	44
4.4.2.	Efeito do aumento da força iônica.....	45
4.4.3.	Ausência de re-adsorção da MPO às MoMPs .....	46
<b>4.5.</b>	<b>Expressão de fosfatidilserina na superfície das MoMPs .....</b>	<b>47</b>
<b>4.6.</b>	<b>Associação da MPO com outras superfícies celulares .....</b>	<b>48</b>
<b>4.7.</b>	<b>Presença de moléculas de adesão nas MoMPs.....</b>	<b>51</b>

4.8. Ausência de CD14 nas MoMPs .....	52
5. DISCUSSÃO.....	53
6. CONCLUSÕES.....	62
7. REFERÊNCIAS.....	63

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. ASPECTOS GERAIS

As doenças cardiovasculares (DCV) são a principal causa de morte no mundo. Estima-se 17,1 milhões de óbitos em 2004, representando 29% de todas as mortes globais, e se presume que em 2030, 23,6 milhões de pessoas morrerão de DCV (WHO, 2009). A aterosclerose constitui-se no fator que mais contribui para o avanço das DCV (LIBBY, 2002) e a Organização Mundial de Saúde prediz que a prosperidade econômica mundial pode levar a uma epidemia de aterosclerose, com a aquisição de hábitos ocidentais pelos países em desenvolvimento (STOCKER & KEANEY, 2004).

A aterosclerose é uma doença inflamatória, caracterizada pelo acúmulo de lipídeos e elementos fibrosos nas paredes arteriais (LIBBY, 2002). Dentre as etapas envolvidas no desenvolvimento e progressão desta doença estão a disfunção endotelial, que resulta na alteração da homeostase vascular, e a modificação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL, do inglês “low density lipoprotein”) com consequente formação de células espumosas (ROSS, 1999).

A disfunção endotelial é caracterizada pela redução da síntese de óxido nítrico (NO) por células endoteliais, resultando na supressão dos efeitos benéficos do NO, como a manutenção de uma superfície endotelial não trombogênica. Além de reatividade vascular anormal e vasoconstrição, há expressão de fatores pró-trombóticos e pró-inflamatórios que criam um ambiente quimiotático para os leucócitos. As moléculas de adesão (selectinas e integrinas), presentes na interface leucócitos-endotélio, exercem um papel fundamental neste contexto. Os leucócitos aderem, são ativados e migram para o espaço sub-endotelial. A ativação induz a

produção de espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês “reactive oxygen species”) que podem lesionar o tecido endotelial (FORGIONE et al, 2000). Estes efeitos inflamatórios auxiliam a manutenção da disfunção endotelial e o desenvolvimento da placa aterosclerótica. Hiperlipidemia, hipertensão, diabetes e tabagismo estão associados com o aumento da produção de ROS que reduzem a biodisponibilidade do NO e causam dano tecidual. Portanto, o estresse oxidativo é considerado como o principal mecanismo envolvido na patogênese da disfunção endotelial. (GROVER-PÁEZ & ZAVALZA-GÓMEZ, 2009)

Os monócitos participam do processo aterosclerótico, sendo constantemente ativados e recrutados para o sítio inflamatório, onde se diferenciam em macrófagos teciduais. Na formação da placa aterosclerótica, os macrófagos fagocitam partículas de LDL modificadas quimicamente, principalmente por processos de oxidação ou nitração, através de receptores “scavengers”, como o CD36, acumulando colesterol no seu interior. Este acúmulo resulta na perda da mobilidade destas células, agora chamadas células espumosas, e na sua consequente fixação na parede arterial, sendo este o primeiro evento marcador de lesão aterosclerótica (OSTERUD & BJORKKLID, 2003). Os monócitos, quando ativados, também participam na modificação da LDL para sua forma pró-aterogênica através da geração de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, cuja formação é catalisada pela mieloperoxidase (MPO, EC 1.11.1.7) presente nestas células (PODREZ et al, 1999).

Além de envolvidos na progressão do ateroma, fatores inflamatórios também estão implicados na geração de instabilidade e consequente ruptura da placa aterosclerótica, responsável por eventos isquêmicos clinicamente relevantes (LIBBY, 2002). A fissura da placa

leva à exposição de um núcleo trombogênico, onde a exposição de fator tecidual se destaca (ARDISSINO et al, 1997; TOSCHI V et al, 1997), ativando os fatores de coagulação da circulação, com conseqüente formação de trombo e bloqueio do fluxo sanguíneo.

A elucidação dos fatores que coordenam este complexo processo inflamatório, na indução e progressão da doença aterosclerótica, é de grande importância na identificação de preditores de risco cardiovascular e alvos para intervenção terapêutica. Neste contexto, o estudo da mieloperoxidase e das micropartículas vem se destacando nos últimos anos.

## 1.2. MIELOPEROXIDASE

A mieloperoxidase está presente nos grânulos azurófilos de neutrófilos, constituindo de 1 até 5% do seu peso seco (SCHULTZ & KAMINKER, 1962), e sua função é essencial na atividade microbicida destas células (KLEBANOFF, 1970; DALE et al, 2008). Monócitos humanos também possuem grânulos contendo MPO (NICHOLS, 1973 *apud* KLEBANOFF, 2005). Entretanto, a importância da MPO nestas células não está determinada. Interessantemente, a expressão da MPO é perdida durante o processo de maturação em macrófagos teciduais (KLEBANOFF, 2005) que possuem outras armas no combate aos patógenos invasores (DALE et al, 2008).

A MPO é descarregada nos fagossomos e pode também ser liberada no meio extracelular durante o processo de degranulação celular pós-ativação (HANSSON et al, 2006). Neste último ambiente, a MPO poderia ser inativada por outros produtos da explosão oxidativa como o radical

superóxido, tal como ocorre *in vitro* (KING et al, 1997), ou ter sua atividade de peroxidase inibida pela proteína plasmática ceruloplasmina (SEGELMARK et al, 1997). A MPO apresenta carga fortemente catiônica e ponto isoelétrico  $> 10$  (AGNER, 1941 *apud* KLEBANOFF, 2005), e devido a essa característica, acredita-se que a MPO seria capaz de se associar diretamente a membranas celulares através de interações eletrostáticas (KLEBANOFF, 2005; ARNHOLD, 2004).

Neutrófilos expressam MPO na superfície após ativação, e a MPO solúvel, liberada por polimorfonucleares (PMNs) ativados (BANGALORE & TRAVIS, 1994), é capaz de se associar a superfície de PMNs não ativados (HESS et al, 2000). Além disso, a MPO liga-se à superfície endotelial e sofre transcitose se localizando no sítio basolateral do endotélio (BALDUS et al, 2001). Em um modelo de inflamação *in vivo* (endotoxemia), a MPO presumidamente liberada na circulação sanguínea por leucócitos ativados, também pôde ser detectada na superfície endotelial e no espaço subendotelial, mas não nas células musculares lisas da vizinhança nem nos neutrófilos aderentes (EISERICH et al, 2002), indicando o direcionamento da MPO circulante para a superfície endotelial.

A MPO é responsável por catalisar a formação de uma ampla variedade de espécies reativas de oxigênio envolvidas no mecanismo de defesa do hospedeiro contra patógenos invasores, sendo a única peroxidase capaz de oxidar o  $\text{Cl}^-$ , gerando o ácido hipocloroso (HOCl) em pH fisiológico (HANSSON et al, 2006). Além do cloreto, diversos substratos são oxidados por esta enzima, incluindo tirosina, triptofano, fenol e nitrito, dentre outros (ARNHOLD, 2004). O  $\text{H}_2\text{O}_2$  é requerido para a catálise dos demais substratos pela mieloperoxidase. Ele reage com a

MPO formando um complexo cataliticamente ativo (ODAJIMA & YAMAZAKI, 1970) que reduz o íon do elemento halogênio disponível, resultando na formação dos oxiácidos correspondentes e na regeneração da forma nativa da MPO. Esta atividade da MPO é inibida pela adição de azida sódica (KLEBANOFF, 1970). O  $H_2O_2$  é disponibilizado *in vivo* principalmente pela ação da enzima NADPH oxidase, que catalisa a formação do radical superóxido ( $O_2^-$ ), a partir da redução do  $O_2$  e oxidação do NADPH. O decaimento espontâneo do  $O_2^-$  ou a dismutação pela enzima superóxido dismutase (SOD) resulta na formação e disponibilização do  $H_2O_2$ . Além de expressa por fagócitos, a NADPH oxidase está presente também nas células vasculares, podendo atuar como geradora de ROS na parede vascular ou adjacências (YOKOYAMA et al, 2000).

Os produtos derivados da atividade da MPO podem causar danos a macromoléculas biológicas e degradação tecidual, sendo esta peroxidase, portanto, associada à patogênese de diversas doenças inflamatórias, destacando-se as doenças cardiovasculares (NICHOLLS & HAZEN, 2005). Concentrações plasmáticas elevadas de MPO foram diretamente associadas a risco de eventos cardíacos adversos, mesmo na ausência de necrose detectável do miocárdio (BRENNAN et al, 2003). Estudos recentes, portanto, sugerem sua utilização como ferramenta diagnóstica para síndromes coronárias agudas (LORIA et al, 2008). Além disso, MPO encontra-se presente na placa de ateroma (DAUGHERTY et al, 1994), apesar da sua origem neste sítio inflamatório não estar estabelecida. Sua participação na oxidação de lipoproteínas é amplamente aceita (NICHOLLS & HAZEN, 2009) e sua associação com o desenvolvimento de um fenótipo vulnerável da placa de ateroma foi recentemente sugerida (SUGIYAMA et al, 2004; HAZEN, 2004).



### 1.3. MICROPARTÍCULAS

As micropartículas (MPs) são vesículas que têm entre 70 nm a 1 µm de diâmetro e se originam a partir de um processo do brotamento da membrana plasmática, após ativação celular ou apoptose. As MPs foram descritas pela primeira vez em 1967 por Wolf, como restos celulares capazes de promover coagulação, e por muito tempo foram consideradas artefatos experimentais, decorrentes do isolamento e processamento das células. Atualmente, as MPs são reconhecidas como estruturas funcionais envolvidas em diversos processos biológicos, atuando principalmente como mensageiras intercelulares (COCUCCI et al, 2009). Neste processo, as MPs são responsáveis pela transferência de lipídios, proteínas e até mRNA (BAJ-KRZYWORZEKA et al, 2006) entre as células, mediada por interação específica entre as MPs e células alvo. Além da comunicação celular, as MPs estão envolvidas na inflamação, trombogênese e função vascular, atuando na regulação tanto de processos fisiológicos quanto patológicos (COCUCCI et al, 2009).

A capacidade de liberar MPs tem sido descrita para um número cada vez maior de tipos celulares, e amplamente estudada em células sanguíneas. Alguma liberação de MPs ocorre a partir de células não ativadas, entretanto, este processo aumenta drasticamente após ativação. As MPs apresentam, em sua superfície, proteínas específicas das células que as originaram. Algumas destas moléculas, tipicamente expressas na superfície celular, são utilizadas para caracterizar as MPs quanto a sua origem celular. Por exemplo, o CD235a para MPs derivadas de hemácias, o CD144 para MPs derivadas de células endoteliais (AMABILE et al, 2005). Além disso, as MPs podem apresentar proteínas que são degradadas nas células ativadas ou enzimas contidas em grânulos citoplasmáticos (HESS et al, 1999; GASSER et al, 2002). A composição das MPs

também varia a depender do estímulo indutor da vesiculação (BERNIMOULIN et al, 2009). Entretanto, o  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular é reconhecido como um segundo mensageiro envolvido na liberação das MPs decorrente de diversos estímulos iniciais, e, portanto, a utilização de ionóforos de  $\text{Ca}^{2+}$  é amplamente utilizada para induzir a liberação de MPs *in vitro* (DEL CONDE et al, 2005; CERRI et al, 2006).

A concentração de MPs circulantes encontra-se aumentada em várias doenças caracterizadas por inflamação e disfunção vascular, tais como síndromes coronárias, hipertensão, aterosclerose e pré-eclampsia. (BOULANGER et al, 2006; ARDOIN et al, 2007; VANWIJK et al, 2003). Ainda não foi estabelecido se este aumento é consequência do dano tecidual relacionado às doenças, ou se as MPs são agentes efetores na patogênese. Entretanto, as evidências atuais apontam para este duplo papel, no qual as MPs seriam, portanto, tanto marcadores de doença, quanto possíveis alvos terapêuticos para o controle do processo inflamatório (BOULANGER et al, 2006; VANWIJK et AL, 2003; ARDOIN et al, 2007).

MPs de diversas origens parecem afetar a reatividade e a função vascular. MPs derivadas de plaquetas induzem a expressão da cicloxigenase-2 (COX-2) (BARRY et al, 1997), e estimulam a liberação de citocinas e a expressão de moléculas de adesão por células endoteliais (NOMURA et al, 2001). MPs isoladas de pacientes com sepse exibem atividade intrínseca de produção de superóxido e induzem apoptose de células endoteliais *in vitro*, sugerindo uma via de sinalização redox envolvida na patofisiologia desta doença (JANISZEWSKI et al, 2004). MPs isoladas de pacientes com infarto do miocárdio (BOULANGER et al, 2001), falência renal (AMABILE et al, 2005) e síndrome metabólica (AGOUNI et al, 2008) reduziram a liberação de

óxido nítrico (NO) por células endoteliais vasculares *in vitro*. Este efeito, quando induzido por MPs de origem endotelial, parece estar relacionado a um aumento na produção de superóxido (BRODSKY et al, 2004), sugerindo um importante papel do estresse oxidativo neste processo.

Uma vez que a oxidação de fosfolipídios nas LDL está implicada na gênese da aterosclerose, a ocorrência de fosfolipídios oxidados em MPs de origem apoptótica e em MPs liberadas em um contexto de estresse oxidativo pode sugerir a participação das MPs na patogênese desta doença (VANWIJK et al, 2003). Neste contexto, os fosfolipídios oxidados associados às MPs podem estimular o recrutamento dos leucócitos para a superfície endotelial, como demonstrado por Huber e colaboradores (2002).

MPs derivadas de monócitos (MoMPs) são predominantes nas lesões ateroscleróticas (MALLAT et al, 1999 ; LEROYER et al, 2007) e parecem ser a principal fonte de fator tecidual no ateroma, conferindo a este atividade pró-coagulante (MALLAT et al, 1999). Além disso, estas MPs encontram-se aumentadas na circulação de pacientes com diabetes tipo 2, condição associada ao desenvolvimento prematuro de aterosclerose (OMOTO et al, 2002). Em estudos de fenotipagem, as MPs derivadas de monócitos são identificadas pela expressão do CD14 (LEROYER et al, 2007; OMOTO et al, 2002), o “cluster” de diferenciação amplamente utilizado para identificação de células da linhagem monocítica/macrofágica (SCHUTT, 1999).

Monócitos estimulados com lipopolissacarídeo (LPS) liberam MPs que, além de possuírem atividade pró-coagulante, foram capazes de formar complexos adesivos com esferas recobertas por ICAM-1, dependente da presença de CD11a/CD18 (SATTA et al, 1994). A vesiculação também parece ser a principal via secretória para rápida liberação de IL-1 $\beta$  por

monócitos ativados, sugerindo a participação destas MPs no desenvolvimento de resposta inflamatória (MACKENZIE et al, 2001). Estas características sugerem o envolvimento das MoMPs na sinalização entre as células circulantes e células da parede vascular, promovendo ativação e disfunção celular dentro do compartimento vascular (MARTINEZ et al, 2005; LEROYER et al, 2008).

#### 1.4. MIELOPEROXIDASE E MICROPARTÍCULAS NA DISFUNÇÃO ENDOTELIAL

A disfunção endotelial foi recentemente associada à MPO. Eiserich e colaboradores (2002) demonstraram que esta peroxidase modula a resposta inflamatória vascular, diminuindo a biodisponibilidade do NO, a partir da reação com o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formado pela atividade da NADPH oxidase vascular. Neste processo, a MPO catalisa a formação de espécies reativas derivadas do NO que possuem alto poder oxidante e, portanto, podem comprometer a integridade do endotélio (BALDUS et al, 2001). Além disso, os níveis plasmáticos de MPO foram preditores de disfunção endotelial em um estudo de coorte com 298 indivíduos (VITA et al, 2004).

A presença da MPO na superfície de MPs derivadas de PMNs foi descrita por Hess e colaboradores em 1999. Pela primeira vez, demonstrou-se que enzimas presentes em grânulos citoplasmáticos podiam se associar a MPs durante o processo de brotamento da membrana celular. Estas MPs também atuam como mediadores inflamatórios, induzindo ativação endotelial (MESRI & ALTIERI, 1998), e, portanto, podem contribuir na desregulação da função endotelial durante a lesão vascular (MESRI & ALTIERI, 1999).

O envolvimento das MPs na geração e manutenção da disfunção endotelial, por mecanismos que parecem dependentes do estresse oxidativo, associado à participação da MPO no contexto inflamatório das DCV através da geração de ROS, nos levou a investigar a associação das MPs derivadas de monócitos com a mieloperoxidase e seu potencial adesivo sobre o endotélio. Se confirmada, esta hipótese sugeriria um papel das MoMPs na disfunção do endotélio vascular, reforçando sua participação no desenvolvimento da aterosclerose e seu potencial tanto como preditor de risco cardiovascular, quanto como alvo para intervenção terapêutica.

## **2. OBJETIVO GERAL**

- Estudar as micropartículas derivadas de monócitos como estruturas carreadoras de mieloperoxidase e moléculas de adesão para o endotélio

### **2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Padronizar a obtenção de micropartículas derivadas de monócitos
- Investigar a existência de associação da mieloperoxidase com as MoMPs
- Investigar a presença de moléculas de adesão nas MoMPs

### **3. METODOLOGIA**

#### **3.1. OBTENÇÃO DAS CÉLULAS HUMANAS**

##### **3.1.1. Monócitos**

Os monócitos foram obtidos a partir de concentrados de leucócitos frescos (“Buffy-coat”) doados pela Fundação de Hematologia e Hemoterapia da Bahia. O material utilizado apresentou resultado sorológico negativo para HIV, HTLV, sífilis, doença de Chagas e hepatites B e C. O concentrado de leucócitos, diluído em salina a 0,9% tamponada com fosfato, pH 7,2 (PBS), contendo 2 mM de etilenodiaminotetracetato (PBS-EDTA) na proporção 2,5:1 em um total de 35 mL, foi centrifugado sobre 12 mL de Ficoll-Hypaque (GE Healthcare Bio-Sciences Corp. Piscataway, NJ, USA), a 500 g por 30 minutos a 25° C. O anel de células mononucleares formado foi coletado e transferido para outro tubo, no qual foi adicionado PBS-EDTA e submetido a uma centrifugação a 500 g por 10 minutos a 4° C. O sedimento foi coletado e, após ressuspensão, foi centrifugado 2 vezes a 180 g (10 minutos a 4° C), para remoção parcial das plaquetas (que permaneciam no sobrenadante após cada centrifugação).

Após contagem, as células mononucleares ( $10^8$ /tubo) foram submetidas a um gradiente descontínuo de Percoll para separar linfócitos, monócitos e plaquetas. Inicialmente, foi preparada uma solução de Percoll, denominada Percoll 100%, por mistura de 9 partes de Percoll Plus (GE Healthcare) e uma parte de PBS 10 vezes concentrado, pH 7,4. Esta solução foi utilizada no preparo de 3 soluções de Percoll a 40%, 50% e 70%, diluindo o Percoll 100% em PBS. As células foram submetidas a uma centrifugação a 800 g, e, após descarte quase total do sobrenadante, o sedimento foi ressuspensão no tampão remanescente. Em seguida, as soluções de

Percoll foram adicionadas cuidadosamente sobre as células, primeiramente 2 mL do Percoll 70%, seguido do acréscimo de 3 mL de Percoll 50% e 4 mL de Percoll 40%. Após centrifugação (800 g por 20 minutos a 20° C), os anéis correspondentes aos monócitos foram coletados e submetidos a três lavagens como descrito anteriormente para as células mononucleares. PBS-EDTA foi utilizado para ressuspender as células nas lavagens.

A pureza das separações foi verificada por “citospin” ou citometria de fluxo. Os monócitos utilizados para obtenção das MoMPs apresentaram entre 80 e 92% de pureza.

### **3.1.2. Polimorfonucleares**

Os PMNs foram obtidos a partir de 20 mL de sangue com heparina, doado por voluntários sadios. O sangue foi misturado com uma solução a 3% de dextran T-500 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA), preparada em solução salina a 0,9%, na proporção 2:1. Esta mistura foi deixada em repouso durante 30 minutos para sedimentação das hemácias. O sobrenadante rico em leucócitos foi aspirado e centrifugado por 10 minutos a 750 g. O sedimento foi ressuspense em 12 mL de PBS-EDTA e cada 6 mL foram adicionados cuidadosamente sobre 3 mL de Ficoll e centrifugado a 800 g por 20 minutos a 20° C. Após descarte do anel de células mononucleares de sangue periférico (CMSP) formado e do sobrenadante, o sedimento rico em PMNs foi ressuspense em 2 mL de PBS e as hemácias contaminantes foram lisadas pela adição de 5 mL de água destilada e inversão lenta durante 1 minuto, seguidas da reconstituição isotônica do meio com 1,75 mL de uma solução de NaCl a



3,5%. Após a lise, a suspensão foi centrifugada a 150 g por 10 minutos a 4° C e as células lavadas duas vezes nas mesmas condições de centrifugação. PBS-EDTA foi utilizado para ressuspender as células nas lavagens.

### **3.1.3. Hemácias**

As hemácias utilizadas nos experimentos foram recuperadas após centrifugação sobre Ficoll-Hypaque do concentrado de leucócitos como descrito para o isolamento dos monócitos. Cerca de 1 mL da papa de hemácias foi aspirado e transferido para outro tubo. Após diluição em PBS-EDTA, a suspensão de hemácias foi centrifugada por 10 minutos, a 500 g e as hemácias lavadas duas vezes nas mesmas condições de centrifugação.

## **3.2. OBTENÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS (MPs)**

As micropartículas foram geradas a partir dos monócitos e PMNs na concentração de  $5 \times 10^6$ /mL ou  $10^7$ /mL em solução salina balanceada de Hank modificada, sem vermelho fenol nem glicose, e com a adição de ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfônico (HEPES) a 1 mM (HBSSM). A liberação das MoMPs foi induzida pelo estímulo das células com 2  $\mu$ M do ionóforo de cálcio (A23187) (Sigma) por 20 minutos a 37°C.

Nos experimentos de citometria de fluxo visando à padronização do protocolo para obtenção das MPs, os monócitos, após o isolamento, foram marcados com o “kit” PKH26GL ou

PKH67GL (Sigma) de acordo com protocolo fornecido pelo fabricante. Nestes “kits”, os reagentes PKH26 e PKH67 são marcadores fluorescentes com longas caudas alifáticas que durante o procedimento são incorporados de maneira estável nas regiões lipídicas da membrana celular. O PKH26 possui espectro de excitação máxima em 551nm e emissão máxima em 567nm. O PKH67 possui espectro de excitação máxima em 490nm e emissão máxima em 502nm. Após esta marcação, os monócitos foram ativados para obtenção das micropartículas. Esta metodologia permitiu a distinção das MoMPs do “background eletrônico”, após aquisição das amostras em citometria de fluxo. Um total de 100.000 a 200.000 eventos foram adquiridos em diferentes experimentos e as MoMPs foram consideradas como os eventos fluorescentes adquiridos dentre o total de eventos.

Todas as aquisições de resultados citométricos realizadas neste trabalho foram feitas no citômetro de fluxo FACSorter usando o programa CellQuest (BD Biosciences, San Jose, California, EUA). A análise dos dados foi feita no programa FlowJo (Tree Star Inc, Califórnia, EUA). A aquisição das amostras de MoMPs foi realizada sempre com os canais de dispersão frontal (FSC-H), dispersão lateral (SSC-H) e fluorescência em escalas logarítmicas.

### **3.2.1. Estratégia para remoção dos debris celulares**

O sobrenadante dos monócitos ativados (SMA), contendo as MoMPs, foi obtido após remoção das células por duas centrifugações da suspensão a 2.800 g por 10 minutos a 4° C. O SMA foi submetido a centrifugações subsequentes, a 5.000 g, 8.000 g e 12.000 g no rotor TLA-

100.3 (Beckman Instruments Inc., Palo Alto, CA, EUA) por 5 minutos a 4° C. Após cada uma das centrifugações, uma alíquota de 300 µL de cada amostra foi coletada para aquisição de resultados no citômetro de fluxo. Alternativamente, o mesmo SMA foi filtrado em membrana com poro de 1,2 µm (Isopore, Millipore, Carrigtwohill, County Cork, Ireland). Neste procedimento, o material filtrado foi coletado e o material retido na membrana foi eluído por fluxo reverso com HBSSM (mesmo volume do filtrado). As amostras foram submetidas à aquisição de resultados no citômetro de fluxo.

### **3.2.2. Determinação da efetividade da ultracentrifugação a 100.000g**

O SMA foi submetido à ultracentrifugação a 100.000 g no rotor TLA-100.3, por 45 minutos a 4° C. O sobrenadante foi coletado e o sedimento contendo as MoMPs foi suspenso em HBSSM. As amostras foram avaliadas em citometria de fluxo.

### **3.2.3. Efeito do congelamento na manutenção da integridade das MoMPs**

O SMA foi armazenado a 4° C ou a – 80° C por 24 horas. Em seguida, as amostras foram avaliadas em citometria de fluxo.

### 3.3. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

O SMA, obtido como descrito no item 3.2.2, foi submetido à ultracentrifugação a 100.000 g, por 45 minutos a 4° C. Os sedimentos foram suspensos em fixador de Karnovsky (glutaraldeído a 2,5% e paraformaldeído a 4% em tampão cacodilato de sódio a 0,1 M) por 16 horas a 4° C. Após fixação, as MoMPs foram novamente ultracentrifugadas e o sedimento lavado em tampão cacodilato de sódio a 0,1 M. Após nova ultracentrifugação, as MoMPs foram pós-fixadas, em uma solução contendo tetróxido de ósmio a 1%, ferricianeto de potássio a 0,8% e cloreto de cálcio a 5 mM, por 40 minutos. Posteriormente, a amostra foi ultracentrifugada e lavada por duas vezes em tampão cacodilato de sódio para remover o excesso do pós-fixador. Após o descarte do sobrenadante, as MoMPs, ressuspensas em tampão cacodilato de sódio, foram transferidas para um microtubo plástico (1,5 mL) e centrifugadas a 12.000 g por 15 minutos. Após remoção do sobrenadante, as MoMPs foram incluídas em agarose a 1% (“Low Melting point”; Sigma Chemical Co., St Louis, EUA) em água destilada. A inclusão se fez pela adição de 300 µL da agarose sobre o sedimento, seguido de nova centrifugação por 15 minutos. Após resfriamento e solidificação, o material foi desidratado em séries crescentes de acetona (30%, 50%, 70%, 90% e 100% por três vezes), por 10 minutos em temperatura ambiente. O material foi incluído em resina (Polybed 812) e em seguida mantido em estufa a 60° C, por 72 horas, para polimerizar. Os cortes do material foram feitos em ultramicrotomo, e recolhidos em grades de cobre (malha 400). Em seguida, o material foi contrastado com acetato de uranila (a 7%) e citrato de chumbo (a 1%). Após 24 horas, o material pôde ser observado em um microscópio Zeiss EM109 e as imagens foram adquiridas no programa Soft Imaging Viewer (Soft Imaging System GmbH, Olympus, Hamburgo, Alemanha).

### 3.4. DETECÇÃO DA ATIVIDADE DA MIELOPEROXIDASE NAS MoMPs E NOS SOBRENADANTES DOS MONÓCITOS ATIVADOS

A detecção da atividade da MPO foi feita por quimioluminescência na presença de luminol como substrato para oxidação. A quimioluminescência foi mensurada com um luminômetro que possui um tubo fotomultiplicador (que incorpora uma superfície de gálio), resfriado a  $-20^{\circ}\text{C}$ , e possui uma eficiência acima de 10% (aproveitamento do sinal luminoso incidente), alta sensibilidade e detecta luz de comprimentos de onda variando entre 200 e 900 nm. O sinal emitido pelo tubo fotomultiplicador é detectado diretamente por uma unidade contadora que transforma uma variação de corrente elétrica em um contagem digital. Os dados são então coletados como média de contagens/segundo, correspondendo aos fótons/segundo emitidos na reação de luminescência. As amostras (MoMPs derivadas de  $10^6$  células ou volume de sobrenadante equivalente) foram adicionadas a placas de Petri de 35x10 mm com 20  $\mu\text{M}$  de luminol (Sigma Chemical Co., St Louis, EUA) e HBSSM (volume para completar 2 mL/placa), cobertas com filme plástico e mantidas em uma câmara escura a  $37^{\circ}\text{C}$  durante todo o tempo da leitura. A leitura foi feita em duplicata para cada amostra e na presença ou ausência de 10  $\mu\text{M}$  de azida sódica, um inibidor de peroxidases, dentre elas a MPO. Após leitura basal durante 100 segundos, 20  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  foi adicionado, e a leitura realizada durante os 300 segundos seguintes. A MPO, se presente, reduz o  $\text{H}_2\text{O}_2$  à água e é oxidada formando o composto I, este por sua vez é capaz de oxidar o íon  $\text{Cl}^-$  formando o  $\text{HOCl}$  (ARNHOLD, 2004). Na reação que se segue com a emissão de luminescência, o luminol é oxidado pelo  $\text{OCl}^-$ , em uma reação que resulta na liberação de energia como fótons. Quando o  $\text{HOCl}$  e o  $\text{H}_2\text{O}_2$  coexistem em um sistema, a quimioluminescência dependente de luminol é maior e parece resultar de um processo de co-

oxidação do luminol por estas espécies reativas (BRESTEL, 1985). Em nossos experimentos, como controle, placas contendo apenas luminol e HBSSM foram submetidas à leitura basal e após adição do peróxido de hidrogênio.

### 3.5. ASSOCIAÇÃO DA MPO À MoMPs LIBERADAS POR DIFERENTES ESTÍMULOS

Alternativamente ao ionóforo de cálcio (2  $\mu$ M) por 20 minutos a 37° C, os monócitos foram ativados com LPS (5  $\mu$ g/mL) durante 4 horas a 37 C. Após ultracentrifugação do SMA (como descrito em 3.2.2), as MoMPs foram ressuspensas e incubadas por 20 minutos a 4° C em 100  $\mu$ L de tampão de citometria de fluxo (PBS com 5%SBF e 0,1% de azida sódica) contendo o anticorpo anti-MPO conjugado a ficoeritrina (PE) ou o isotipo controle. As MoMPs foram lavadas 2 vezes para remoção do excesso de anticorpo não ligado, pela adição de 1 mL de tampão de citometria de fluxo, seguida de ultracentrifugação (100.000 g, 45 minutos a 4° C). As MoMPs foram ressuspensas em 300  $\mu$ L de PBS e analisadas em citometria de fluxo.

### 3.6. ANÁLISE FÍSICOQUÍMICA DA ASSOCIAÇÃO DA MPO COM AS MoMPs

#### 3.6.1. Efeito do pH

Após ultracentrifugação da suspensão contendo as MPs em três tubos diferentes, os sedimentos foram suspensos em 2 mL de soluções com diferentes valores de pH: (a) solução com pH 3,0 (130 mM de NaCl, 50 mM de glicina); (b) PBS contendo protamina a 0,05 mg/mL, pH

10,7; (c) HBSSM com pH 7,4. Após incubação por 10 minutos a temperatura ambiente (aproximadamente 20° C), as suspensões foram submetidas à ultracentrifugação a 100.000 g, por 45 minutos a 4° C. Os sobrenadantes foram coletados e misturados com 3 mL de HBSSM e o pH dos sobrenadantes contendo glicina ou protamina foi ajustado para 7,4. Os sedimentos foram suspensos em 5 mL de HBSSM, pH 7,4.

A atividade da MPO presente nos sobrenadantes e nas MoMPs, após os tratamentos, foi mensurada por quimioluminescência.

### **3.6.2. Efeito da força iônica**

Após ultracentrifugação do SMA, os sedimentos foram suspensos em 1 mL de tampão fosfato, pH 7,4, com diferentes concentrações de NaCl (2, 8, 14, e 20 g/L). Como no experimento anterior, seguiu-se uma incubação por 10 minutos a temperatura ambiente, e uma ultracentrifugação a 100.000 g, por 45 minutos a 4° C. Os sobrenadantes foram coletados e os sedimentos ressuspensos em tampão fosfato, pH 7,4, contendo NaCl a 8 g/L. As amostras foram armazenadas a -80° C até o momento da mensuração da atividade da MPO por quimioluminescência.

Um volume de 200 µL dos sobrenadantes ou das suspensões de MPs foi submetido à mensuração de HOCl. A esses volumes foi acrescido 200 µL de tampão fosfato, pH 7,4, contendo NaCl a 8 g/L nas placas contendo os sobrenadantes ou 200 µL dos tampões fosfato contendo NaCl nas demais concentrações nas placas contendo as MPs (o tampão fosfato adicionado a cada

placa contendo as MPs foi o mesmo utilizado na incubação anterior das MPs, pois o sobrenadante correspondente era constituído da MPO eventualmente liberada neste tampão) para não haver influência da maior ou menor disponibilidade do íon  $\text{Cl}^-$  durante a reação, o que comprometeria a produção do HOCl pela MPO.

### **3.6.3. Re-adsorção da MPO à superfície das MoMPs**

O SMA foi ultracentrifugado (100.000 g por 45 minutos a 4° C) em 3 tubos (3 mL/cada, contendo o número de MoMPs derivadas de  $1,5 \times 10^7$  células). Após ultracentrifugação, os sobrenadantes livres das MoMPs foram coletados (sobrenadante rico em MPO) e os sedimentos foram ressuspensos em HBSSM (tubo 1) ou PBS contendo protamina 0,05 mg/mL, pH 10,7 (tubos 2 e 3). Prosseguiu-se incubação e ultracentrifugação como descritas no item 3.6.1. Os sobrenadantes dos tubos 1 e 3 foram descartados, enquanto o do tubo 2 foi coletado, o pH ajustado para 7,4 e armazenado a -80°C. Os sedimentos contendo as MoMPs foram ressuspensos em HBSSM (tubos 1 e 2) ou em sobrenadante rico em MPO (tubo 3). A suspensão 2 foi armazenada a -80°C. Após incubação por 30 minutos a 20° C, as suspensões 1 e 3 foram submetidas à nova ultracentrifugação. Após descarte dos sobrenadantes, os sedimentos foram ressuspensos em HBSSM e armazenados a -80°C. A atividade da MPO presente nas amostras foi mensurada no luminômetro, em um momento posterior, conforme metodologia descrita no item 3.4.



### 3.7. LIGAÇÃO DAS MoMPs À ANEXINA V

Com o objetivo de investigar a contribuição das cargas negativas conferidas pela expressão de fosfatidilserina na superfície das MPs para a ligação da MPO, as MoMPs, marcadas com o anticorpo anti-MPO conjugado a PE, como descrito no item anterior, foram ressuspensas em 75  $\mu$ L de HBSSM ou HBSSM contendo 10 mM de etilenodiaminotetracetato (EDTA) após a última lavagem. Foram adicionadas a cada tubo 1,5  $\mu$ L de uma solução de anexina V conjugada a isotiocianato de fluoresceína (FITC) (R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA). Após 15 minutos de incubação a temperatura ambiente, o volume das suspensões foi completado para 300  $\mu$ L e as MoMPs analisadas por citometria de fluxo.

### 3.8. ASSOCIAÇÃO DA MPO COM OUTRAS SUPERFÍCIES CELULARES

#### 3.8.1. Hemácias

As hemácias (obtidas como descrito no item 3.1.3.) foram incubadas em sobrenadante rico em MPO (SRMPO) ou HBSSM ( $5 \times 10^6$ /mL) por 30 minutos a temperatura ambiente. As suspensões foram submetidas a centrifugação a 800 g por 10 minutos para remoção da MPO não adsorvida. As hemácias foram ressuspensas em HBSSM e a atividade de MPO associada a elas foi mensurada por quimioluminescência. As hemácias foram colocadas nas placas de petri ( $10^6$ /placa) e a atividade de MPO associada às MoMPs (derivadas de  $10^6$  células) foi mensurada como controle na reação. A atividade de MPO presente no SRMPO utilizado na incubação com as hemácias também foi mensurada.

Alternativamente, após as lavagens, as hemácias ( $10^6$  / poço) foram transferidas para placas de 96 poços com fundo em “U”. A placa foi centrifugada a 720 g por 10 segundos. Após descarte do sobrenadante, as células foram homogeneizadas no “vortex” e incubadas com 25  $\mu$ L de uma diluição dos anticorpos anti-MPO, ou isotipo controle, conjugados a PE por 20 minutos a 4° C. As hemácias foram lavadas duas vezes com 100  $\mu$ l de tampão de citometria de fluxo para remoção do excesso de anticorpo não ligado, por centrifugação a 720 g durante 10 segundos. Após o descarte do sobrenadante, as hemácias foram ressuspensas em 500  $\mu$ L de PBS para aquisição de resultados no citômetro de fluxo.

### **3.8.2. Células Mononucleares De Sangue Periférico**

As células mononucleares obtidas como descrito no item 3.1.1 foram estimuladas ou não com ionóforo de cálcio (a 2  $\mu$ M, por 20 minutos a 37°C), incubadas com os anticorpos anti-MPO ou isotipo controle conjugados a PE, como descrito no item anterior, e submetidas à aquisição no citômetro de fluxo.

### **3.9. DETECÇÃO DAS MOLÉCULAS DE ADESÃO**

Para a identificação das moléculas de adesão presentes nas micropartículas, 1 mL do SMA contendo MoMPs (derivadas de  $5 \times 10^6$  monócitos) foi ultracentrifugado a 100.000 g por 45 minutos a 4° C, e o sedimento foi ressuspenso e incubado com 100  $\mu$ L de tampão de citometria de

fluxo contendo os anticorpos anti-CD11a, anti-CD11b, ou anti-CD18 conjugados a FITC ou anti-CD62L conjugado a ficoeritrina-Cy5 (Cy5.PE) por 20 minutos a 4° C. As MoMPs incubadas com os anticorpos conjugados a FITC foram concomitantemente incubadas com o anticorpo anti-MPO-PE para possibilitar a análise da proporção de MoMPs positivas para as moléculas de adesão dentre o total de MoMPs positivas para MPO. As MoMPs foram lavadas duas vezes para remoção do excesso de anticorpo não ligado, pela adição de 1 mL de tampão de citometria de fluxo, seguida de ultracentrifugação (100.000 g, 45 minutos a 4° C). As MoMPs foram ressuspensas em 300 µL de PBS para aquisição de resultados no citômetro de fluxo.

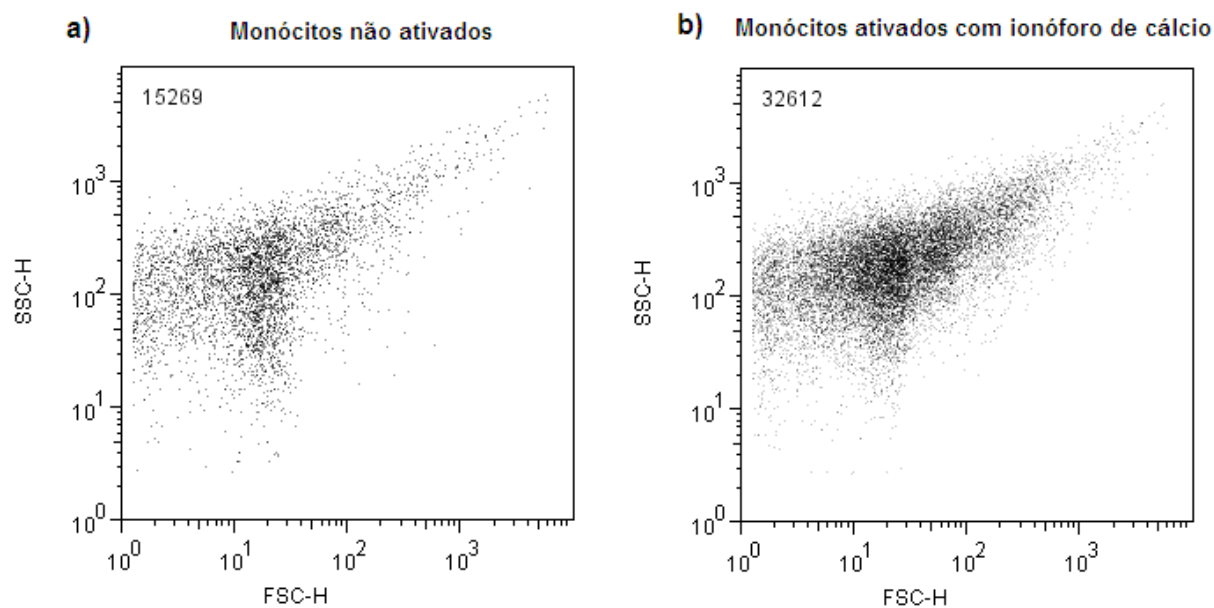
Monócitos não ativados ou ativados com ionóforo de cálcio (a 2 µM, por 20 minutos a 37° C) foram marcados como controle no experimento. 10<sup>6</sup> monócitos/poço foram incubados com 25 µL de tampão de citometria de fluxo contendo os mesmos anticorpos por 20 minutos a 4° C. O procedimento de marcação foi realizado como descrito no item 3.8.2. Todos os anticorpos utilizados foram monoclonais. O anti-CD11a, anti-CD18 e anti-MPO foram adquiridos da Novus Biologicals (Littleton, CO, USA) o anti-CD11b e os isotipos controles foram adquiridos da AbD Serotec (North Carolina, USA) e o anti-CD62L foi adquirido da BD Biosciences. Na aquisição das MoMPs e dos monócitos, foram adquiridos 100.000 e 10.000 eventos, respectivamente.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. OBTENÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS

#### 4.1.1. Aumento na liberação de MPs por monócitos após estímulo com ionóforo de cálcio

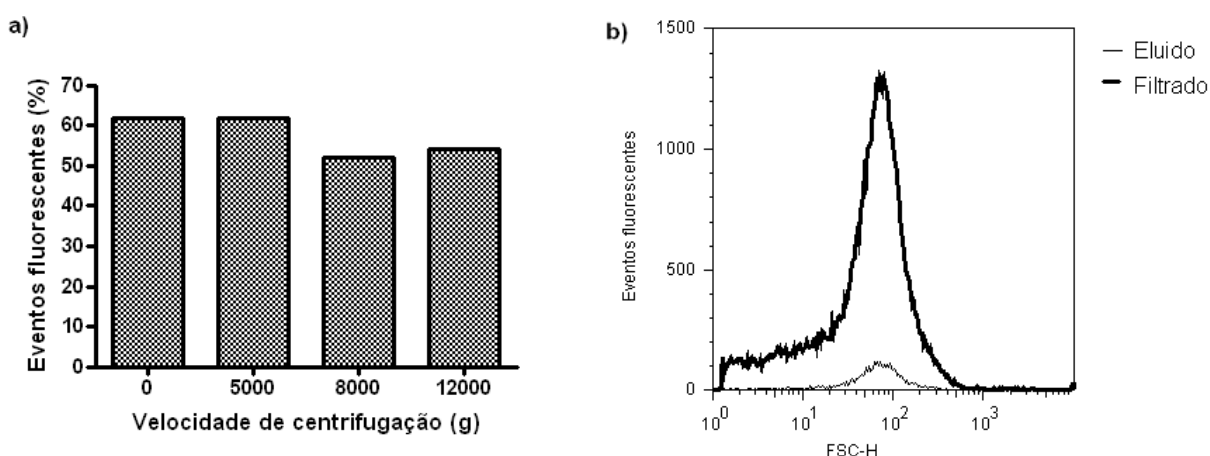
O estímulo com 2  $\mu\text{M}$  do ionóforo de cálcio aumentou ( $>2\text{X}$ ) a liberação de MPs por monócitos quando comparado com monócitos não ativados (Figura 1).



**FIGURA 1:** Liberação de MPs por monócitos humanos marcados com PKH26. O número no canto superior esquerdo representa o número de MoMPs em cada tratamento, consideradas como os eventos fluorescentes adquiridos em citometria de fluxo. a) MoMPs liberadas por monócitos não ativados. b) MoMPs liberadas após estímulo com 2  $\mu\text{M}$  do ionóforo de cálcio.

#### 4.1.2. Estratégia para remoção dos debris celulares

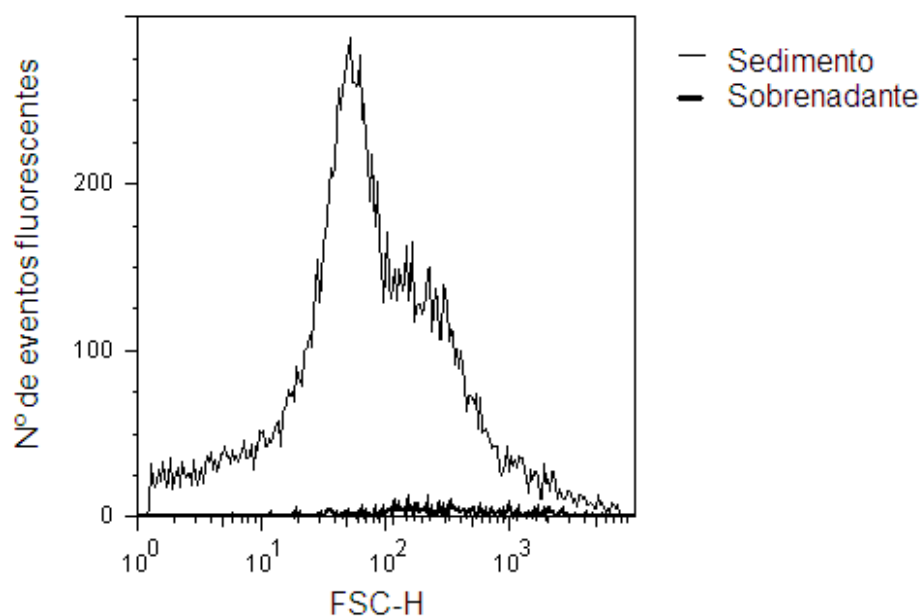
A centrifugação a 5.000 g não alterou a percentagem de eventos fluorescentes detectadas no sobrenadante, representando as MoMPs, enquanto que as centrifugações a 8.000 g e 12.000 g reduziram de 60% para cerca de 50% este número (Figura 2.a.), indicando que algumas MoMPs sedimentam nestas rotações. A filtração do SMA em uma membrana com poro 1,2  $\mu\text{m}$  resultou na retenção de apenas algumas MoMPs (Figura 2.b.), permitindo seu uso antes do isolamento das MoMPs. A partir destes resultados, nos demais experimentos deste trabalho, após a remoção das células por duas centrifugações a 2.800 g por 10 minutos a 4° C, o SMA foi centrifugado a 12.000 g por 5 minutos a 4° C ou filtrado na membrana com poros de 1,2  $\mu\text{m}$  para remover debris celulares, antes do isolamento das MoMPs por ultracentrifugação.



**FIGURA 2:** Detecção de MoMPs marcadas com o fluorocromo PKH26 nos sobrenadantes dos monócitos humanos ativados com 2  $\mu\text{M}$  de A23187, por 20 minutos a 37° C. (a) Percentagens de eventos fluorescentes mensuradas após centrifugação nas rotações indicadas no gráfico para remoção dos debris celulares. (b) Histograma representando o número de eventos fluorescentes versus o tamanho dos eventos (FSC-H); a linha espessa representa as MoMPs que passaram através de uma membrana com poro de 1,2  $\mu\text{m}$ .; a linha fina representa as MoMPs que ficaram retidas na membrana e posteriormente foram eluidas.

#### 4.1.3. Determinação da efetividade da ultracentrifugação a 100.000 g

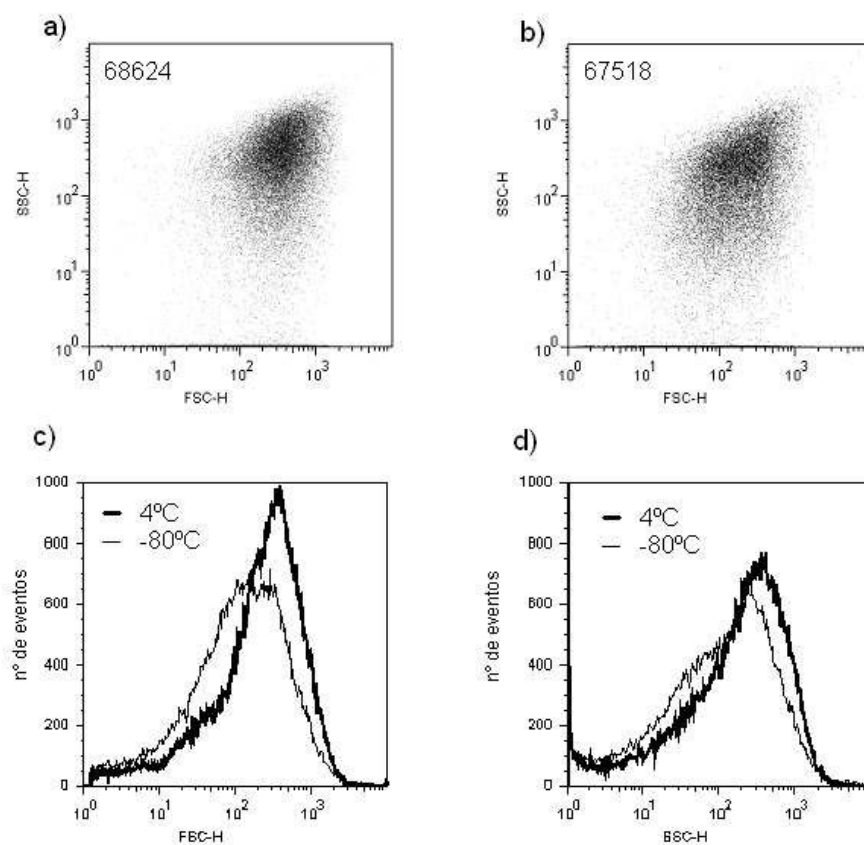
Como demonstrado na figura 3, a ultracentrifugação na velocidade de 100.000 g por 45 minutos foi suficiente para sedimentar as MoMPs, resultando em um sobrenadante praticamente sem MPs, e, portanto foi mantida nos experimentos subsequentes.



**FIGURA 3:** Detecção de MoMPs no sobrenadante e no sedimento após ultracentrifugação do sobrenadante dos monócitos humanos estimulados com 2  $\mu$ M de A23187, por 20 minutos a 37° C. Histograma representando o número de eventos fluorescentes em cada tratamento versus o tamanho dos eventos (FSC-H); a linha espessa indica os eventos adquiridos no sobrenadante; a linha fina indica os eventos adquiridos no sedimento.

#### **4.1.4. Efeito do congelamento na manutenção da integridade das MoMPs**

Conforme demonstrado na figura 4, não houve diferença entre o número de MoMPs detectadas nos tratamentos a 4° C ou -80° C, enquanto que as características foram parcialmente alteradas após congelamento a -80° C, com o aparecimento de eventos com menor tamanho e granulidade. A partir deste resultado, decidimos realizar as análises no mesmo dia do isolamento das MPs, com exceção de algumas mensurações da atividade da MPO que foram realizadas após armazenamento das amostras a -80° C, conforme descrito nas seções da metodologia.

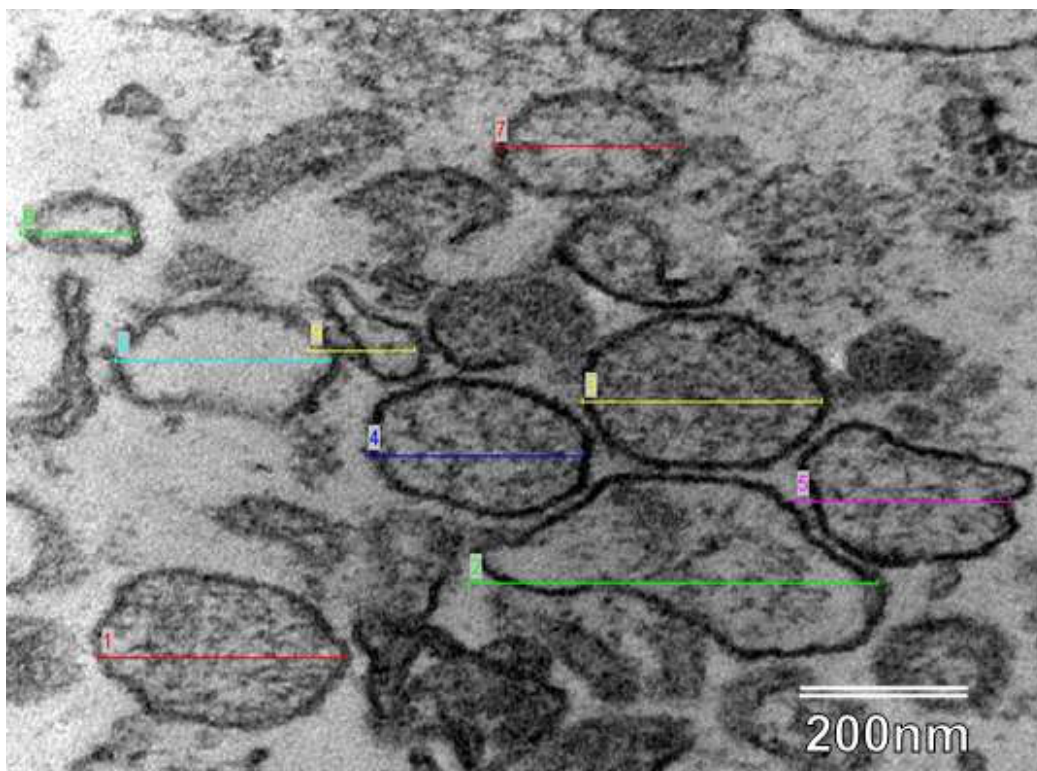


**FIGURA 4:** MoMPs após armazenamento do sobrenadante dos monócitos ativados (2 $\mu$ M de A23187) a 4° C (a) ou a -80° C (b) por 24 horas. O número no canto superior esquerdo representa o número de MoMPs em cada tratamento, consideradas como os eventos fluorescentes adquiridos. Histograma representando o número de eventos fluorescentes em cada tratamento versus o tamanho dos eventos (c) ou versus a granulosidade dos eventos (d).



#### 4.2. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

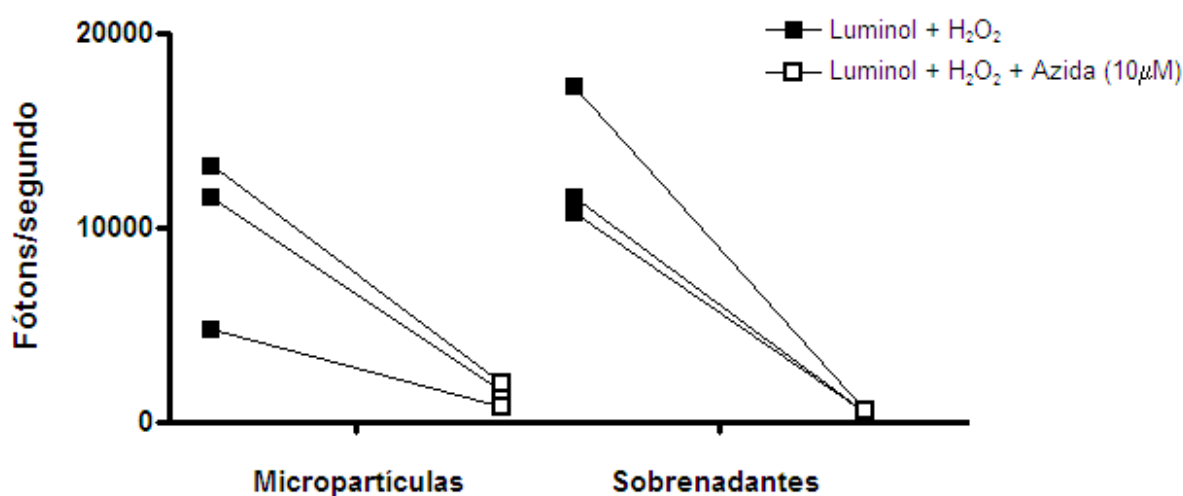
Na figura 5 podemos visualizar as MoMPs detectadas por microscopia eletrônica. As MoMPs se apresentaram como vesículas esféricas delimitadas por estruturas com contrastação característica das membranas celulares, com duas faixas eletrondensas circundando uma região menos eletrondensa. O diâmetro das MoMPs sinalizadas na figura variou de 128 a 491 nm.



**FIGURA 5:** Microscopia eletrônica de transmissão das micropartículas derivadas de monócitos humanos após ativação com 2  $\mu$ M do ionóforo de cálcio A23187, por 20 minutos a 37° C. É possível visualizar vesículas esféricas compartimentalizadas por dupla membrana. As linhas coloridas representam a análise morfométrica do diâmetro das micropartículas.

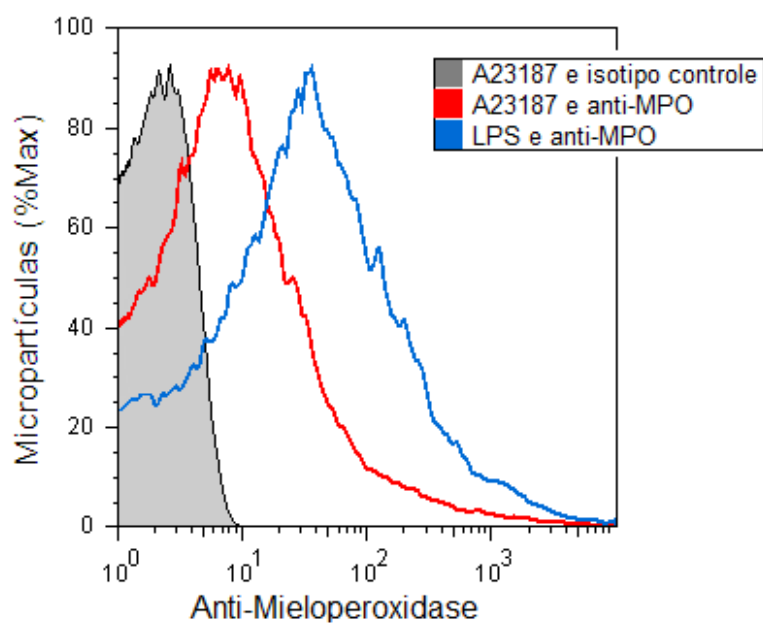
#### 4.3. ASSOCIAÇÃO DA MIELOPEROXIDASE ÀS MoMPs

A atividade da MPO foi detectada em associação com as MoMPs (Figura 6), além de no SMA após a remoção das MoMPs. A adição de azida sódica ( $10 \mu\text{M}$ ) à reação resultou na inibição dos fótons detectados, confirmando que a quimioluminescência gerada a partir da oxidação do luminol foi dependente da atividade de MPO. A adição de peróxido de hidrogênio a placas contendo apenas HBSSM e luminol não resultou na produção de fótons, e a contagem se manteve basal em  $\pm 15$  contagens/segundo (dados não mostrados).



**FIGURA 6:** Atividade de mieloperoxidase detectada no sobrenadante e nas micropartículas (MPs) derivadas de monócitos estimulados com  $2 \mu\text{M}$  do ionóforo de cálcio A23187 por 20 minutos a  $37^\circ \text{C}$ , por quimioluminescência dependente de luminol ( $20 \mu\text{M}$ ). As MPs foram separadas dos sobrenadantes por ultracentrifugação a  $100.00\text{g}$ , por 45 minutos. Cada ponto representa a média de fótons detectados durante 300 segundos após adição de  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $20 \mu\text{M}$ ). Os resultados obtidos na ausência (■) ou presença (□) de azida sódica ( $10 \mu\text{M}$ ) dentro de cada experimento estão ligados por linhas para demonstrar a inibição na emissão de fótons.

A MPO foi detectada associada às MoMPs, independentemente do estímulo indutor da vesiculação, estando presente nas MPs liberadas por monócitos ativados por ionóforo de cálcio (A23187) ou LPS (Figura 7).

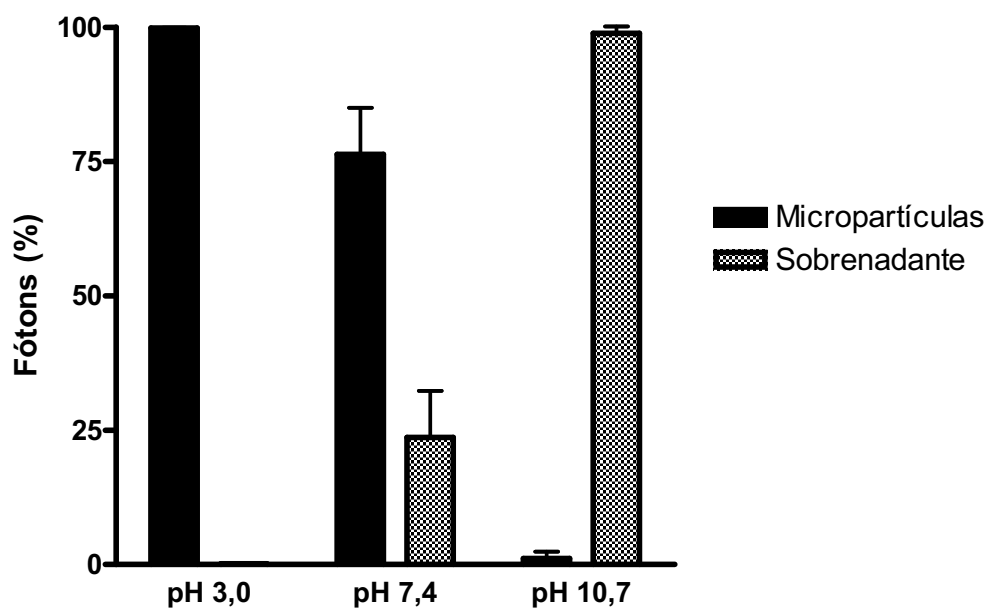


**FIGURA 7:** Presença de mieloperoxidase na superfície das micropartículas derivadas de monócitos estimulados com ionóforo de cálcio A23187 (2  $\mu$ M) por 20 minutos a 37° C ou LPS (5  $\mu$ g/mL) por 4 horas a 37° C detectada por citometria de fluxo utilizando anticorpos anti-MPO e isotipo controle conjugados ao fluorocromo ficoeritrina (PE).

#### 4.4. ANÁLISE FÍSICOQUÍMICA DA ASSOCIAÇÃO DA MIELOPEROXIDASE ÀS MoMPs

##### 4.4.1. Efeito da variação de pH

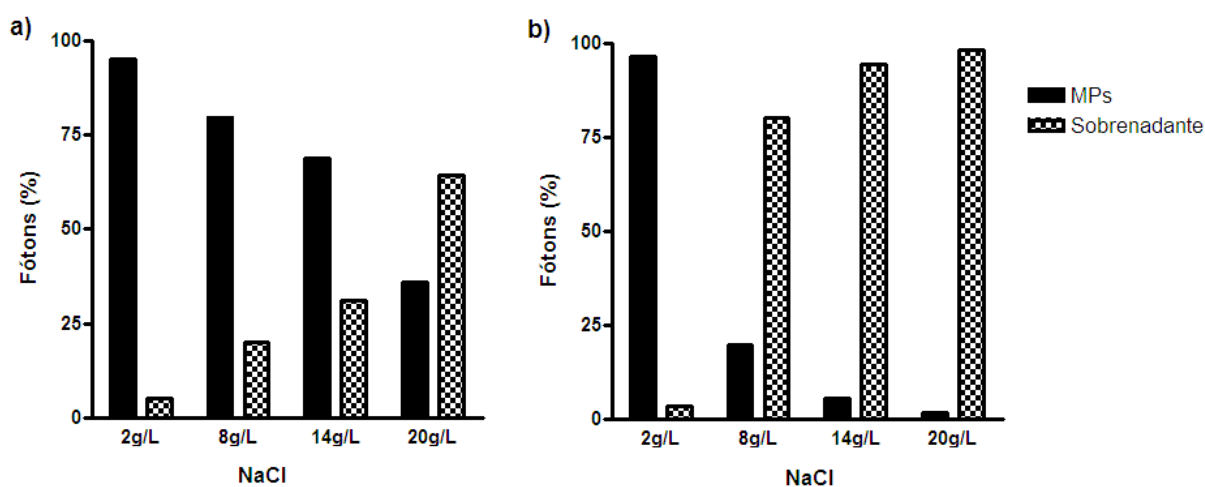
Após o tratamento com pH ácido (3,0), 99,9% da mieloperoxidase manteve-se associada às MoMPs. Entretanto após tratamento com pH 10,7, 98,9% da MPO foi dissociada da superfície das MoMPs (Figura 8).



**FIGURA 8:** Atividade de mieloperoxidase presente nos sobrenadantes e micropartículas derivadas de monócitos após tratamentos com soluções de diferentes pH e ultracentrifugação para precipitação das MoMPs. O resultado está expresso como porcentagem de fótons detectados, considerando-se o total (sobrenadante + MoMPs) como 100% para cada tratamento. Cada coluna representa a média  $\pm$  SD (n=5-6)

#### 4.4.2. Efeito do aumento da força iônica

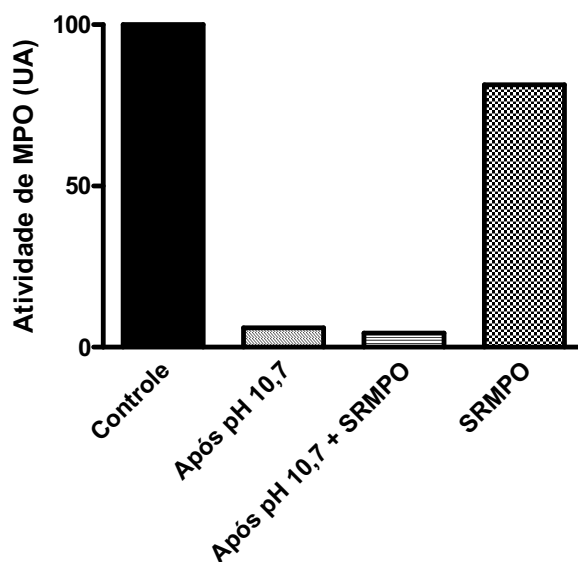
Para confirmar o resultado do experimento anterior, nós investigamos o efeito da variação da força iônica do meio sobre a associação da MPO às MoMPs. A dissociação da MPO das MoMPs ocorreu com a variação da força iônica do meio, sendo diretamente proporcional ao aumento desta (Figura 9.a). Este mesmo resultado foi encontrado para as MPs derivadas de PMNs (Figura 9.b).



**FIGURA 9:** Atividade de mieloperoxidase presente nos sobrenadantes (Sobrenadantes) e micropartículas (MPs) derivadas de a) monócitos ou b) PMNs, após tratamentos com soluções com diferentes forças iônicas. As MPs foram separadas dos sobrenadantes por ultracentrifugação. O resultado está expresso como porcentagem de fótons detectados, considerando-se o total (sobrenadante + MPs) como 100% para cada tratamento. Em (a) resultado representativo de três experimentos realizados.

#### 4.4.3. Ausência de re-adsorção da MPO às MoMPs

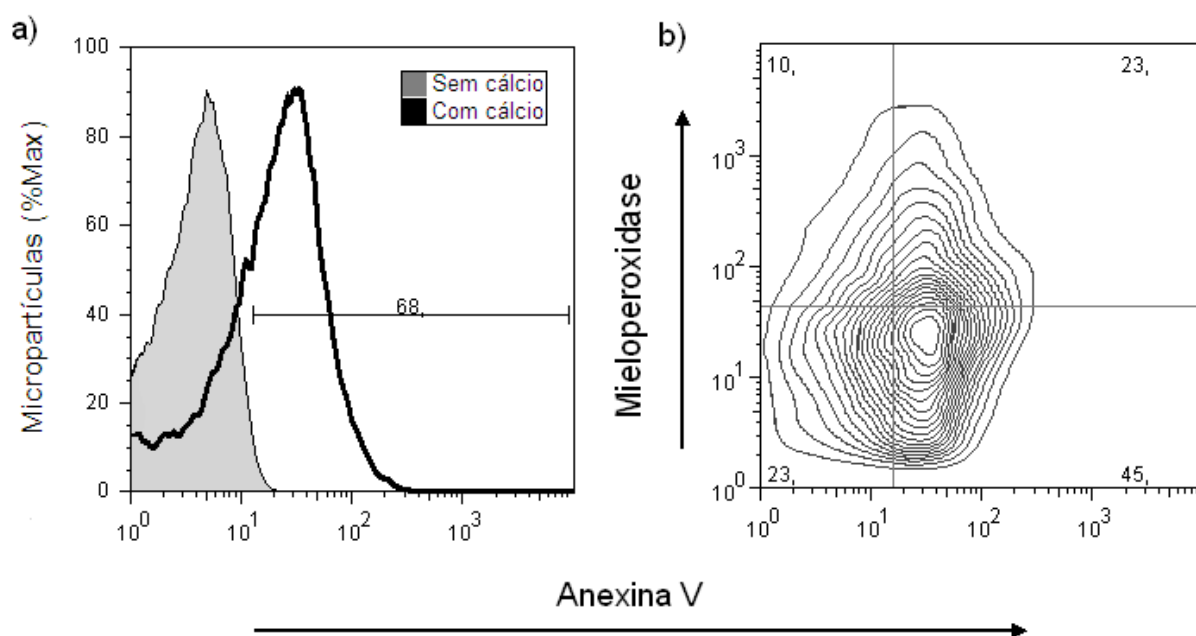
A incubação das MoMPs com o SRMPO, após remoção inicial da MPO por tratamento com pH 10,7, não resultou em re-adsorção da MPO à superfície das MoMPs (Figura 10). A atividade da MPO disponível no SRMPO também foi mensurada e encontra-se representada na figura.



**FIGURA 10:** Atividade de mieloperoxidase (MPO) presente nas micropartículas derivadas de monócitos (MoMPs), antes, após tratamento com solução com pH 10,7, e após tratamento com pH 10,7 seguido de incubação com SRMPO. A atividade da MPO no SRMPO utilizado na incubação também foi mensurada. O resultado está expresso como unidades arbitrárias (UA), calculadas considerando-se a média de fótons produzidos por MoMPs controle como 100. Resultado de um experimento representativo de dois realizados.

#### 4.5. EXPRESSÃO DE FOSFATIDILSERINA NA SUPERFÍCIE DAS MoMPs

Cerca de 60% ( $62\% \pm 6$ ) das MoMPs ligaram-se a anexina V (Figura 11), indicando a expressão da fosfatidilserina na sua superfície. Quando avaliamos a dupla marcação,  $14\% \pm 4\%$  das MoMPs apresentaram marcação apenas para MPO, enquanto  $40\% \pm 5\%$  apresentaram apenas marcação para anexina V.

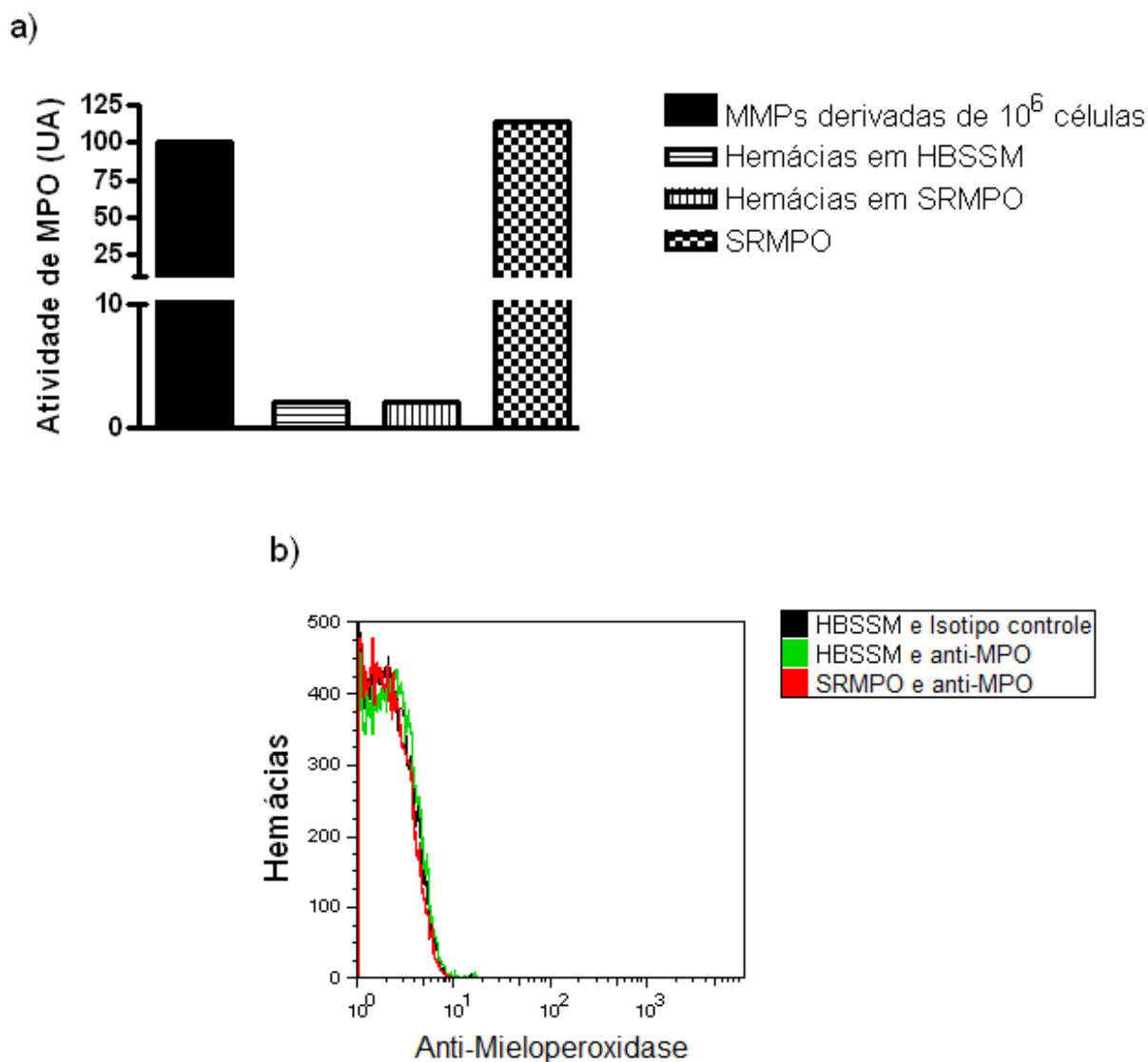


**FIGURA 11:** a) Expressão de fosfatidilserina na superfície das micropartículas derivadas de monócitos estimulados com  $2 \mu\text{M}$  do ionóforo de cálcio A23187, indicada pela ligação da anexina V na ausência ou presença de cálcio. b) Apresentação de mieloperoxidase e expressão de fosfatidilserina na superfície das micropartículas derivadas de monócitos estimulados com  $2 \mu\text{M}$  do ionóforo de cálcio A23187. Experimento representativo de dois realizados.

#### 4.6. ASSOCIAÇÃO DA MPO COM OUTRAS SUPERFÍCIES CELULARES

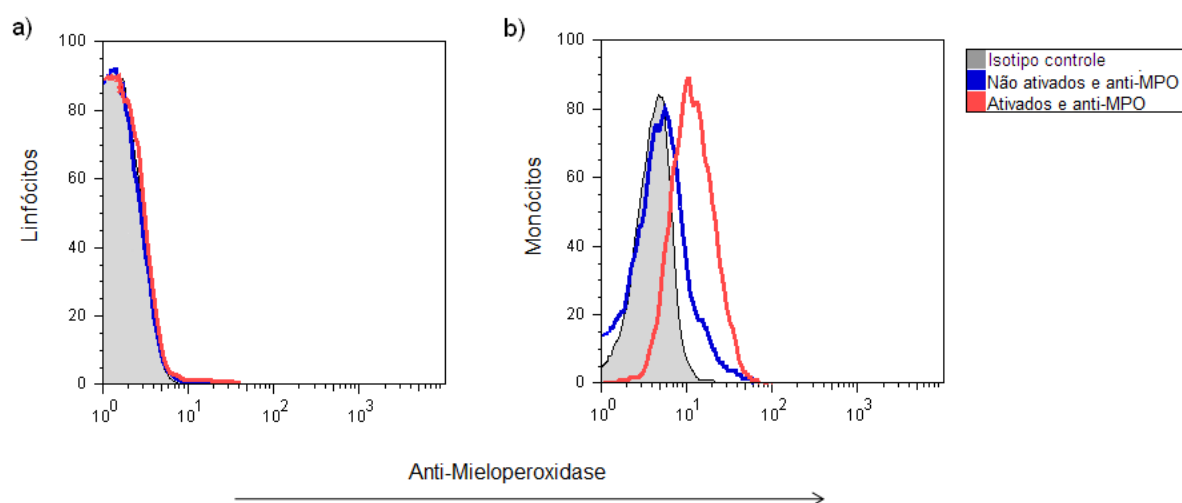
Investigamos a associação da MPO com outras superfícies celulares que não as MoMPs, com o objetivo de testar se haveria ligação inespecífica eletrostática em outra superfície celular negativa como sugerido na literatura. Escolhemos as hemácias como modelo por serem abundantes na corrente sanguínea, e, portanto, seriam um dos primeiros alvos para adsorção da MPO após sua liberação durante a degranulação de neutrófilos ou monócitos. As hemácias não foram capazes de adsorver a MPO após incubação com o SRMPO (Figura 12).





**FIGURA 12:** a) Atividade de mieloperoxidase (MPO) presente em micropartículas derivadas de monócitos (MoMPs derivadas de  $10^6$  células), em hemácias após incubação com sobrenadante rico em MPO (Hemácias em SRMPO), hemácias incubadas com solução salina balanceada de Hank modificada (Hemácias em HBSSM) e em sobrenadante rico em MPO (SRMPO). O resultado está expresso como unidades arbitrárias (UA), calculadas considerando-se a média de fótons produzidos por segundo na presença das MoMPs derivadas de  $10^6$  células como 100. Cada coluna representa o valor médio de dois experimentos. b) Ausência de MPO na superfície das hemácias, após incubação com solução salina balanceada de Hank modificada (HBSSM) ou sobrenadante rico em MPO (SRMPO), demonstrada por citometria de fluxo utilizando anticorpos anti-MPO e isotipo controle conjugados ao fluorocromo ficoeritrina (PE). Experimento representativo de quatro realizados.

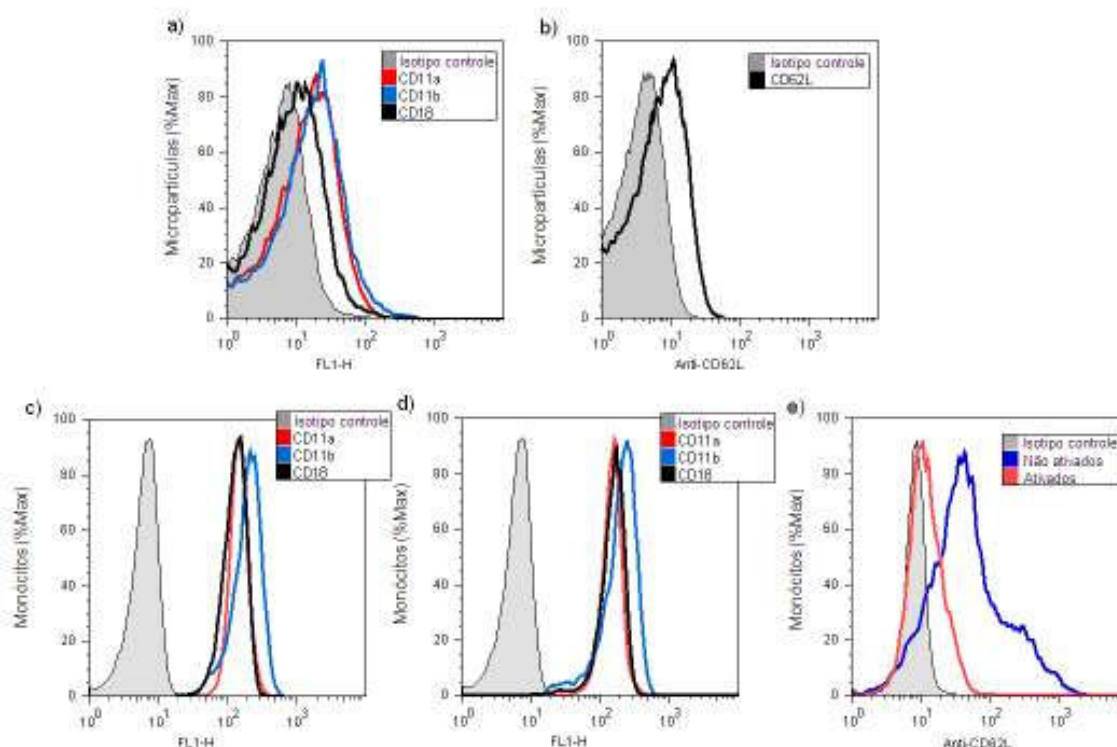
Avaliamos também a associação da MPO na superfície dos linfócitos e monócitos antes e após ativação destas células. Observamos que os monócitos expuseram a enzima na sua superfície após ativação, concomitante com a liberação no meio extracelular, entretanto, os linfócitos não adsorveram a MPO presente no meio (Figura 13).



**FIGURA 13:** Ausência ou presença de mieloperoxidase na superfície de linfócitos (a) e monócitos (b) antes e após ativação com  $2 \mu\text{M}$  do ionóforo de cálcio (A23187) por 20 minutos a  $37^\circ \text{C}$ . Experimento representativo de três realizados.

#### 4.7. PRESENÇA DE MOLÉCULAS DE ADESÃO NAS MoMPs

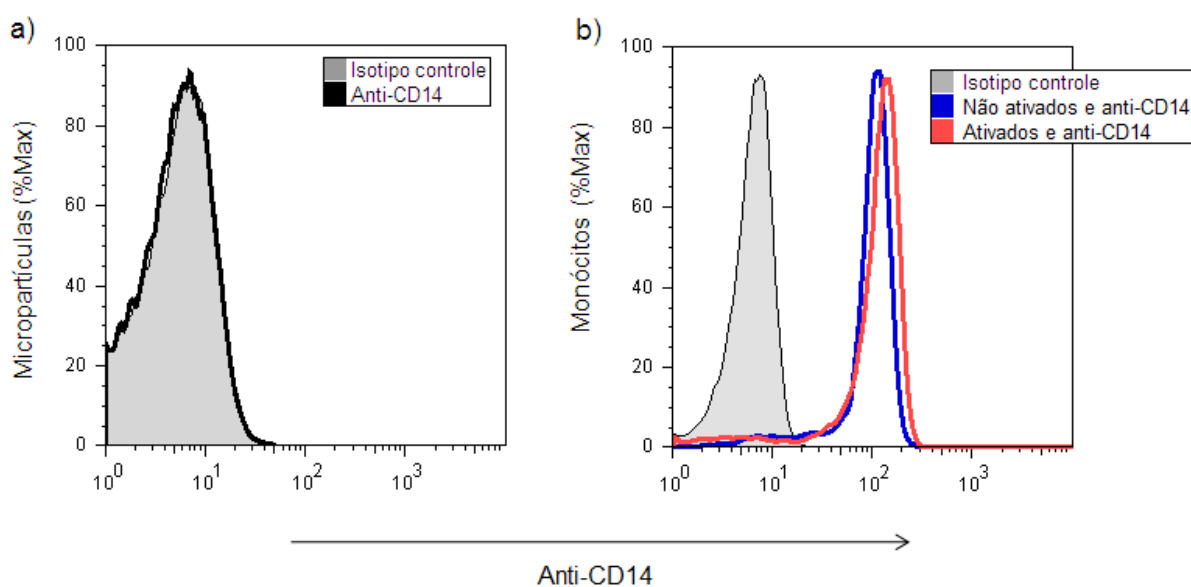
A expressão das integrinas LFA-1 (CD11a/CD18) e MAC-1 (CD11b/CD18) foi detectada na superfície das MoMPs ricas em MPO (Figura 14.a). Além disso, a expressão de L-selectina foi detectada na superfície das MoMPs (Figura 14.b). Os monócitos apresentaram marcação para todas as moléculas investigadas, como esperado, antes e após ativação (Figuras 14.c e 14.d), entretanto, ao contrário das demais moléculas, a L-selectina teve sua expressão diminuída na superfície dos monócitos após ativação, como demonstrado na figura 14.e.



**FIGURA 14:** Expressão de moléculas de adesão nas micropartículas derivadas de monócitos e nos monócitos estimulados ou não com 2  $\mu$ M do ionóforo de cálcio A23187 por 20 minutos a 37° C. a) Expressão das integrinas LFA-1(CD11a) e Mac-1 (CD11b) na superfície das MoMPs. b) Expressão de L-selectina (CD62L) na superfície das MoMPs. c) Expressão das integrinas LFA-1 e MAC-1 na superfície dos monócitos não ativados ou d) após ativação com 2  $\mu$ M do ionóforo de cálcio A23187. e) Expressão de L-selectina na superfície dos monócitos não ativados (linha azul) ou após ativação com 2  $\mu$ M do ionóforo de cálcio (linha vermelha). Gráficos representativos de dois experimentos realizados.

#### 4.8. AUSÊNCIA DE CD14 NAS MoMPs

Não encontramos expressão de CD14 na superfície das MoMPs (Figura 15.a). Os monócitos apresentaram marcação, antes e após liberação das MoMPs por ativação com ionóforo de cálcio, como esperado (Figura 15.b).



**FIGURA 15:** a) Ausência de expressão de CD14 na superfície das micropartículas derivadas de monócitos estimulados com  $2 \mu\text{M}$  do ionóforo de cálcio A23187. b) Expressão de CD14 na superfície dos monócitos não ativados (linha azul) ou estimulados com  $2\mu\text{M}$  do ionóforo do cálcio A23187 (linha vermelha). Experimento representativo de dois realizados.

## 5. DISCUSSÃO

Os protocolos de obtenção de MPs *in vitro* variam bastante na literatura, não havendo consenso em relação às velocidades de centrifugação apropriadas para remoção de debris celulares e sedimentação das MPs, nem em relação ao possível armazenamento a baixas temperaturas para análises posteriores ao dia do isolamento. Portanto, foi necessária a padronização da metodologia para obtenção das MPs derivadas de monócitos humanos ativados, previamente aos demais estudos.

Nas análises iniciais em citometria de fluxo, os monócitos foram marcados com fluorescência (PKH26 ou PKH67 – tecnologia patenteada cujo princípio consiste na incorporação de moléculas alifáticas fluorescentes na bicamada lipídica celular) para nos permitir distinguir as MPs derivadas da membrana celular nas análises. Esta necessidade partiu do pequeno tamanho das MPs e consequente presença de ruídos (“background” eletrônico) na janela de visualização do programa “CellQuest” durante sua aquisição no FACSorter. Esta limitação é decorrente do fato dos instrumentos convencionais de citometria de fluxo serem projetados para análise de células que são 10 a 1000 vezes maiores que as MPs (ARDOIN et al, 2007). A partir da utilização desta metodologia, as MoMPs foram consideradas como os eventos fluorescentes.

Nosso protocolo de obtenção de MoMPs foi eficiente, como confirmado pela presença de vesículas, delimitadas por bicamadas lipídicas, com tamanho inferior a 1  $\mu\text{m}$  em microscopia eletrônica de transmissão (Figura 5).

A estratégia comumente empregada para a remoção das células e debris celulares, antes da sedimentação das MPs, é a centrifugação a velocidades que variam de 200 g (LIU et al, 2007) a 14.000 g (CERRI et al, 2006) por 5 ou 10 minutos ou a filtração em uma membrana com poro de 1,2  $\mu\text{m}$  de diâmetro (KOLOWOS et al, 2005). Entretanto, alguns autores utilizam rotações de 16.000 g (BERNIMOULIN et al, 2009) ou 17.000 g (KOLLOWS et al, 2005) para sedimentar as MPs. Decidimos, portanto, testar se as MoMPs continuariam disponíveis no SMA para posterior isolamento, após centrifugações a 5.000 g, 8.000 g e 12.000 g durante 5 minutos. Uma vez que a maioria das MoMPs manteve-se em suspensão nestas centrifugações (Figura 2.a), escolhemos uma centrifugação a 12.000 g por 5 minutos, ou, alternativamente, uma filtração na membrana com poro de 1,2  $\mu\text{m}$  de diâmetro, com o objetivo de aumentar a pureza das preparações de MoMPs. Em relação à concentração das MoMPs, uma ultracentrifugação a 100.000 g por 45 minutos mostrou-se satisfatória, resultando em um sobrenadante virtualmente livre das MoMPs (Figura 3), não sendo necessária a utilização de velocidades tão altas e tempos tão longos, como as 200.000 g durante 4 horas utilizadas por Del Conde e colaboradores (2005). Os autores que usam as menores rotações visam remover os chamados exossomos (vesículas liberadas no espaço extracelular após fusão de corpos multivesiculares com a membrana plasmática) e isolar apenas as MPs, embora não exista comprovação de que esta metodologia ou qualquer outra seja eficaz neste propósito. O consenso atual é de que as populações de vesículas recuperadas de fluidos extracelulares e meios de incubação são inevitavelmente misturadas (CUCUCCI et al, 2009) e, portanto preferimos evitar a perda de MoMPs utilizando a rotação de 100.000 g, conforme realizado por diversos autores (HUBER et al, 2002; SHET et al, 2003), aceitando que as nossas

populações de MoMPs podem ser uma mistura de vesículas liberadas da membrana plasmática e exossomos (CUCUCCI et al, 2009).

Um único ciclo de congelamento - descongelamento das MPs é utilizado por muitos grupos na impossibilidade de isolá-las e proceder as análises no mesmo dia (GASSER et al, 2003; LIU et al, 2007; BOULANGER et al, 2001). Entretanto, é recomendável que uma análise por citometria de fluxo seja realizada para demonstrar que o número e as características das MPs não foram modificados (PICCIN et al, 2007). Nós realizamos esta análise com o SMA contendo as MoMPs e verificamos uma pequena alteração no tamanho e granulosidade de algumas MoMPs, após armazenamento a  $-80^{\circ}$  C (Figura 4). Este resultado nos levou a realizar todas as marcações e tratamentos subseqüentes no mesmo dia do isolamento das MoMPs.

Nós demonstramos que a mieloperoxidase, em sua forma cataliticamente ativa se encontra associada à superfície de micropartículas derivadas de monócitos (Figura 6). Constatamos também que, apesar da associação de certas moléculas às MPs ser dependente do estímulo utilizado (BERNIMOULIN et al, 2009), a associação da MPO às MoMPs independe do estímulo indutor da vesiculação (Figura 7). A presença da MPO na superfície de micropartículas havia sido demonstrada em MPs derivadas de PMNs ativados com fMLP por Hess e colaboradores em 1999.

O grupo de Gasser (2003) demonstrou que a MPO presente no sobrenadante de PMNs ativados, livre de MPs, foi capaz de se ligar à superfície de MPs derivadas de PMNs de indivíduos com produção deficiente de MPO. Este resultado indicou que ao menos uma parte da MPO pode se religar a superfície destas MPs, após a liberação para o meio extracelular. Nós

estudamos a natureza da interação entre a MPO e as MoMPs. A ocorrência de dissociação após os tratamentos com pH em torno do ponto isoelétrico da MPO ou com aumento da força iônica do meio, associado a ausência de dissociação em pH 3,0, demonstram o caráter eletrostático da associação. Além disso, submetendo MPs derivadas de PMNs a um aumento de força iônica do meio, encontramos o mesmo resultado, corroborando a hipótese de Gasser e colaboradores (2003) de que cargas negativas na superfície das MPs são responsáveis por esta interação. A associação da MPO com a superfície dos neutrófilos também ocorre através de interações dependentes de carga (BANGALORE & TRAVIS, 1994).

A negatividade da superfície das MPs parece ser conferida principalmente pela exposição da fosfatidilserina no folheto externo da membrana plasmática (VANWIJK et al, 2003). Entretanto, demonstramos que algumas MoMPs apresentaram associação com a MPO e não expressaram fosfatidilserina na sua superfície, enquanto a maior parte das MoMPs expressaram fosfatidilserina, mas não apresentaram associação com a MPO (Figura 11). Este resultado indica que outras moléculas contribuem com as cargas negativas responsáveis pela associação da MPO às MoMPs, mas não excluem a participação da fosfatidilserina. Além disso, quando removemos a MPO da superfície das MPs por tratamento com pH 10,7, a MPO não foi capaz de religar-se nas MoMPs após restabelecimento do pH fisiológico (Figura 10). Este resultado indica a necessidade de uma determinada distribuição de cargas na superfície das MoMPs para que ocorra a interação com a MPO, e sugere a participação de molécula(s) específica(s), na superfície das MoMPs responsáveis por esta interação, as quais se alterariam de maneira irreversível no pH 10,7.



Além disso, a MPO não se associou com as outras superfícies celulares testadas (hemácias e linfócitos), corroborando que a associação com a MPO depende de uma distribuição espacial específica de cargas na superfície celular e não ocorre simplesmente na presença de superfícies carregadas negativamente, como sugerido na literatura (KLEBANOF, 2005; ARNHOLD, 2004). Demonstramos também que os monócitos apresentam a MPO na sua superfície após ativação (Figura 13.b), assim como os neutrófilos (BANGALORE & TRAVIS, 1994; HESS et al, 2000), ambas as células produtoras de MPO. Coerentemente, as MPs derivadas de PMNs e monócitos apresentam associação com a MPO, já que brotam da membrana plasmática após ativação celular.

Outras observações, com relevância fisiológica, apontam para a especificidade da associação entre a MPO e a superfície celular. A associação da MPO a PMNs não ativados, após incubação com sobrenadante rico em MPO, tornou estas células respondedoras a anticorpos específicos com a produção de ROS (HESS et al, 2000). Além disso, Lau e colaboradores (2005) demonstraram que esta associação exerce função autócrina e parácrina, induzindo aumento da degranulação, expressão de CD11b e ativação da NADPH oxidase na superfície celular e deve-se a ligação da MPO à integrina CD11b/CD18. Embora, até o momento, não tenha sido descrita nenhuma ação regulatória da MPO sobre os monócitos, podemos supor que alguma regulação possa existir, já que a MPO se liga à superfície destas células durante sua ativação. Em relação a(s) molécula(s) responsáveis por esta interação, o CD11b aponta como um forte candidato, já que também é expresso por monócitos.

Nós identificamos a expressão das integrinas CD11a/CD18 (LFA-1) e CD11b/CD18 (MAC-1) na superfície das MoMPs ricas em MPO, demonstrando que essas MPs possuem o potencial de aderir especificamente à superfície do endotélio ativado. Neste contexto, as MoMPs atuam como carreadoras da MPO para superfície endotelial, e portanto, poderiam estar envolvidas na disfunção endotelial mediada por esta peroxidase. Esta hipótese é corroborada pela demonstração recente de que MPs CD18<sup>+</sup> derivadas de células THP-1 aderem às células endoteliais e posteriormente são endocitadas (AHARON et al, 2008). Eiserich e colaboradores (2002) observaram, em um modelo de inflamação *in vivo*, que a MPO apresentava-se nas células endoteliais e na matriz subendotelial, mas estava ausente nos neutrófilos aderentes, sugerindo que a MPO poderia ter sido liberada por leucócitos ativados no sangue e posteriormente permeado o endotélio vascular. Estes achados reforçam a possibilidade da existência de um direcionamento da MPO circulante para a superfície endotelial, que poderia ser realizado por MPs derivadas tanto de monócitos quanto de neutrófilos. As MoMPs atuam no contexto da progressão da aterosclerose, onde os monócitos são constantemente ativados e recrutados para o espaço subendotelial.

Na tentativa de explicar a origem da MPO associada à placa aterosclerótica, Hansson e colaboradores (2006) sugeriram que os macrófagos da placa de ateroma poderiam readquirir a capacidade de sintetizar esta enzima e posteriormente liberá-la para o meio extracelular. Entretanto, a detecção de MPO em macrófagos pode não depender da sua síntese por estas células, e sim de pinocitose ou fagocitose de partículas com MPO (KLEBANOFF, 2005). As MoMPs são encontradas em grande quantidade nas lesões ateroscleróticas, sendo as MPs predominantes neste microambiente (LEROYER et al, 2007). Os resultados expostos acima são compatíveis com a

possibilidade de que essas MPs, pela sua associação com a MPO, estejam envolvidas do desenvolvimento dessas lesões.

Uma possível função para as MPs derivadas de PMNs, sugerida por Hess e colaboradores (1999), é o direcionamento da MPO para superfície dos patógenos opsonizados, uma vez que estas MPs apresentam a MPO co-localizando com a proteína CR1, um receptor de opsonina. Neste contexto, estas MPs aumentariam a atividade antimicrobica extracelular dos PMNs. Uma vez que a integrina CD11b/CD18 atua como receptor do complemento (CR3) (JANEWAY, 2002), o direcionamento da MPO para superfície dos patógenos também poderia ser uma das funções das MoMPs.

A expressão de L-selectina na superfície dos monócitos diminuiu após ativação (Figura 14.e), concomitantemente com a sua liberação em associação com as MoMPs. Este resultado também foi encontrado por Gasser e colaboradores (2002) para MPs derivadas de PMNs. Este mecanismo de liberação de L-selectina, além de contribuir na capacidade adesiva das MoMPs, pode atuar adicionalmente à clivagem deste receptor na superfície dos leucócitos por metaloproteases, auxiliando no controle da densidade da L-selectina na superfície celular, regulando a migração celular para sítios inflamatórios (VENTURI et al, 2003).

É importante ressaltar que a pequena intensidade de fluorescência demonstrada nos nossos resultados deve-se ao pequeno tamanho das MPs, já que o número de moléculas presentes, e, portanto a sensibilidade de detecção do FACS, é proporcional ao tamanho das partículas. Além disso, utilizamos na marcação das MoMPs concentrações dos anticorpos previamente padronizadas para marcação dos monócitos, ao contrário da maioria dos trabalhos na literatura

que utilizam concentrações muito altas dos anticorpos para estas marcações (AGOUNI et al, 2008), aumentando a probabilidade de resultados falsos positivos.

Investigamos a expressão de fosfatidilserina nas nossas MoMPs pela ligação à anexina V, pela propriedade desta de se ligar especificamente à fosfatidilserina na presença de cálcio. Apenas 60% das MoMPs apresentaram-se positivas para anexina V, corroborando que nem todas as MPs apresentam fosfatidilserina na sua superfície (BERNIMOULIN et al, 2009). Embora Bernimoulin e colaboradores (2009) tenham demonstrado que esta proporção parece depender do estímulo indutor da vesiculação, a percentagem encontrada para nossas MoMPs foi similar a encontrada para MoMPs derivadas de células THP-1 estimulados com LPS (10 µg/mL), IgG (100 µg/mL) ou sem estímulo por 6 horas a 37° C no estudo de Bernimoulin e colaboradores. Nossos resultados enfatizam a desvantagem de se utilizar a marcação com anexina V como forma de mensurar a geração de MPs ou selecionar as MPs em citometria de fluxo para análises posteriores (LIU et al, 2007; ARDOIN et al, 2007), pois uma parte das MPs são perdidas nestes procedimentos.

Surpreendentemente, não encontramos expressão de CD14 na superfície das MoMPs por citometria de fluxo (Figura 15), indo de encontro a sua utilização como forma de identificar a origem das MPs como derivadas de monócitos/macrófagos, principalmente em estudos de quantificação e caracterização de MPs isoladas da circulação ou tecidos lesionados (LEROYER et al, 2007; OMOTO et al, 2002; SHET et al, 2003). Hess e colaboradores (1999) também não encontraram a expressão deste marcador na superfície das MPs derivadas dos PMNs, apesar da fraca expressão de CD14 nos neutrófilos (SCHUTT, 1999) poder ser a explicação neste caso.

Uma possível explicação para nosso resultado pode ser o estímulo utilizado para induzir vesiculação, pois MPs derivadas de monócitos estimulados com LPS expressam CD14 (SATTA et al, 1994) e como discutido anteriormente, o estímulo pode ser um fator determinante na associação de moléculas às MPs. Entretanto, este resultado levanta a possibilidade das MPs de origem monocítica/macrofágica estarem sendo subestimadas em estudos clínicos de fenotipagem e quantificação das MPs, e, portanto, sua participação na patologia estudada também estar sendo subestimada. O mesmo pode também ser levantado em relação à expressão de outros marcadores celulares, colocando em questão a escolha de um único marcador como metodologia para fenotipagem das MPs. Enfatizando a relevância desse ponto, até o momento não há definição de quais marcadores são expressos em MPs liberadas em uma determinada condição inflamatória/patológica

## 6. CONCLUSÕES

- A MPO associa-se a MPs derivadas de monócitos e PMNs por ligações dependentes de interações eletrostáticas
- Estas cargas parecem ser fornecidas por molécula(s) específica(s) na superfície de monócitos e PMNs, já que a MPO não se ligou a linfócitos ou hemácias.
- MPs derivadas de monócitos podem atuar como carreadoras da MPO para superfície endotelial, no contexto das DCV, visto apresentarem moléculas de adesão para a célula endotelial ativada.
- A escolha de um único marcador como forma de selecionar e/ou fenotipar MPs quanto sua origem celular pode não ser adequada.

## 7. REFERÊNCIAS

AGOUNI, A., LAGRUE-LAK-HAL, A. H., DUCLUZEAU, P. H., MOSTEFAI, H. A., DRAUNET-BUSSON, C., LEFTHERIOTIS, G., HEYMES, C., MARTINEZ, M. C. & ANDRIANTSITOHAINA, R. (2008). Endothelial dysfunction caused by circulating microparticles from patients with metabolic syndrome. **Am J Pathol**, 173(4), 1210-1219.

AHARON, A., TAMARI, T. & BRENNER, B. (2008). Monocyte-derived microparticles and exosomes induce procoagulant and apoptotic effects on endothelial cells. **Thromb Haemost**, 100(5), 878-885.

AMABILE, N., GUERIN, A. P., LEROYER, A., MALLAT, Z., NGUYEN, C., BODDAERT, J., LONDON, G. M., TEDGUI, A. & BOULANGER, C. M. (2005). Circulating endothelial microparticles are associated with vascular dysfunction in patients with end-stage renal failure. **J Am Soc Nephrol**, 16(11), 3381-3388.

ARDISSINO, D., MERLINI, P. A., ARIENS, R., COPPOLA, R., BRAMUCCI, E. & MANNUCCI, P. M. (1997). Tissue-factor antigen and activity in human coronary atherosclerotic plaques. **Lancet**, 349(9054), 769-771.

ARDOIN, S. P., SHANAHAN, J. C. & PISETSKY, D. S. (2007). The role of microparticles in inflammation and thrombosis. **Scand J Immunol**, 66(2-3), 159-165.

ARNHOLD, J. (2004). Properties, functions, and secretion of human myeloperoxidase. **Biochemistry (Mosc)**, 69(1), 4-9.

BAJ-KRZYWORZEKA, M., SZATANEK, R., WEGLARCZYK, K., BARAN, J., URBANOWICZ, B., BRANSKI, P., RATAJCZAK, M. Z. & ZEMBALA, M. (2006). Tumour-derived microvesicles carry several surface determinants and mRNA of tumour cells and transfer some of these determinants to monocytes. **Cancer Immunol Immunother**, 55(7), 808-818.

BALDUS, S., EISERICH, J. P., MANI, A., CASTRO, L., FIGUEROA, M., CHUMLEY, P., MA, W., TOUSSON, A., WHITE, C. R., BULLARD, D. C., BRENNAN, M. L., LUSIS, A. J., MOORE, K. P. & FREEMAN, B. A. (2001). Endothelial transcytosis of myeloperoxidase confers specificity to vascular ECM proteins as targets of tyrosine nitration. **J Clin Invest**, 108(12), 1759-1770.

BANGALORE, N. & TRAVIS, J. (1994). Comparison of properties of membrane bound versus soluble forms of human leukocytic elastase and cathepsin G. **Biol Chem Hoppe Seyler**, 375(10), 659-666.

BARRY, O. P., PRATICO, D., LAWSON, J. A. & FITZGERALD, G. A. (1997). Transcellular activation of platelets and endothelial cells by bioactive lipids in platelet microparticles. **J Clin Invest**, 99(9), 2118-2127.

BERNIMOULIN, M., WATERS, E. K., FOY, M., STEELE, B. M., SULLIVAN, M., FALET, H., WALSH, M. T., BARTENEVA, N., GENG, J. G., HARTWIG, J. H., MAGUIRE, P. B. & WAGNER, D. D. (2009). Differential stimulation of monocytic cells results in distinct populations of microparticles. **J Thromb Haemost**, 7(6), 1019-1028.



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

BOULANGER, C. M., SCOAZEC, A., EBRAHIMIAN, T., HENRY, P., MATHIEU, E., TEDGUI, A. & MALLAT, Z. (2001). Circulating microparticles from patients with myocardial infarction cause endothelial dysfunction. **Circulation**, 104(22), 2649-2652.

BRENNAN, M. L., PENN, M. S., VAN LENTE, F., NAMBI, V., SHISHEHBOR, M. H., AVILES, R. J., GOORMASTIC, M., PEPOY, M. L., MCERLEAN, E. S., TOPOL, E. J., NISSEN, S. E. & HAZEN, S. L. (2003). Prognostic value of myeloperoxidase in patients with chest pain. **N Engl J Med**, 349(17), 1595-1604.

BRESTEL, E. P. (1985). Co-oxidation of luminol by hypochlorite and hydrogen peroxide implications for neutrophil chemiluminescence. *Biochem Biophys Res Commun*, 126(1), 482-488.

BRODSKY, S. V., ZHANG, F., NASJLETTI, A. & GOLIGORSKY, M. S. (2004). Endothelium-derived microparticles impair endothelial function in vitro. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, 286(5), H1910-1915.

CERRI, C., CHIMENTI, D., CONTI, I., NERI, T., PAGGIARO, P. & CELI, A. (2006). Monocyte/macrophage-derived microparticles up-regulate inflammatory mediator synthesis by human airway epithelial cells. **J Immunol**, 177(3), 1975-1980.

COCUCCI, E., RACCHETTI, G. & MELDOLESI, J. (2009). Shedding microvesicles: artefacts no more. **Trends Cell Biol**, 19(2), 43-51.

DALE, D. C., BOXER, L. & LILES, W. C. (2008). The phagocytes: neutrophils and monocytes. **Blood**, 112(4), 935-945.

DAUGHERTY, A., DUNN, J. L., RATERI, D. L. & HEINECKE, J. W. (1994). Myeloperoxidase, a catalyst for lipoprotein oxidation, is expressed in human atherosclerotic lesions. **J Clin Invest**, 94(1), 437-444.

DEL CONDE, I., SHRIMPTON, C. N., THIAGARAJAN, P. & LOPEZ, J. A. (2005). Tissue-factor-bearing microvesicles arise from lipid rafts and fuse with activated platelets to initiate coagulation. **Blood**, 106(5), 1604-1611.

EISERICH, J. P., BALDUS, S., BRENNAN, M. L., MA, W., ZHANG, C., TOUSSON, A., CASTRO, L., LUSIS, A. J., NAUSEEF, W. M., WHITE, C. R. & FREEMAN, B. A. (2002). Myeloperoxidase, a leukocyte-derived vascular NO oxidase. **Science**, 296(5577), 2391-2394.

FORGIONE, M. A., LEOPOLD, J. A. & LOSCALZO, J. (2000). Roles of endothelial dysfunction in coronary artery disease. **Curr Opin Cardiol**, 15(6), 409-415.

GASSER, O., HESS, C., MIOT, S., DEON, C., SANCHEZ, J. C. & SCHIFFERLI, J. A. (2003). Characterisation and properties of ectosomes released by human polymorphonuclear neutrophils. **Exp Cell Res**, 285(2), 243-257.

GROVER-PAEZ, F. & ZAVALZA-GOMEZ, A. B. (2009). Endothelial dysfunction and cardiovascular risk factors. *Diabetes Res Clin Pract*, 84(1), 1-10.

HANSSON, M., OLSSON, I. & NAUSEEF, W. M. (2006). Biosynthesis, processing, and sorting of human myeloperoxidase. *Arch Biochem Biophys*, 445(2), 214-224.

HAZEN, S. L. (2004). Myeloperoxidase and plaque vulnerability. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 24(7), 1143-1146.

HESS, C., SADALLAH, S. & SCHIFFERLI, J. A. (2000). Induction of neutrophil responsiveness to myeloperoxidase antibodies by their exposure to supernatant of degranulated autologous neutrophils. *Blood*, 96(8), 2822-2827.

HESS, C., SADALLAH, S., HEFTI, A., LANDMANN, R. & SCHIFFERLI, J. A. (1999). Ectosomes released by human neutrophils are specialized functional units. *J Immunol*, 163(8), 4564-4573.

HUBER, J., VALES, A., MITULOVIC, G., BLUMER, M., SCHMID, R., WITZTUM, J. L., BINDER, B. R. & LEITINGER, N. (2002). Oxidized membrane vesicles and blebs from apoptotic cells contain biologically active oxidized phospholipids that induce monocyte-endothelial interactions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 22(1), 101-107.

JANEWAY, C. A., TRAVERS, P., WALPOR, M., SHLOMCHIK, M. (2002). *Imunobiologia: O sistema imune na saúde e na doença*. 5ª Edição. São Paulo: ARTMED. 2001.

JANISZEWSKI, M., DO CARMO, A. O., PEDRO, M. A., SILVA, E., KNOBEL, E. & LAURINDO, F. R. (2004). Platelet-derived exosomes of septic individuals possess proapoptotic NAD(P)H oxidase activity: A novel vascular redox pathway. **Crit Care Med**, 32(3), 818-825.

KING, C. C., JEFFERSON, M. M. & THOMAS, E. L. (1997). Secretion and inactivation of myeloperoxidase by isolated neutrophils. *J Leukoc Biol*, 61(3), 293-302.

KLEBANOFF, S. J. (2005). Myeloperoxidase: friend and foe. **J Leukoc Biol**, 77(5), 598-625.

KLEBANOFF, S. J. (1970). Myeloperoxidase: contribution to the microbicidal activity of intact leukocytes. *Science*, 169(950), 1095-1097.

KOLOWOS, W., GAIPL, U. S., SHERIFF, A., VOLL, R. E., HEYDER, P., KERN, P., KALDEN, J. R. & HERRMANN, M. (2005). Microparticles shed from different antigen-presenting cells display an individual pattern of surface molecules and a distinct potential of allogeneic T-cell activation. **Scand J Immunol**, 61(3), 226-233.

LAU, D., MOLLNAU, H., EISERICH, J. P., FREEMAN, B. A., DAIBER, A., GEHLING, U. M., BRUMMER, J., RUDOLPH, V., MUNZEL, T., HEITZER, T., MEINERTZ, T. & BALDUS, S. (2005). Myeloperoxidase mediates neutrophil activation by association with CD11b/CD18 integrins. **Proc Natl Acad Sci, U S A**, 102(2), 431-436.

LEROYER, A. S., TEDGUI, A. & BOULANGER, C. M. (2008). Role of microparticles in atherothrombosis. **J Intern Med**, 263(5), 528-537.

LEROYER, A. S., ISOBE, H., LESECHE, G., CASTIER, Y., WASSEF, M., MALLAT, Z., BINDER, B. R., TEDGUI, A. & BOULANGER, C. M. (2007). Cellular origins and thrombogenic activity of microparticles isolated from human atherosclerotic plaques. **J Am Coll Cardiol**, 49(7), 772-777.

LIBBY, P. (2002). Inflammation in atherosclerosis. **Nature**, 420(6917), 868-874.

LIU, M. L., REILLY, M. P., CASASANTO, P., MCKENZIE, S. E. & WILLIAMS, K. J. (2007). Cholesterol enrichment of human monocyte/macrophages induces surface exposure of phosphatidylserine and the release of biologically-active tissue factor-positive microvesicles. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, 27(2), 430-435.

LORIA, V., DATO, I., GRAZIANI, F. & BIASUCCI, L. M. (2008). Myeloperoxidase: a new biomarker of inflammation in ischemic heart disease and acute coronary syndromes. **Mediators Inflamm**, 2008, 135625.

MACKENZIE, A., WILSON, H. L., KISS-TOTH, E., DOWER, S. K., NORTH, R. A. & SURPRENANT, A. (2001). Rapid secretion of interleukin-1beta by microvesicle shedding. **Immunity**, 15(5), 825-835.

MALLAT, Z., HUGEL, B., OHAN, J., LESECHE, G., FREYSSINET, J. M. & TEDGUI, A. (1999). Shed membrane microparticles with procoagulant potential in human atherosclerotic plaques: a role for apoptosis in plaque thrombogenicity. **Circulation**, 99(3), 348-353.

MARTINEZ, M. C., TESSE, A., ZOBARI, F. & ANDRIANTSITOHAINA, R. (2005). Shed membrane microparticles from circulating and vascular cells in regulating vascular function. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, 288(3), H1004-1009.

MESRI, M. & ALTIERI, D. C. (1999). Leukocyte microparticles stimulate endothelial cell cytokine release and tissue factor induction in a JNK1 signaling pathway. **J Biol Chem**, 274(33), 23111-23118.

MESRI, M. & ALTIERI, D. C. (1998). Endothelial cell activation by leukocyte microparticles. **J Immunol**, 161(8), 4382-4387.

NICHOLLS, S. J. & HAZEN, S. L. (2009). Myeloperoxidase, modified lipoproteins, and atherogenesis. **J Lipid Res**, 50 Suppl, S346-351.

NICHOLLS, S. J. & HAZEN, S. L. (2005). Myeloperoxidase and cardiovascular disease. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, 25(6), 1102-1111.

NOMURA, S., TANDON, N. N., NAKAMURA, T., CONE, J., FUKUHARA, S. & KAMBAYASHI, J. (2001). High-shear-stress-induced activation of platelets and microparticles enhances expression of cell adhesion molecules in THP-1 and endothelial cells. **Atherosclerosis**, 158(2), 277-287.

ODAJIMA, T. & YAMAZAKI, I. (1970). Myeloperoxidase of the leukocyte of normal blood. I. Reaction of myeloperoxidase with hydrogen peroxide. **Biochim Biophys Acta**, 206(1), 71-77.

OMOTO, S., NOMURA, S., SHOUZU, A., NISHIKAWA, M., FUKUHARA, S. & IWASAKA, T. (2002). Detection of monocyte-derived microparticles in patients with Type II diabetes mellitus. **Diabetologia**, 45(4), 550-555.

OSTERUD, B. & BJORKLID, E. (2003). Role of monocytes in atherogenesis. *Physiol Rev*, 83(4), 1069-1112.

PICCIN, A., MURPHY, W. G. & SMITH, O. P. (2007). Circulating microparticles: pathophysiology and clinical implications. **Blood Rev**, 21(3), 157-171.

PODREZ, E. A., SCHMITT, D., HOFF, H. F. & HAZEN, S. L. (1999). Myeloperoxidase-generated reactive nitrogen species convert LDL into an atherogenic form in vitro. **J Clin Invest**, 103(11), 1547-1560.

ROSS, R. (1999). Atherosclerosis--an inflammatory disease. **N Engl J Med**, 340(2), 115-126.

SATTA, N., TOTI, F., FEUGEAS, O., BOHBOT, A., DACHARY-PRIGENT, J., ESCHWEGE, V., HEDMAN, H. & FREYSSINET, J. M. (1994). Monocyte vesiculation is a possible mechanism for dissemination of membrane-associated procoagulant activities and adhesion molecules after stimulation by lipopolysaccharide. **J Immunol**, 153(7), 3245-3255.

SCHULTZ, J. & KAMINKER, K. (1962). Myeloperoxidase of the leucocyte of normal human blood. I. Content and localization. **Arch Biochem Biophys**, 96, 465-467.

SCHUTT, C. (1999). Cd14. **Int J Biochem Cell Biol**, 31(5), 545-549.

SEGELMARK, M., PERSSON, B., HELLMARK, T. & WIESLANDER, J. (1997). Binding and inhibition of myeloperoxidase (MPO): a major function of ceruloplasmin? **Clin Exp Immunol**, 108(1), 167-174.

SHET, A. S., ARAS, O., GUPTA, K., HASS, M. J., RAUSCH, D. J., SABA, N., KOOPMEINERS, L., KEY, N. S. & HEBBEL, R. P. (2003). Sickle blood contains tissue factor-positive microparticles derived from endothelial cells and monocytes. **Blood**, 102(7), 2678-2683.

STOCKER, R. & KEANEY, JF JR. (2004). Role of oxidative modifications in atherosclerosis. **Physiol Rev**, 84(4), 1381-478.

SUGIYAMA, S., KUGIYAMA, K., AIKAWA, M., NAKAMURA, S., OGAWA, H. & LIBBY, P. (2004). Hypochlorous acid, a macrophage product, induces endothelial apoptosis and tissue factor expression: involvement of myeloperoxidase-mediated oxidant in plaque erosion and thrombogenesis. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, 24(7), 1309-1314.

TOSCHI, V., GALLO, R., LETTINO, M., FALLON, J. T., GERTZ, S. D., FERNANDEZ-ORTIZ, A., CHESEBRO, J. H., BADIMON, L., NEMERSON, Y., FUSTER, V. & BADIMON, J. J. (1997). Tissue factor modulates the thrombogenicity of human atherosclerotic plaques. **Circulation**, 95(3), 594-599.

VANWIJK, M. J., VANBAVEL, E., STURK, A. & NIEUWLAND, R. (2003). Microparticles in cardiovascular diseases. **Cardiovasc Res**, 59(2), 277-287.



VENTURI, G. M., TU, L., KADONO, T., KHAN, A. I., FUJIMOTO, Y., OSHEL, P., BOCK, C. B., MILLER, A. S., ALBRECHT, R. M., KUBES, P., STEEBER, D. A. & TEDDER, T. F. (2003). Leukocyte migration is regulated by L-selectin endoproteolytic release. **Immunity**, 19(5), 713-724.

VITA, J. A., BRENNAN, M. L., GOKCE, N., MANN, S. A., GOORMASTIC, M., SHISHEHBOR, M. H., PENN, M. S., KEANEY, J. F., JR. & HAZEN, S. L. (2004). Serum myeloperoxidase levels independently predict endothelial dysfunction in humans. **Circulation**, 110(9), 1134-1139.

WITKO-SARSAT, V., CRAMER, E. M., HIEBLOT, C., GUICHARD, J., NUSBAUM, P., LOPEZ, S., LESAVRE, P. & HALBWACHS-MECARELLI, L. (1999). Presence of proteinase 3 in secretory vesicles: evidence of a novel, highly mobilizable intracellular pool distinct from azurophil granules. **Blood**, 94(7), 2487-2496.

WOLF, P. (1967). The nature and significance of platelet products in human plasma. **Br J Haematol**, 13(3), 269-288.

YOKOYAMA, M., INOUE, N. & KAWASHIMA, S. (2000). Role of the vascular NADH/NADPH oxidase system in atherosclerosis. **Ann N Y Acad Sci**, 902, 241-247; discussion 247-248.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – W.H.O. Cardiovascular Diseases. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/index.html>>. Acesso em: 23 set. 2009.