

VALÉRIA CARRASCOZA ANDRECIOLI ORSATTO

**MICROPARTÍCULAS PLASMÁTICAS E DE PLAQUETAS:
EXPRESSÃO DA PROTEÍNA QUIESCINA/SULFIDRIL OXIDASE
E EFEITOS CELULARES**

Dissertação apresentada à Pós-
graduação em Ciências da Saúde da
PUCPR como requisito parcial para a
obtenção do título de Mestre, sob
orientação da Prof^a. Dr^a. Lia S. Nakao

**Curitiba
2005**

Dados da Catalogação na Publicação
Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/PUCPR
Biblioteca Central

O76m
2005 Orsatto, Valéria Carrascoza Andreoli
 Micropartículas plasmáticas e de plaquetas : expressão da proteína
 quiescina/sulfidril oxidase e efeitos celulares / Valéria Carrascoza Andreoli
 Orsatto ; orientadora, Lia S. Nakao. – 2005.
 49 f. : il. ; 30 cm

 Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná,
 Curitiba, 2005
 Bibliografia: f. 40-49

 1. Micropartículas derivadas de células. 2. Plaquetas (Sangue). I. Nakao, Lia
 Sumie. II. Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Programa de Pós-
 Graduação em Ciências da Saúde. III. Título.

CDD 20. ed. – 610



Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE EXAME DE DISSERTAÇÃO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE EM NÍVEL DE MESTRADO DA PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ

Aos vinte e cinco dias do mês de novembro de 2005, realizou-se a sessão pública de defesa de dissertação “**MICROPARTÍCULAS PLASMÁTICAS E DE PLAQUETAS: EXPRESSÃO DA PROTEÍNA QUIESCINA/SULFIDRIL OXIDASE E EFEITOS CELULARES**” apresentada por **VALÉRIA CARRASCOZA ANDRECIOLI ORSATTO** para obtenção do título de mestre.

A Banca Examinadora foi composta pelos seguintes membros:

MEMBROS DA BANCA	ASSINATURA
Profª. Drª. Lia Sumie Nakao PUCPR – Presidente	
Profª. Drª. Paula Cristina Trevilatto PUCPR	
Prof. Dr. Célio Xavier Costa Santos INCOR	
Profª. Drª. Andréa Novais Moreno PUCPR – Suplente	

De acordo com as normas regimentais a Banca Examinadora deliberou sobre os conceitos a serem distribuídos e que foram os seguintes:

Profª. Drª. Lia Sumie Nakao

Conceito: B

Profª. Drª. Paula Cristina Trevilatto

Conceito: A

Prof. Dr. Célio Xavier Costa Santos

Conceito: B

Profª. Drª. Andréa Novais Moreno

Conceito: _____

Conceito Final: B

Observações da Banca Examinadora:

Profª. Drª. Lia Sumie Nakao
Presidente da Banca Examinadora

Dedico este trabalho aos professores pesquisadores
da Pós-Graduação em Ciências da Saúde da PUCPR,
com admiração e respeito por seu trabalho e
contribuição a Ciência.

Agradecimentos

A Prof^a. Dr^a Lia S. Nakao, minha orientadora, meus sinceros agradecimentos, por sua perseverança e otimismo.

Ao Prof. Dr. Sílvio Marques Zanata, do Laboratório de Neurobiologia da UFPR, por sua colaboração e consideração.

Ao Prof. Dr. Waldemiro Gremski, por sua bondade em nos escutar.

Ao Prof. Dr. Paulo Brofman, por gentilmente permitir que utilizássemos seu Laboratório de Cultivo Celular.

Aos Profs. Drs. Bacila, Neusa e Omar, do Laboratório de Pesquisa, por nos concederem espaço para nosso primeiro laboratório.

Aos Profs. Drs. Fábio e Sílvia da Biologia, por permitirem usar seu laboratório.

À prof^a. Dr^a Andréa Moreno por sua presença sempre positiva nos ajudando no laboratório.

Ao Prof. Dr. Roberto Pecoits, por sua colaboração.

Aos Profs. Drs. Selene e Luís Fernando da Fisiologia por seu apoio em nos deixarem utilizar o seu laboratório.

Aos Profs. Drs. Miguel Riella e Carlos Aita, por nos permitirem utilizar o Laboratório de Ilhotas.

À Prof^a. Dr^a Maria Benigna, do Depto de Bioquímica da UFPR, por gentilmente nos apoiar permitindo o uso da ultracentrífuga.

Ao Prof. Dr. Sílvio Sanches da UFPR por nos permitir usar seu laboratório.

Ao Prof. Dr. Francisco Laurindo do Laboratório de Biologia Vascular do INCOR de São Paulo, por nos permitir realizar etapas fundamentais de nossas pesquisas no laboratório e aos Drs. Célio Santos e Marcelo Pedro por nos ajudarem.

À pesquisadora Regina Nomizo do Instituto Ludwig de São Paulo por nos ajudar na citometria.

À Dr^a Tânia Rocha do Hemocentro do HC FMUSP por nos receber em seu laboratório de Pesquisa e nos ensinar a trabalhar com as plaquetas.

Ao Serviço de Hemodinâmica do INCOR, especialmente a Enfermeira Vilmeire.

Ao Dr. Giorgio Baldanzi do Hemobanco de Curitiba por gentilmente nos doar bolsas de plaquetas.

Aos professores Dr. Luis César Guarita e Dr. Carlos Aita, pelas valiosas correções deste trabalho.

Ao professor Dr. Sérgio Siqueira, por sua orientação no isolamento das plaquetas.

Aos colegas de laboratório que por sua amizade e solidariedade nos ajudaram a chegar aos resultados: Laboratório Redox: Hellen, Lidiane, Ciro, Daniele, Paulo, Mônica, João Vítor, Andréa Stinghen, Joselito, Karime, Ana Paula, Marília, Gabriel e Kelly; Do Laboratório de Cultivo Celular: Eduardo, Júlio, Rossana, Camila, Carmen, Gabriel, Paula, Alexandra, Aline, Joana, João e Ricardo; Do Laboratório de Fisiologia: Flaviane, Fabiane e Viviane; Do Laboratório de Neurobiologia da UFPR: Lianara, Michelle, Tatiana, Daniel, Cecília, Aline, Audrey, Luís, Kátia, Elizabete e Marcelo; Do Laboratório de Bioquímica da UFPR: Sílvia Romão; Do Laboratório de Biologia Vascular: Victor, João, Maria Bertolini, Marcel, Gilberto, Léo, Laura, Vanda e Luciana.

A equipe da Secretaria de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da PUCPR, com carinho especial a Fernanda, Alcione e Patrícia.

Aos colegas técnicos dos laboratórios da PUCPR: Marcelo, Cleide, Maurício, João Carlos e à querida Marizete.

Agradeço aos pacientes e doadores, por acreditarem que as pesquisas trarão um benefício futuro a todos.

Agradeço aos professores Dr^a. Paula Cristina Trevillatto e Dr. Célio Xavier Costa Santos, por aceitarem participar da banca examinadora.

Agradeço especialmente ao meu esposo e minhas filhas, pelo carinho, paciência e colaboração na minha ausência para a realização deste trabalho.

Sumário

Lista de abreviaturas	i
Lista de figuras, gráficos e tabelas.....	ii
Resumo	iii
Abstract.....	iv
1. Introdução.....	5
1.1. Formação e características das micropartículas	6
1.2. Micropartículas em situações patológicas	8
1.3. Efeitos biológicos de micropartículas.....	10
1.4. Aspectos redox em micropartículas de plaquetas.....	11
1.5. Quiescência/sulfidril oxidase (QSOX)	12
2. Objetivos.....	15
3. Material e Métodos	16
3.1. Reagentes	16
3.2. Isolamento de micropartículas plasmáticas	16
3.3. Obtenção de micropartículas de plaquetas por ativação com ionóforo de cálcio e trombina	18
3.4. Obtenção de lisado de plaquetas	19
3.5. Citometria de fluxo.....	19
3.6. SDS-PAGE e Western blotting	20
3.7. Cultivo e tratamento de células (mesenquimais e musculares lisas de rato)	21
3.8. Análise da proliferação celular	22
3.9. Determinação dos níveis de glutathione reduzida e oxidada.....	22
4. Resultados.....	24
4.1. Caracterização das micropartículas circulantes	24
4.2. Expressão de QSOX nas micropartículas circulantes	25
4.3. Isolamento de plaquetas e micropartículas de plaquetas	26
4.4. Expressão de QSOX em micropartículas de plaquetas e lisado de plaquetas	26
4.5. Efeitos biológicos de micropartículas de plaquetas.....	27
5. Discussão	30

6. Conclusão	39
7. Referências Bibliográficas	40

Lista de abreviaturas

DMEM: Dulbecco's modified essential medium

DMSO: dimetil sulfóxido

FITC: isotiocianato de fluoresceína

GSH: glutationa reduzida

GSSG: glutationa oxidada

HPLC: cromatografia líquida de alta performance

HRP: peroxidase de raiz forte

IMDM: Iscove's modified Dulbecco medium

MTT: brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazólio

NAD(P)H : nicotinamida adenina dinucleotídio fosfato, forma reduzida

NP40: Nonidet P40

PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida

PBS: solução salina tamponada com fosfato

PDA: photodiode array

PDGF: fator de crescimento derivado de plaqueta

PDI: proteína dissulfeto isomerase

PGE1: prostaglandina E1

PMA: acetato de forbol miristato

PMP: micropartícula de plaqueta

PMSF: fluoreto de fenilmetanosulfonil

QSOX: quiescina sulfidril oxidase

SDS: dodecil sulfato de sódio

SFB: soro fetal bovino

TBST: salina tamponada com Tris contendo 0,05% Tween 20

TCA: ácido tricloroacético

TRX: tioredoxina

Lista de figuras, gráficos e tabelas

Figura 1 – Caracterização parcial das micropartículas de pacientes.	24
Figura 2 – Análise da expressão de QSOX de pacientes	25
Figura 3 – Análise por Western blotting da QSOX em micropartículas	26
Figura 4 – QSOX em micropartículas	27
Figura 5 – Efeito das micropartículas sobre a proliferação celular	29
Figura 6 – Esquema representativo da atuação das micropartículas	37
Tabela 1 – Efeito das micropartículas sobre a relação GSH/GSSG.	28

Resumo

Micropartículas são pequenas vesículas (geralmente $<1\ \mu\text{m}$ diâmetro), liberadas da membrana plasmática de células ativadas ou apoptóticas. Já foram descritas micropartículas derivadas de vários tipos celulares, como leucócitos, células vasculares, plaquetas e hepatócitos. Tem sido documentado um aumento no número de micropartículas circulantes em inúmeras disfunções vasculares ou doenças a elas associadas, como *diabetes mellitus*, doença renal, inflamação sistêmica e síndrome do anticoagulante lúpico. Ainda não estão bem definidos os efeitos biológicos das micropartículas. É conhecida a propriedade pró-coagulante, devida à exposição de fosfolipídeos aniônicos na superfície das micropartículas. Mais recentemente, seu papel pró-inflamatório e pró-apoptótico tem sido evidenciado. Além disso, estudos recentes têm mostrado que as micropartículas podem exercer seus efeitos através de processos redox, pois elas catalisam transferência de elétrons, possivelmente mediados pela proteína dissulfeto isomerase (PDI) e sub-unidades da NAD(P)H oxidase. Neste trabalho, investigamos se uma nova tiol-oxidoreductase, que poderia contribuir em alguns efeitos redox das micropartículas, estaria presente em micropartículas circulantes de doentes coronarianos e de controles sem doenças coronarianas. A quiescina sulfidril oxidase (QSOX) é uma flavoenzima que introduz pontes dissulfetos em ditióis protéicos produzindo peróxido de hidrogênio a partir do oxigênio molecular. Como a PDI pode ser um substrato fisiológico da QSOX, ela poderia estar atuando também nas micropartículas com a PDI. De fato, os dados obtidos mostraram que micropartículas de doentes coronarianos expressam mais QSOX do que as de controles saudáveis. No *pool* de micropartículas circulantes, as micropartículas de plaquetas (PMP) constituem a maior parte. Assim, produzimos PMP *in vitro* por ativação plaquetária com trombina e ionóforo de cálcio e mostramos que ambas contêm QSOX, demonstrando que as PMP devem contribuir consideravelmente para o alto teor de QSOX nas micropartículas circulantes. Também, analisamos dois efeitos biológicos das PMP. Os resultados mostraram que elas induzem a proliferação de células mesenquimais, e que alteram a relação glutatona reduzida/glutatona oxidada em células musculares lisas. Com estes dados, propusemos um mecanismo de atuação das PMP, no qual ao interagirem com as células, transferem de forma direta ou indireta seu potencial redutor, alterando o potencial redox intracelular, o que levaria a efeitos fenotípicos. Estudos adicionais deverão ainda ser realizados a fim de esclarecer melhor tal mecanismo.

Abstract

Microparticles are small vesicles, produced during cell activation or apoptosis. They can be derived from several cell types, such as leukocytes, vascular cells, platelets and hepatocytes. An increase in circulating microparticles number has been documented in many vascular dysfunction or associated diseases, such as diabetes mellitus, kidney disease, systemic inflammation and anticoagulant lupus syndrome. The biological effects of microparticles have not been well defined. Their procoagulant properties are well known, due to the anionic phospholipids exposed at their surface. Recently, pro-inflammatory and pro-apoptotic roles have been evidenced. In addition, recent studies have shown that microparticles may exert their effects through redox processes, since they catalyze electron transfer, possibly mediated by protein disulfide isomerase (PDI) and NAD(P)H oxidase subunits. In this work, we investigated if a novel thiol-oxidoreductase, which could contribute to some redox microparticles effects, would be present in circulating microparticles from coronary artery disease patients and healthy controls. Quiescin sulphydryl oxidase (QSOX) are flavoproteins that introduce disulfide bonds into protein dithiols, producing hydrogen peroxide. Since PDI can be a physiologic substrate for QSOX, this protein could be interacting with PDI also in microparticles. In agreement, our results showed that microparticles from coronary artery disease patient express higher levels of QSOX than those from the controls. In the circulating microparticle pool, those derived from platelet represent the majority. Therefore, we produced platelet-derived microparticles (PMP) in vitro, using thrombin and calcium ionophore. Both PMP express QSOX, demonstrating that PMP contribute to the high level of QSOX in circulating microparticles. We also analyzed two cellular effects of PMP. The results showed that they induce mesenchymal cell proliferation and alter the ratio reduced/ oxidized glutathione in smooth muscle cells. Based on these data, we proposed a mechanism, where PMP interact with cells and direct or indirectly transfer their reducing potential, altering their intracellular redox status, which could lead to a phenotypic modulation. In order to better characterize such mechanism, further studies will be made.

1. Introdução

Micropartículas são pequenas vesículas (geralmente $< 1 \mu\text{m}$ diâmetro), liberadas da membrana plasmática de células ativadas ou apoptóticas. Elas foram inicialmente identificadas em 1940, quando foi observado que plasma ou soro humano continham um fator subcelular que facilitava a formação de fibrina. Em 1967, por meio de técnicas de microscopia eletrônica, foi então demonstrado que o fator subcelular consistia de pequenas vesículas, as quais foram denominadas “platelet dust”, pois apresentavam atividade pró-coagulante, semelhante a plaquetas intactas. Tal atividade pró-coagulante é devida à presença de fosfolípidos aniônicos, como a fosfatidilserina exposta em sua superfície durante os processos de estimulação celular, a qual se torna uma superfície catalítica para o complexo pró-trombinase (DIAMANT, TUSHUIZEN, NIEUWLAND, 2004).

O interesse pelas micropartículas tem aumentado substancialmente nos últimos anos, após a demonstração do aumento de sua concentração no sangue em situações clínicas nas quais o risco trombótico está elevado (VAN WIJK, VANBAVEL, STURK, NIEUWLAND, 2003) e da sua associação com a desordem hemorrágica na síndrome de Scott (TOTI, SATTA, FRESSINAUD, MEYER, FREYSSINET, 1996). Atualmente, sabe-se que maioria das micropartículas encontradas no sangue é derivada de plaquetas, mas elas também podem ser derivadas de eritrócitos, granulócitos, monócitos, linfócitos e células endoteliais. Além disso, suas propriedades biológicas incluem não somente as pró-coagulantes, mas também pró-inflamatórias e mediadoras de várias funções celulares (JY, HORSTMAN, ARCE, AHN, 1992; FOURCADE, SIMON, VIODE, RUGANI, LEBALLE, RAGAB, FOURNIE, SARDA, CHAP, 1995).

1.1. Formação e características das micropartículas

Existem dois processos celulares típicos que levam à formação de micropartículas: a ativação celular e a apoptose. A ativação celular pode ser disparada por diversos agonistas. As plaquetas são ativadas por trombina, ionóforo de cálcio A23187, ADP mais colágeno, complexo C5b-9 do sistema complemento e *shear stress* (SIMS, FAIONI, WIEDMER, SHATTIL, 1988; SIMS, et al 1989; GILBERT, SIMS, WIEDMER, FURIE, SHATTIL, 1991; TANS, ROSING, THOMASSEN, HEEB, ZWAAL, GRIFFIN, 1991; WIEDMER, SIMS, 1991; GEMMELL, SEFTON, YEO, 1993; FOURCADE, SIMON, VIODE, RUGANI, LEBALLE, RAGAB, FOURNIE, SARDA, CHAP, 1995; MIYAZAKI, NOMURA, MIYAKE, KAGAWA, KITADA, TANIGUCHI, KOMIYAMA, FUJIMURA, IKEDA, FUKUHARA, 1996; SILJANDER, CARPENS, LASSILA, 1996; BARRY, PRATICO, LAWSON, FITZGERALD, 1997; HOLME, ORWIN, HAMERS, SOLUM, BROSSTAD, BARSTAD, SAKARIESSEM, 1997; TAUBE, McWILLIAM, LUDDINGTON, BYRNE, BAGLIN, 1999; FORLOW, McEVER, NOLLERT, 2000). Monócitos, células endoteliais, hepatócitos e células musculares lisas liberam micropartículas quando ativadas por lipopolissacarídeos bacterianos, citocinas (como TNF-alfa, IL-1), complexo C5b-9 ou hidróperóxido (LEEWENBERG, SMEETS, NEEFJES, SHAFFER, CINEK, JEUNHOMME, AHERN, BUURMAN, 1992; PATEL, ZIMMERMAN, PRESCOTT, McINTYRE, 1992; SATTA, TOTI, FEUGEAS, BOHBOT, DACHARY-PRINGENT, ESCHWEGE, HEDMAN, FREYSSINET, 1994; MIYOSHI, UMESHITA, SAKON, IMAJOH, OHMI, FUJITANI, GOTOH, OIKI, KAMBAYASHI, MONDEM, 1996; COMBES, SIMON, GRAU, ARNOUX, CAMOIN, SABATIER, MUTIN, SANMARCO, SAMPOL, DIGNAT-GEORGE, 1999; SCHECTER, SPIRN, ROSSIKHINA, GIESEN, BORDANOV, FALLON, FISHER, SCHNAPP, NEMERSON,

TAUBMAN, 2000). Na ativação, ocorre um aumento na concentração intracelular de cálcio, o qual leva a ativação de proteínas quinases e inibição de proteínas fosfatases, e ativação de calpaína, que degrada talina, permitindo a vesiculação na membrana plasmática (VAN WIJK, et al, 2003). No caso da apoptose, que se caracteriza por contração celular, fragmentação do DNA e vesiculação dinâmica da membrana, a formação de micropartícula resulta da ativação de ROCK I (Rho-associated kinase) pelas caspases, geração de uma força contrátil pelo complexo actina-miosina e formação das vesículas. Como na apoptose o DNA fragmentado migra do núcleo para as vesículas e corpos apoptóticos, estas micropartículas podem conter DNA fragmentado (VAN WIJK, et al, 2003).

Em termos de composição, as micropartículas consistem basicamente de lipídeos e proteínas, as quais variam de acordo com a origem celular e o processo de formação. Recentemente, o proteoma de micropartículas plasmáticas de doadores saudáveis detectou a presença de mais de 1000 *spots* e resultou na identificação de 169 proteínas abundantemente presentes, dentre as quais as 10 mais abundantes são imunoglobulina cadeias μ e κ , fibrinogênio (cadeias α , β , e γ), actina, albumina, integrina α -IIb, cadeia J da imunoglobulina, polipeptídeo 6 leve da miosina, profilina I e ciclofilina A (JIN, DRWAL, BOURGEOIS, STALTZ, WU, 2005). Além dessas, destacam-se proteínas do citoesqueleto ou ligantes de actina, proteínas citossólicas, como chaperonas, moléculas sinalizadoras, antioxidantes, elementos do proteassoma e enzimas metabólicas. Também foi demonstrado que cerca de 80% das micropartículas isoladas de condições fisiológicas são derivadas de plaquetas (JIN, et al, 2005). Os lipídeos que constituem a membrana vesicular estão distribuídos de modo assimétrico na bicamada, com fosfolipídeos carregados negativamente para o lado externo da vesícula, como fosfatidilserina e

fosfatidiletanolamina (ZWAAL, SCHROIT, 1997). Entretanto, há ainda poucos dados na literatura sobre a composição lipídica das micropartículas. Em micropartículas de doadores saudáveis, foi verificado que aproximadamente 60% dos lipídeos correspondem a fosfatidilcolina, e os 40% restantes correspondem a esfingomiéline, fosfatidiletanolamina e fosfatidilserina (WEERHEIM, KOLB, STURK, NIEUWLAND, 2002). As composições de micropartículas isoladas de líquido sinovial de pacientes com artrite (FOURCADE, et al, 1995) e de células endoteliais exposta a estresse oxidativo (HUBER, VALES, MITULOVIC, BLUMER, SCHIMID, WITZTUM, BINDER, LEITINGER, 2002) foram analisadas e mostraram-se claramente diferentes da descrita para o sangue de doadores saudáveis (ZWAAL, et al, 1997), indicando a dependência da origem celular e estímulo na composição lipídica das micropartículas.

1.2. Micropartículas em situações patológicas

Inúmeras situações patológicas têm sido descritas onde há um aumento no número de micropartículas plasmáticas, como síndromes agudas coronarianas (MALLAT, BENAMER, HUGEL, BENESSIANO, STEG, FREYSSINET, TEDGUI, 2000), aterosclerose (NOMURA, IMAMURA, OKUNO, KAMIYAMA, FUJIMURA, YKEDA, FUKUHARA, 2000), diabetes (NOMURA, et al, 1994, 1995), hipertensão (NOMURA, et al, 1994), trombocitopenia idiopática (NOMURA, et al, 1991; JY, HORSTMAN, ARCE, AHN, 1992), anticoagulante lúpico (COMBES, et al, 1999), hemoglobinúria paroxística noturna (HUGEL, SOCIE, VU, TOTI, GLUCKMAN, FREYSSINET, SCROBOHACI, 1999), pré-eclampsia (VAN WIJK, et al 2002), sepse (JOOP, BERCKMANS, NIEUWLAND, BERKOUT, ROMIJN, HACK, STURK, 2001; NIEUWLAND, BERKMANS, MCGREGOR, BÖING, ROMIJN, WESTERNDORP,

2000), inflamação sistêmica (OGURA, KAWASAKI, TANAKA, KOH, TANAKA, OZEKI, HOSOTSUBO, KUWAGATA, SHIMAZU, SUGIMOTO, 2001) e uremia (NOMURA, et al, 1994). Dentre as células de origem dessas micropartículas incluem plaquetas, células endoteliais e leucócitos. Interessantemente, as micropartículas aparecem em concentrações plasmáticas elevadas em doenças que envolvem hipercoabilidade. Assim, como a hipercoabilidade é uma característica de doenças cardiovasculares, as micropartículas possivelmente desempenham um papel importante no desenvolvimento do estado pró-trombótico de tais doenças. Analogamente, a geração de micropartículas é reduzida em diversas desordens hemorrágicas, como a síndrome de Scott (SIMS, et al, 1989) e a doença de Glanzmann (GEMMELL, et al, 1993).

Especificamente em relação às síndromes coronárias, a identificação de micropartículas no sangue periférico de pacientes portadores de doença arterial coronariana tem sido bastante evidenciada. Inicialmente observou-se aumento nos níveis de micropartículas ligantes de anexina V por meio de técnicas de citometria de fluxo e que apresentavam atividade pró-trombótica *in vitro* (MALLAT, et al, 2000). Outros estudos demonstraram aumento de micropartículas derivadas do endotélio, que seriam marcadores de lesão endotelial (BERNAL-MIZRACHI, JY, JIMENEZ, PASTOR, MAURO, HORSTMAN, MARCHENA, AHN, 2003). Em vários destes estudos tentou-se associar a presença e o número destas partículas à evolução clínica ou ao prognóstico destes pacientes, com resultados por vezes contraditórios (BERNAL-MIZRACHI, et al, 2003). Micropartículas de pacientes com infarto agudo do miocárdio inibem o relaxamento dependente do endotélio em anéis de aorta de ratos, provavelmente afetando a via de transdução do óxido nítrico endotelial

(BOULANGER, SCOAZEC, EBRAHIMIAN, HENRY, MATHIEW, TEDGUI, MALLAT, 2001).

1.3. Efeitos biológicos de micropartículas

A atividade pró-coagulante das micropartículas tem sido proposta, devido às diversas evidências tanto *in vitro* como *in vivo*. Contudo, vários trabalhos têm demonstrado que as micropartículas, através de proteínas específicas ou dos lipídeos bioativos presentes em sua composição, atuam também em diversos outros processos celulares (MOREL, TOTI, HUGEL, FREYSSINET, 2004).

Micropartículas de plaquetas expressam vários receptores de adesão plaqueta-endotélio em sua superfície, como a glicoproteína IIb/IIIa (CD41), Ib e Ialla, e P-selectina (CD62P), além de lipídeos bioativos, como a esfingosina 1-fosfato e o ácido araquidônico (BARRY, et al, 1999), os quais podem disparar algumas respostas celulares. Por exemplo, elas são capazes de inibir apoptose em leucócitos polimorfonucleares (BRUNETTI, MARTINELLI, MANARINI, MASCETRA, MUSIANI, CERLETTI, AIELLO, EVANGELISTA, 2000), estimular a proliferação de células musculares lisas através da via de p42/p44 MAP quinases e de modo independente de PDGF (WEBER, KÖPPEN, SCHROR, 2000). Além disso, estimula a migração, proliferação, adesão e sobrevivência de células hematopoiéticas, ativando vias de p42/p44 MAP quinase, PI3-K-AKT e STAT (BAJ-KRZYWORZEKA, MAJKA, PRATICO, RATAJCZAK, VILAIRE, KIJOWSKI, RECA, JANOWSKA-WIECZOREK, RATAJCZAK, 2002). FITZGERALD e col. também demonstraram que as micropartículas de plaqueta ativam respostas celulares, como a ativação transcelular de plaquetas e células endoteliais pelo ácido araquidônico derivado da micropartícula (BARRY, et al, 1997) e o aumento na adesão de monócitos às células

endoteliais por meio do aumento na expressão de moléculas de adesão nos dois tipos celulares (NOMURA, et al, 1995).

Micropartículas de linfócitos T produzidas *in vitro* também se mostraram vasoativas, ao induzir disfunção endotelial em artérias através da alteração de NO sintase endotelial e caveolina 1 (MARTIN, TESSE, HUGEL, MARTINEZ, MOREL, FREYSSINET, ANDRIANTSITOHAINA, 2004).

1.4. Aspectos redox em micropartículas de plaquetas

A participação de espécies reativas na ativação plaquetária parece ser um evento consistente. A ativação provocada por trombina, ácido araquidônico, ionóforo de cálcio e PMA, por exemplo, promove um aumento na formação de peróxido de hidrogênio nas plaquetas, um evento que pode ser prevenido pela presença de glutathione peroxidase e glutathione (MARESCA, COLAO, LEONCINI, 1992). Neste sentido, tem sido demonstrado o papel inibitório de antioxidantes como o resveratrol na ativação de plaquetas *in vitro* (OLAS, WACHOWICZ, SZEDCZUK, SALUK-JUSZCZAK, KACA, 2001; OLAS, WACHOWICZ, SALUK-JUSZCZAK, ZIELINSKI, 2002). Estudos bioquímicos também identificaram alvos regulados por reações redox na molécula da integrina alfa II b beta 3, que é o receptor de fibrinogênio da plaqueta. Estes alvos consistem de cisteínas as quais se localizam na região extracelular rica em cisteína da molécula desta integrina (YAN, SMITH, 2000) e que podem ser moduladas pelo ambiente redox determinado pelas concentrações de sulfidrilas e pontes dissulfeto do meio (ESSEX, LI, 2003). Esses trabalhos têm demonstrado que a isomerização redutiva de pontes dissulfetos na subunidade beta 3 desta integrina está envolvida na ativação deste receptor, num processo mediado pela proteína dissulfeto isomerase (PDI) (ESSEX, et al, 1999). A PDI é uma tiol-

oxidoreductase que pode oxidar, reduzir ou isomerizar, dependendo do ambiente em que se encontra (NOIVA, 1999). Nas plaquetas, ela encontra-se majoritariamente na membrana plasmática (ESSEX, et al, 1995). Outras tiol-oxidoreductases têm sido descritas nas plaquetas, como a ERP5, que se localiza no citossol, porém é recrutada para a membrana em resposta a estímulos por diversos agonistas (JORDAN, STEVENS, HUBBARD, BARRET, SAGE, AUTHI, GIBBINS, 2005). Assim, parece que tiol-oxidoreductases devem ter um papel na regulação da ativação plaquetária.

Recentemente, o papel da enzima redox NAD(P)H oxidase na ativação plaquetária foi mostrada, ao induzir a formação de espécies reativas durante estímulo por colágeno e por trombina (CHLOPICKI, OLZANECKI, JANISZEWSKI, LAURINDO, PANZ, MIEDZOBRODZKI, 2004). Além disso, a demonstração de que micropartículas de pacientes sépticos possuem uma atividade NAD(P)H oxidase pró-apoptótica em células vasculares (JANISZEWSKI, DO CARMO, PEDRO, SILVA, KNOBEL, LAURINDO, 2004) sugere a importância dos mecanismos redox na ativação e agregação de plaquetas, e na atividade das micropartículas produzidas.

1.5. Quiescina/sulfidril oxidase (QSOX)

Tiol-oxidoreductases representam uma família de enzimas que podem modular significativamente vários processos celulares redox, assim como mecanismos de produção de espécies reativas, como a atividade da NAD(P)H oxidase. Uma nova tiol-oxidoreductase, a quiescina/sulfidril oxidase (QSOX) tem sido demonstrada em diversos ambientes, como no trato genital masculino (OSTROWSKI, KISTLER, 1980; BENAYOUN, ESNARD-FÈVE, CASTELLA, COURTY, ESNARD, 2001), fungos (DE LA MOTTE, WAGNER, 1987), clara de ovo

de galinha (HOOBER, JONEJA, WHITE, THORPE, 1996), endométrio de cobaia (MUSARD, SALLOT, DULIEU, FRAICHARD, ORDENER, REMY-MARTIN, JOUVENOT, ADAMI, 2001), epiderme (MATSUBA, SUGA, ISHIDOH, HASHIMOTO, TAKAMORI, KOMINAMI, WILHELM, SEITZ, OGAWA, 2002) e epitélio olfatório de camundongos (BON, ADAMI, ESNARD, JOUVENOT, VERSAUX-BOTTERI, 2005), cérebro de ratos (MAIRET-COELLO, TURY, FELLMANN, JOUVENOT, GRIFFOND, 2002, 2004, 2005), fibroblasto de pulmão humano (COPPOCK, CINA-POPPE, GILLERAN, 1993), e em neuroblastoma humano (WITTKE, WIEDMEYER, PILLMANN, SVELYEVA, WESTERMANN, SCHWAB, 2003; COPPOCK, et al, 2005).

Estas sulfidril oxidases compreendem uma família de proteínas formadas pelos domínios: PDI/TRX e Erv/Alr. A reação catalisada pelas QSOX é a oxidação de ditióis a dissulfetos com a redução do oxigênio molecular a peróxido de hidrogênio (THORPE, HOOBER, RAJE, GLYNN, BURNSIDE, TURI, COPPOCK, 2002; COPPOCK, et al, 2005). A elevada expressão de QSOX demonstrada em fibroblastos quiescentes de pulmão de embrião humano, sugerem um papel no dobramento correto de proteínas extracelulares envolvidas no controle da modulação fenotípica celular (COPPOCK, et al, 1998), consistente com uma ampla variedade de proteínas de organismos multicelulares (THORPE, et al, 2002). A QSOX poderia atuar no dobramento oxidativo de proteínas secretadas (MAIRET-COELLO, et al, 2004). Foi também evidenciada função pró-apoptótica desta tiol-oxidoreductase em células de neuroblastoma humano induzidas por intérféron gama (WITTKE, et al, 2003).

Neste contexto, a investigação da presença da QSOX nas micropartículas circulantes torna-se interessante. Também, devido à falta de dados na literatura

sobre possíveis funções e efeitos desses novos elementos e de sua ubiquidade no sangue a produção e o estudo de micropartículas *in vitro*, particularmente de plaquetas, poderão contribuir para o entendimento de seu papel em situações fisiológicas e patológicas.

2. Objetivos

Os objetivos deste trabalho são:

- Analisar a expressão da QSOX em micropartículas circulantes (isoladas de plasma de portadores e não portadores de doença coronariana).
- Analisar a expressão da QSOX em micropartículas de plaquetas.
- Estudar os efeitos das micropartículas de plaquetas na proliferação de células mesenquimais.
- Estudar a indução de estresse oxidativo em células musculares lisas.

3. Material e Métodos

Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisas com Seres Humanos da PUCPR, sob os números 236 e 597, e pelo Comitê de Ética do Incor-FMUSP.

3.1. Reagentes

Trombina, MTT, PMSF, glutathiona reduzida e oxidada foram obtidos da Sigma. Os sais componentes dos tampões utilizados foram obtidos da Vetec ou Quimex. Ionóforo de cálcio A23187 e prostaglandina E1 (PGE1) foram obtidos da Calbiochem. PDGF foi comprado da Peprotech. O coquetel inibidor de proteases foi obtido da Roche. Os plásticos para cultivo celular foram obtidos da TPP, enquanto que os reagentes do cultivo foram comprados da Invitrogen ou Cultiab. A membrana de nitrocelulose e anticorpos secundários foram comprados da GE. Os anticorpos anti-CD31, anti-CD41-FITC, anti-P-selectina-FITC e anti-CD45-FITC foram obtidos da Dako. O anticorpo anti-QSOX foi encomendado para a Bethyl Co, que imunizou uma cabra com o peptídeo EDPQFPKVQWPPRE (HOOBER, et al, 1999).

3.2. Isolamento de micropartículas plasmáticas

As micropartículas plasmáticas foram isoladas do sangue periférico dos seguintes grupos:

(i) Grupo I (grupo controle): 8 doadores voluntários (idade média 40 ± 15 anos) sem fatores de risco para doença arterial coronariana (DAC) nem história familiar para doença aterosclerótica; sem doenças autoimunes, hematológicas; ausência de estado infeccioso, inflamatório; ausência de estado pós-cirúrgico

recente; ausência de trauma, e que também não tivessem usado droga antiagregante plaquetária nas duas últimas semanas. Não houve obrigatoriedade de dieta especial ou jejum prévio. O sangue foi doado com o consentimento dos doadores.

(ii) Grupo II: 9 pacientes (idade média 58 ± 6 anos) portadores de doença coronariana crônica no Serviço de Hemodinâmica do Incor-FMUSP, imediatamente antes de serem submetidos à angioplastia transluminal coronária percutânea. Os pacientes eram portadores de pelo menos duas das seguintes doenças: hipertensão arterial sistêmica, *diabetes mellitus* e dislipidemia. Nenhum deles apresentava síndrome coronariana aguda no momento da angioplastia. O sangue foi doado com o consentimento dos doadores.

No grupo I, o sangue (vol. de 20 mL) foi coletado da veia superficial do antebraço, sem anestesia e com leve garroteamento, através de *scalp* 21G. O sangue foi transferido para tubos plásticos contendo citrato de sódio 3,8%, na proporção v/v de 1:9 (anticoagulante: sangue). Para todos os doadores, o primeiro tubo foi desprezado. No grupo II, o sangue (vol. de 20 mL) foi coletado através de punção venosa periférica antes da realização do exame, antes da injeção de heparina. Os primeiros 5 mL de sangue aspirado foram desprezados. Os 20 mL seguintes foram transferidos para tubos plásticos contendo citrato de sódio 3,8%.

Para o isolamento das micropartículas, os tubos contendo o sangue foram centrifugados (1450 rpm, 15 min, t. ambiente). O plasma foi então filtrado (filtro 0,8 μ m), diluído em PBS contendo 1 mM PMSF e ultracentrifugado a ($140.000 \text{ g} = 37.800 \text{ rpm}$) por 90 minutos a 4 °C. O *pellet* de micropartículas foi ressuspenso em 200 μ l

de PBS contendo 1 mM PMSF. As micropartículas foram analisadas imediatamente por citometria de fluxo ou congeladas a -20°C para o Western blotting.

A concentração protéica foi determinada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976).

3.3. Obtenção de micropartículas de plaquetas por ativação com ionóforo de cálcio e trombina

As plaquetas foram obtidas de bolsas de concentrado de plaquetas no Hemobanco de Curitiba. As bolsas eram doadas dentro do seu prazo de uso clínico ou vencidas no máximo por 1 dia. O volume total da bolsa (cerca de 60 mL) foi dividido em 2 tubos com 30 mL cada. O pH do concentrado de plaqueta foi ajustado com ácido cítrico 0,15 M para o pH 6,4 e 50 nM de PGE1 foi adicionada a cada tubo. Estes foram centrifugados (160 g, 10 min, t. amb). O plasma rico em plaquetas (PRP) foi coletado, transferido para tubos novos e centrifugados (1400 g, 10 min, t. amb). O *pellet* plaquetário foi gentilmente ressuspense em 0,5 mL de tampão Tyrode pH 6,4 (NaCl 0,137 M, KCl 2,68 mM, NaHCO₃ 11 mM, NaH₂PO₄ 0,434 mM, MgCl₂ 1 mM, D-glicose 5,5 mM, Hepes 5 mM). Uma alíquota de 10 µL desta suspensão foi utilizada para a contagem no número de plaquetas. Para isso, os 10 µl da suspensão foram misturados a 190 µl de oxalato de amônio 1%, e 10 µl desta solução foram aplicados em uma câmara de Neubauer. Após a ressuspensão, um volume conhecido de Tyrode foi adicionado (0,3 mL/mL concentrado inicial), e a suspensão foi novamente centrifugada (1400g, 10 min, t. amb). O *pellet* plaquetário foi então ressuspendido em tampão Tyrode pH 7,4 contendo cálcio (NaCl 0,140 M, KCl 2,7 mM, MgCl₂ 1 mM, D-glicose 5 mM, Hepes 10 mM, CaCl₂ 2 mM). A

concentração de plaquetas foi ajustada para $10^9/\text{mL}$ com o mesmo tampão acima. Esta suspensão foi dividida em 3 tubos, para ativação com ionóforo de cálcio A23187 $10\text{ }\mu\text{M}$, trombina $0,25\text{ U/mL}$ e o controle negativo sem ativador. Os tubos foram incubados a 37°C , por 30 min e depois centrifugados (1500 g , 10 min, t. amb) para remoção de restos celulares ou células inteiras. O sobrenadante foi então novamente centrifugado (16.000 g , 60 min, 4°C). O *pellet* contendo as micropartículas foi ressuspensionado em $200\text{ }\mu\text{L}$ de PBS contendo 1 mM PMSF, e utilizado imediatamente nos ensaios de atividade biológica em células em cultivo ou congeladas a -20°C para análise por Western blotting. A concentração protéica foi determinada pelo método de Bradford.

3.4. Obtenção de lisado de plaquetas

Seguindo-se as etapas anteriormente descritas até o ponto de ressuspensão do *pellet* plaquetário em tampão Tyrode pH 6,4, cerca de $0,3\text{ mL}$ da suspensão foram coletados para obtenção do lisado de plaquetas. Para isso, a suspensão foi centrifugada (1400 g , 10 min, t. amb) e o *pellet* foi lisado com $100\text{ }\mu\text{L}$ de tampão de lise (1% NP40 em PBS) gelado contendo o coquetel de inibidores de protease (Roche). O lisado foi mantido no gelo por mais 30 min, e centrifugado (12.000 g , 10 min). O sobrenadante foi transferido para novo tubo, sua concentração protéica foi determinada, e congelado a -20°C .

3.5. Citometria de fluxo

As micropartículas foram analisadas num citômetro Becton & Dickinson interfaceado com o programa Cell Quest^{MR} quanto à expressão das proteínas CD41

(ou glicoproteína IIb/IIIa, receptor de fibrinogênio, expresso em megacariócitos e plaquetas), CD31 (marcador de célula endotelial), P-selectina (marcador de plaqueta ativada), CD45 (marcador de células hematopoiéticas tronco e diferenciadas, com exceção de plaquetas e eritrócitos) e QSOX. As micropartículas foram permeabilizadas com 100 µL de 0,2% Triton X100, durante 15 min, a t. amb. Após as lavagens (13.000 g por 30 minutos a 4°C), as micropartículas foram incubadas com anti-CD31 e anti-QSOX foram ainda incubadas com anticorpos secundários (respectivamente, anti-IgG de camundongo-PE e anti-IgG de cabra-FITC, ambos 1/100) por mais 30 min. As micropartículas foram lavadas. O *pellet* de micropartículas foi ressuspenso com 250 µL de PBS e a solução foi levada ao citômetro.

3.6. SDS-PAGE e Western blotting

Cerca de 30 µg de proteínas das micropartículas ou do lisado foram aplicadas no gel de acrilamida 10% (LAEMMLI, 1970). A corrida eletroforética foi iniciada com uma amperagem constante de 13 mA. Quando as amostras entraram no gel de separação, a amperagem foi aumentada para 26 mA. A transferência das proteínas do gel para a membrana de nitrocelulose foi realizada em sistema de cuba, a uma voltagem constante de 25 V num período de tempo que variou de 12 a 16 horas. Para verificação da eficiência da transferência e da quantidade de proteína aplicada, a membrana foi corada com Ponceau. Para a realização do Western blotting, a membrana foi descorada com TBST, e os sítios inespecíficos bloqueados com leite em pó desnatado 10% em TBST por um período de não menos que 2 horas. Após o bloqueio, a membrana foi lavada com TBST e incubada com o anticorpo primário (anti- QSOX) 1:1000 diluído em TBST contendo 1% de leite desnatado, por 16 horas a 4°C, sob agitação. A membrana foi novamente lavada com TBST e incubada com o

anticorpo secundário (anti-IgG de cabra conjugado com HRP) 1:2000 diluído também em TBST com 1% leite desnatado, por 1h a temperatura ambiente. A revelação foi feita com o kit quimioluminescente SuperSignal WestPico (Pierce).

3.7. Cultivo e tratamento de células (mesenquimais e musculares lisas de rato)

As células musculares lisas de aorta de rato foram obtidas pelo método do explante (KIRSCHENLOHR, METCALFE, GRAINGER, 1996). Elas foram cultivadas em meio DMEM contendo 20% de soro fetal bovino e antibióticos e plaqueadas em garrafas de 75 cm². Quando as células atingiram uma confluência de aproximadamente 90%, o meio foi trocado por DMEM contendo 5% de soro e cultivadas por mais um dia. Após este período, foram tratadas com micropartículas de plaqueta (30 µg/ml) produzidas por ativação com A23187, durante 1 e 3 horas. Para cada tempo, foi feito um controle negativo, sem micropartículas. E um controle positivo com 0,5 mM H₂O₂ por 1 hora também foi realizado. Depois dos tratamentos, as células foram coletadas por tripsinização, lavadas e congeladas a -20°C até a análise de GSH e GSSG.

As células mesenquimais humanas de medula óssea, também chamadas células tronco adultas, foram gentilmente cedidas pelo grupo do Dr. Paulo Brofman. Elas foram cultivadas em meio IMDM com 15% de SFB e antibióticos e plaqueadas em placas de 24 poços. Ao atingirem uma confluência de 60%, foi feito um carenciamento de soro por 24 horas. Então foram adicionadas micropartículas de plaquetas (20 µg/mL) produzidas por A23187 e fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) 20 ng/mL. Foram feitos controles positivos (células com meio

contendo 10% SFB) e negativos (células com meio sem soro). Após cinco dias em cultivo, as células foram analisadas quanto à proliferação celular pelo ensaio do MTT.

3.8. Análise da proliferação celular

A proliferação celular foi avaliada pelo método do MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazólio) (DENIZOT, LANG, 1986), que avalia o metabolismo mitocondrial, e conseqüentemente o número de células vivas. Para isso, após os devidos tratamentos das células em placas de 24 poços, MTT (0,5 mg/ml) foi adicionado ao meio de cultivo e a placa foi incubada em estufa de CO₂ por 3-4 horas. Após este período, o meio contendo MTT foi aspirado, as células foram lavadas com PBS e lisadas com 100 µL de DMSO. Os lisados foram transferidos para placas de 96 poços e as absorbâncias do metabólito do MTT foram determinadas em leitor de placas, em $\lambda=550$ nm e $\lambda=690$ nm como referência. As leituras, sempre em triplicatas, foram corrigidas, considerando o controle negativo (células cultivadas em meio sem soro) como 100%.

3.9. Determinação dos níveis de glutathiona reduzida e oxidada

O *pellet* celular foi descongelado e lisado em PBS contendo inibidores de protease, por congelamento e descongelamento. O lisado foi dividido em duas alíquotas. A primeira foi tratada com 0,1 U/mL glutathiona redutase e 0,2 mM NAD(P)H por 30 minutos a temperatura ambiente, enquanto que a segunda foi apenas incubada com o mesmo volume de água. As proteínas foram precipitadas com 5% TCA e os sobrenadantes foram injetados no HPLC para a análise de GSH total (primeira alíquota) ou GSH (segunda alíquota). O sistema de HPLC da Waters consistia de duas bombas, 1 injetor, 1 detector PDA e 1 detector eletroquímico,

interfaceados com o programa Millenium (Waters). As quantidades de GSSG foram obtidas subtraindo-se os valores de GSH dos valores de GSH total. A quantificação de GSH foi realizada através de uma curva padrão utilizando-se padrão autêntico de glutathiona.

4. Resultados

4.1. Caracterização das micropartículas circulantes

Após o isolamento das micropartículas circulantes de plasma de portadores de doenças coronarianas e de voluntários sem doenças coronarianas, verificou-se que a concentração de proteínas de micropartículas estava aumentada nos pacientes ($0,21 \pm 0,09$ mg/mL sangue) em relação aos doadores sem doença coronariana ($0,12 \pm 0,09$ mg/mL sangue). Depois, foi analisada a possibilidade de serem derivadas de plaquetas e de células endoteliais, através de imunofenotipagem por citometria de fluxo. Para isso, foram usados anticorpos anti-CD31 e anti-IgG de camundongo-PE, anti-P-selectina-FITC, anti-CD45-FITC e anti-CD41-FITC. A fig. 1 mostra que as micropartículas plasmáticas dos portadores de doença coronariana derivam de células endoteliais e de plaquetas, mas não de leucócitos.

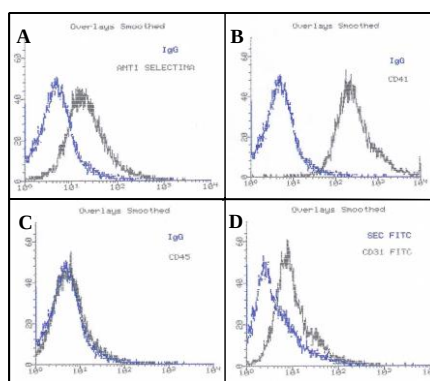


Figura 1 – Caracterização parcial das micropartículas de pacientes.

Gráfico representativo (n=9) da caracterização parcial das micropartículas circulantes isoladas de plasma de doentes coronarianos. As micropartículas foram analisadas quanto à expressão de P-selectina (A), CD41 (B), CD45 (C) e CD31 (D) por citometria de fluxo. Para isso, foram incubadas com os respectivos anticorpos conjugados a fluoróforos (traço preto) ou com anticorpos irrelevantes (traço azul).

4.2. Expressão de QSOX nas micropartículas circulantes

Nas mesmas amostras anteriores, tentou-se determinar os níveis da proteína QSOX utilizando anticorpos anti-QSOX, inicialmente por citometria de fluxo. A Figura 2 demonstra que com esta técnica não foi possível detectar QSOX nas micropartículas. Assim, ou elas não apresentam esta proteína ou o anticorpo não a reconhece em condições nativas.

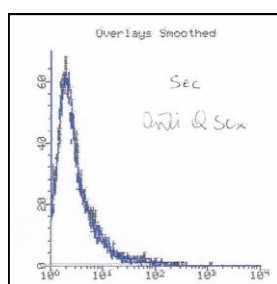


Figura 2 – Análise da expressão de QSOX de pacientes

Gráfico representativo (n= 9) da análise da expressão de QSOX em micropartículas isoladas de plasma de doentes coronarianos. As micropartículas foram incubadas com anticorpos anti-QSOX e anticorpos secundários conjugados a FITC (traço preto) ou somente com os anticorpos secundários (traço azul).

Para testar estas hipóteses, analisou-se a expressão por Western blotting. Neste caso, verificou-se que as micropartículas de portadores de doenças coronarianas apresentavam um teor aumentado de QSOX, quando comparado aos voluntários sem doença (fig. 3).

Interessantemente, apesar de todas as amostras analisadas apresentarem micropartículas, no grupo controle nem todas apresentavam QSOX, diferentemente dos doentes. A densitometria das bandas revelou uma diferença estatisticamente significativa nos níveis médios de QSOX entre os dois grupos (fig. 3).

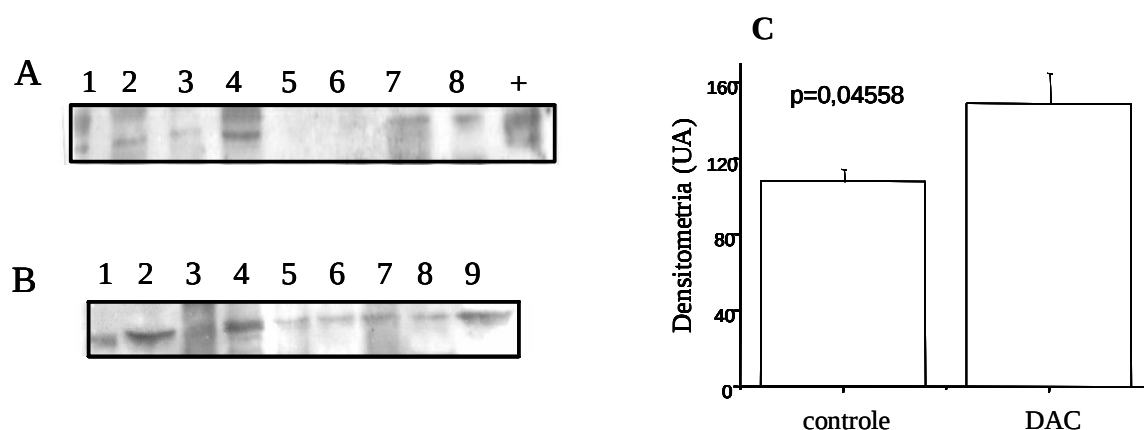


Figura 3 – Análise por Western blotting da QSOX em micropartículas
Expressão de QSOX em micropartículas (30 µg) isoladas de plasma de pessoas sem (A, n=8) e com (B, n=9) doença coronariana por Western blotting. Como controle positivo (+), foi utilizado soro fetal bovino. As bandas (~66kDa) foram densitometradas pelo software ImageJ e analisadas estatisticamente (teste t) (C).

4.3. Isolamento de plaquetas e micropartículas de plaquetas

Após inúmeras tentativas sem sucesso de isolamento de plaquetas em estado não ativado, optou-se utilizar bolsas de plaqueta. O rendimento médio obtido de micropartículas foi de $6,31 \pm 1,28$ µg proteína/ 10^9 plaquetas quando ativadas com trombina e $10,71 \pm 4,80$ µg proteína/ 10^9 plaquetas quando ativadas com ionóforo, não sendo significante estatisticamente ($p=0,057$).

4.4. Expressão de QSOX em micropartículas de plaquetas e lisado de plaquetas

Para analisar se a plaqueta poderia estar contribuindo com QSOX no *pool* de micropartículas plasmáticas, micropartículas de plaqueta foram preparadas *in vitro*, através de ativação por ionóforo de cálcio e trombina, um ativador fisiológico. A expressão de QSOX em micropartículas de plaquetas foi estudada por Western

blotting. A fig. 4 mostra que ambos os estímulos produziram micropartículas contendo QSOX em quantidades semelhantes (densitometrias médias de 1389 ± 747 e 1213 ± 668 , respectivamente, $n=3$). Lisados totais de plaqueta também foram analisados e apresentaram grandes quantidades de QSOX (densitometria média de 2090, $n=2$), indicando que durante o processo de formação das micropartículas apenas uma parte da QSOX da plaqueta é compartimentalizada na vesícula nascente.

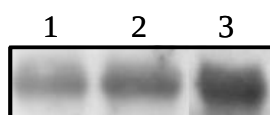


Figura 4 – QSOX em micropartículas

Western blotting representativo da expressão de QSOX em micropartículas de plaquetas ($n=3$) produzidas por ativação plaquetária com ionóforo de cálcio A23187 (1), trombina (2) e em lisado de plaquetas (3) ($n=2$).

4.5. Efeitos biológicos de micropartículas de plaquetas

Devido à presença inequívoca de micropartículas de plaquetas na circulação sanguínea e ao aumento de sua concentração em diversas situações patológicas (JY, et al, 1992; NOMURA, et al, 1994, 1995, 2000; COMBES, et al, 1999; HUGEL, et al, 1999; MALLAT, et al, 2000; JOOP, et al, 2001; OGURA, et al, 2001; VAN WIJK, et al, 2002), seus efeitos biológicos, principalmente em células com as quais as micropartículas estejam em contato, foram analisados. Um possível efeito seria a indução de estresse oxidativo em células vasculares, particularmente quando ocorre aumento no número de micropartículas. Para abordar esta questão experimentalmente, células musculares lisas de aorta de rato foram tratadas com

micropartículas de plaquetas por 1 e 3 h. Ao final destes períodos, as células foram analisadas quanto à relação GSH/GSSG. Os resultados preliminares estão mostrados na tabela 1, a qual sugere, que a incubação das células com micropartículas por 1 h induz um aumento na relação GSH/GSSG quando comparada com células controles neste mesmo intervalo de tempo. Após 3 h de incubação, o aumento na relação GSH/GSSG já não foi tão expressivo como em 1 h. Consistentemente, a incubação com peróxido de hidrogênio por 1 h levou a um estado mais oxidativo, como observado pela diminuição na relação GSH/GSSG em relação ao controle de 1 h. E finalmente, para caracterizar o estado redox da micropartícula em si, estas também foram analisadas quanto à relação GSH/GSSG. O valor obtido sugere que, de fato, as micropartículas são fortemente redutoras (tabela 1).

Tratamento	GSH/GSSG
Controle negativo 1h	0,767
PMP 1h	1,47
Controle negativo 3h	0,434
PMP 3h	0,527
H ₂ O ₂ 1h	0,544
PMP	26,4

Tabela 1 – Efeito das microparticulas sobre a relação GSH/GSSG.

Efeito das micropartículas de plaquetas (PMP) sobre a relação GSH/GSSG em células musculares lisas de aorta de rato, determinadas por HPLC e detecção eletroquímica (n=1). As células foram tratadas com PMP 30 µg/mL ou PBS (controles) por 1 ou 3 h, ou com 0,5 mM peróxido de hidrogênio por 1h. As PMP também foram analisadas.

Outro efeito analisado foi a capacidade das micropartículas de plaquetas induzirem um aumento na taxa de proliferação de células mesenquimais. Para isso, as células carenciadas foram incubadas com as micropartículas por 4-5 dias, e o crescimento celular foi determinado pelo ensaio do MTT. A fig. 5 mostra que as micropartículas induziram um aumento na proliferação de células mesenquimais, o qual apesar de não ter sido muito grande, foi estatisticamente significativo em relação ao controle. O fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) também apresentou efeito semelhante, embora não significativo. O soro bovino fetal, utilizado como controle positivo, mostra que a metodologia estava de acordo com o esperado da sua mitogenicidade.

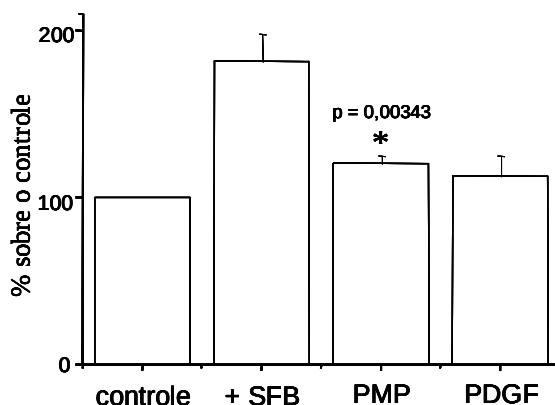


Figura 5 – Efeito das microparticulas sobre a proliferação celular

Efeito das micropartículas de plaqueta (PMP) sobre a proliferação de células mesenquimais de medula óssea humana. As células carenciadas foram incubadas com meio com PBS (controle), 10% soro bovino fetal (SFB), 20 μ g/mL PMP ou 20 ng/mL PDGF. Após 5 dias em cultivo, foram analisadas pelo método do MTT. As PMP induziram um aumento estatisticamente significativo na média da proliferação celular em relação ao controle.

5. Discussão

O reconhecimento da existência de fragmentos celulares com atividade pró-coagulante no sangue em condições fisiológicas e patológicas levou ao surgimento de uma nova área de investigação. De fato, a literatura de micropartículas tem recebido cada vez mais atenção nos últimos anos, devida à percepção de que elas não são apenas fragmentos celulares inertes, produzidos durante a apoptose ou ativação celular, mas também podem exercer efeitos profundos de acordo com sua composição protéica e lipídica, e com o tipo celular com as quais elas interagem. Vários autores têm relatado múltiplas respostas celulares ou teciduais frente às diferentes micropartículas. De um modo geral, está claro que elas possuem um potencial pró-coagulante, devido à exposição de fosfatidilserina na sua superfície, e em alguns casos por expressarem o fator tecidual (SCHECTER, et al, 2000). Além disso, representam uma fonte para uma situação pró-inflamatória (DIAMANT, et al, 2004; MOREL, et al, 2004). Entretanto, apesar deste montante de dados, ainda falta muito para o entendimento das funções das micropartículas. E é neste contexto que se inseriu a primeira questão levantada na ocasião da proposição do projeto, particularmente avaliar se micropartículas circulantes (em condições fisiológicas e patológicas) poderiam estar atuando como microambientes redox, ao transportarem enzimas redox, como a NAD(P)H oxidase, PDI, e possivelmente a QSOX, para sítios teciduais onde elas fossem necessárias. Esta hipótese fora baseada em alguns dados do grupo do Dr. Francisco Laurindo (Incor-FMUSP): o *shedding* de uma atividade NAD(P)H oxidase no meio líquido de artérias lesadas por catéter-balão *ex vivo* sugeria que esta enzima pudesse estar presente nas micropartículas liberadas pelo processo da injúria no vaso (DANTAS, 2002). Nesta linha, recentemente foi demonstrado que um tipo específico de micropartículas de plaquetas, os exossomos,

possuem subunidades e atividade da NAD(P)H oxidase (JANISZEWSKI, et al, 2004). Também, micropartículas de pacientes submetidos a implante de *stent* coronário, um cenário clínico de lesão arterial, apresentavam atividade diaforase, parcialmente inibida por DPI e catalase (PEDRO, 2003). Além disso, a dependência da atividade da NAD(P)H oxidase pelo equilíbrio tiol-dissulfeto (JANISZEWSKI, et al, 2000) levava à busca de proteínas que pudessem controlar tal equilíbrio, como de fato recentemente demonstrado para a PDI em células musculares lisas (JANISZEWSKI, et al, 2005). Interessantemente, o *shedding* de PDI (CHEN, DETWILER, ESSEX, 1995), assim como recentes trabalhos demonstrando o tráfego de tiol-oxidoreduases do citoplasma para a membrana plasmática durante a ativação plaquetária (JORDAN, et al, 2005) sugerem um papel importante de tiol-oxidoreduases neste processo e possivelmente nas micropartículas de plaquetas. Como a PDI pode ser um substrato para a QSOX (HOOBER, et al, 1999), micropartículas de pacientes portadores de doenças coronarianas crônicas e de pessoas sem doença coronariana foram isoladas e comparadas quanto à quantidade de QSOX. Inicialmente, porém, analisou-se a origem das micropartículas circulantes. Os dados (fig. 1) mostram que elas têm origem majoritariamente plaquetária e de células endoteliais, conforme já descrito na literatura (MOREL, et al, 2004). A ausência de marcação para CD45 sugere que elas não sejam derivadas de leucócitos. Contudo, uma investigação sobre a funcionalidade do anticorpo anti-CD45 empregado deve ser realizada para se descartar a hipótese de que a ausência de marcação represente inativação do anticorpo. Além disso, os resultados corroboram dados da literatura, ao mostrar que há um aumento no número de micropartículas em pessoas com *diabetes mellitus*, aterosclerose e doença renal, em relação a pessoas saudáveis (BOLTON, DOWNS, VICTORY, DWIGHT, TOMSON,

MACKNESS, PINKEY, 2001; MERCIER, BRANGER, VECINA, SABADANI, BERLAU, DAUZAT, FOURCADE, GRIS, 2001; PRESTON, JY, JYMENEZ, MAURO, HORSTMAN, VALLE, AIME, AHN, 2002; SABATIER, DARMON, HUGEL, COMBES, SANMARCO, VELUT, ARNOUX, CHARPIOT, FREYSSINET, OLIVER, SAMPOL, DIGNAT, 2002; MULLER, KLOCKE, ALEX, KOTZSCH, LUTHER, MORGENSTERN, ZIESENISS, ZAHLER, PREISSNER, ENGELMANN, 2003). Entretanto, é importante ressaltar que em nossos estudos, a média de idade nos dois grupos analisados foi diferente, ou seja, tratavam-se de dois grupos não homogêneos. Ainda não foi demonstrado que o envelhecimento por si é um fator que eleve o número de micropartículas, mas esta é uma suposição bastante razoável.

Para análise de expressão da QSOX nestas amostras, inicialmente tentou-se empregar a citometria de fluxo. Para isso, as micropartículas foram permeabilizadas, já que a QSOX não é proteína de superfície, e incubadas com o anticorpo anti-QSOX. Nenhuma marcação de QSOX foi obtida com esta metodologia, possivelmente porque este anticorpo não fora capaz de se ligar a proteína nativa, ou porque a QSOX não estaria presente em quantidades detectáveis (fig. 2). Portanto, utilizou-se Western blotting para responder esta questão. Utilizando o mesmo anticorpo, conseguimos mostrar que as micropartículas circulantes do grupo controle possuem QSOX, mas em menor concentração do que as micropartículas de pacientes coronarianos. A diferença obtida entre os dois grupos foi estatisticamente significativa (fig. 3).

Os dados obtidos até aqui indicam que o plasma de pacientes coronarianos apresenta mais micropartículas do que os controles sem a doença, e que as dos doentes possuem mais QSOX. De acordo, as micropartículas de pacientes

submetidos a implante com *stent* apresentam PDI e QSOX, mas interessante não apresentaram NAD(P)H oxidase (PEDRO, 2003). Desta forma, estes dados têm apontado para um papel das micropartículas na sinalização redox relacionada a resposta vascular a lesão.

Para investigar melhor este sistema, optou-se então por estudar apenas as micropartículas de plaquetas, que representam em número a maior proporção no *pool* das micropartículas circulantes. Assim, foram selecionados dois ativadores de plaquetas, o ionóforo de cálcio A23187 e um agonista fisiológico, a trombina, para estimular a produção de micropartículas. O maior rendimento de micropartículas obtido pela ativação plaquetária com ionóforo de cálcio em relação à trombina está de acordo com a literatura (TANS, ROSING, THOMASSEN, HEEB, ZWALL, GRIFFIN, 1991). As micropartículas foram analisadas por Western blotting quanto à expressão da QSOX. A literatura mostra que diferentes agonistas produzem micropartículas de plaquetas com diferentes proporções de suas proteínas. No caso da QSOX, o resultado mostrou que seus níveis nas micropartículas não variaram quando as plaquetas foram ativadas com ionóforo ou com a trombina. Lisados de plaquetas foram também analisados e demonstram que QSOX não está concentrada nas micropartículas, sugerindo que uma parte da QSOX continue no citossol (fig. 4).

O papel da QSOX ainda não está esclarecido. Acredita-se que por introduzir pontes dissulfetos e estar presente no caminho de secreção protéica, ela esteja envolvida no dobramento de proteínas (THORPE, et al, 2002; COPPOCK, et al, 2005). De fato, vários trabalhos têm demonstrado expressão acentuada em tecidos secretores, como placenta (COPPOCK, et al, 2005). A presença de QSOX nas micropartículas não pode ser considerada neste contexto, uma vez que nem plaquetas nem tampouco micropartículas de plaquetas devem estar produzindo,

dobrando e secretando proteínas. Além disso, Pedro (PEDRO, 2003) demonstrou que micropartículas de doentes coronarianos não apresentavam subunidades da NAD(P)H oxidase, mas apresentavam PDI, que pode ser um dos substratos da QSOX. Assim, caso a atuação da QSOX seja nas micropartículas, esta pode estar trabalhando conjuntamente com a PDI, reoxidando-a. Vários trabalhos têm descrito funções importantes da PDI na plaqueta. Por exemplo, tem sido demonstrado que a integrina alfa II b beta 3 é ativada pela isomerização redutiva de suas pontes dissulfeto na região rica em cisteína extracelular da subunidade beta, um processo que poderia estar sob o controle da PDI (YAN, et al, 2000, 2001). A PDI já foi identificada na superfície de plaquetas (ESSEX, et al, 1995) e inibidores de PDI foram capazes de inibir a ativação da integrina alfa II b beta 3 (ESSEX, et al, 1999). Contudo, sua atuação parece ser mais isomerizando e reduzindo, o que tornaria a PDI oxidada, não podendo então, ser substrato para a QSOX. Alternativamente, a QSOX poderia estar atuando diretamente, sem a mediação da PDI, nas proteínas que necessitam de pontes dissulfetos. Ela poderia interagir com o complexo pró-trombinase mantendo oxidados os resíduos de cisteínas presentes em proteínas da cascata de coagulação, modulando sua atividade. O fator VII apresenta duas cisteínas que precisam estar oxidadas formando uma ponte dissulfeto intramolecular para que seja plenamente ativo (HIGASHI, MATSUMOTO, IWANAGA, 1997). Além disso, a capacidade das micropartículas circularem longas distâncias permite propormos que seus alvos possam estar distantes de seu sítio de produção. Neste raciocínio, a micropartícula não utiliza a QSOX, mas apenas transporta-a para seu local de ação, possivelmente junto com a PDI. Para distinguir as hipóteses acima mencionadas, novos experimentos deverão ser realizados.

Em relação aos efeitos celulares das micropartículas, vários trabalhos têm relatado que micropartículas podem disparar diferentes vias de sinalização e ativar células vasculares e hematopoiéticas (BAJ-KRZYWORZEKA, et al, 2002). Analisaram-se dois efeitos das micropartículas de plaquetas em células em cultura. No primeiro ensaio, buscou-se responder se essas micropartículas poderiam ter efeito mitogênico sobre células mesenquimais. Esta questão fora motivada por alguns trabalhos: Weber (WEBER, et al, 2000) mostrava que micropartículas de plaquetas poderiam ter um papel aterogênico ao estimular a proliferação de células musculares lisas; Baj-Krzyworzeka e colaboradores (BAJ-KRZYWORZEKA, et al, 2002) descreveram que micropartículas de plaquetas melhoravam o transplante de medula, e que ativavam vias de MAPK, induzindo a proliferação, adesão e sobrevivência de células hematopoiéticas, e também por um trabalho recente que mostrava que uma maneira mais segura de expandir células mesenquimais humanas para posterior uso em transplante seria adicionando ao meio de cultivo lisado plaquetário do mesmo doador (DOUCET, ERNOU, ZHANG, LLENSE, BEGOT, HOLY, LATAILLADE, 2005). Assim, analisou-se se as micropartículas de plaqueta poderiam ser também mitogênicas para células mesenquimais. Os resultados demonstram que de fato elas estimulam estas células a proliferarem, embora de modo menos eficiente que o mitógeno clássico soro fetal bovino (fig. 5). Não foi possível investigar se o efeito observado teria a contribuição do PDGF, visto que células mesenquimais expressam receptor para PDGF (FIEDLER, ETZEL, BRENNER, 2004) e nossos resultados também mostram que este fator tem efeito proliferativo (fig. 5), embora não significativo. Uma contaminação de PDGF nas suspensões de micropartículas foi descartada, uma vez que nosso protocolo de preparo inclui uma etapa de lavagem do *pellet* de micropartículas. Assim, uma

próxima etapa do trabalho é investigar se as micropartículas de plaquetas aprisionam PDGF.

Um segundo efeito estudado foi a indução de um estresse oxidativo em células musculares lisas em contato com micropartículas de plaqueta. A questão era saber se as micropartículas, por serem pró-trombóticas e pró-aterogênicas pudessem também causar um estresse oxidativo, mesmo que transiente. Para isso, analisou-se a relação GSH/GSSG. O par glutathiona reduzida e glutathiona oxidada, por estar presente em concentrações muito altas no ambiente intracelular, particularmente no citossol, representa o maior tampão redox intracelular, sensível a alterações no estado redox (SCHAFER, BUETTNER, 2001). Os dados obtidos preliminarmente mostram que as micropartículas causam uma alteração redox intracelular, mas contrariamente ao esperado, no sentido mais redutivo, ou seja, aumentando a relação determinada (tabela 1). A alteração foi mais intensa após 1 hora (92% aumento) do que após 3 horas de exposição (21% aumento), indicando um efeito redutivo e mais a curto prazo. A validação metodológica foi considerada ao se determinar o efeito de um agente oxidativo clássico, o peróxido de hidrogênio, nos níveis de GSH/GSSG. Neste caso, foi observado que o peróxido de hidrogênio diminui a relação em 28%, indicando o estresse oxidativo esperado. Quando somente a amostra de micropartículas foi analisada, verificou-se que estas sozinhas apresentam um teor muito alto de GSH e muito baixo de GSSG, o que as tornam extremamente redutoras (tabela 1). Um fator limitante nesses estudos foi o fato de não se poder distinguir se as células musculares lisas tratadas com as micropartículas alteraram seu conteúdo de GSH e GSSG, ou se as micropartículas transferiram seu conteúdo de GSH às células. Para se responder esta questão, uma alternativa seria repetir esses ensaios modulando as concentrações de GSH nas

células, utilizando butionina sulfoximina e N-acetilcisteína, os quais respectivamente bloqueiam e estimulam a síntese de glutathione (KIM, KIM, KNOW, LEE, CHUNG, JEONG, MIN, 2004).

Os dados obtidos, inicialmente inesperados, são coerentes com os valores de potenciais redox descritos para células em diferentes estados. Células em proliferação rápida, lenta, em quiescência celular, em diferenciação celular e apoptose apresentam potenciais redox progressivamente oxidantes (SCHAFER, et al, 2001). Assim, apesar dos ensaios biológicos das micropartículas terem sido realizados com diferentes tipos celulares, os dados podem ser racionalizados e sugerem que as micropartículas de plaquetas, por apresentarem alto teor de glutathione reduzida em relação à glutathione oxidada, transferem os equivalentes redutores diretamente ou indiretamente para as células com quem estão em contato, alterando seu potencial redox no sentido mais redutivo e induzindo um aumento na taxa de proliferação celular. Após este rápido aumento na relação GSH/GSSG (cerca de 1 h), os níveis destes dois compostos tendem a ser restaurados para atingirem os valores de GSH/GSSG próximos aos basais (cerca de 3 h) (fig. 6).

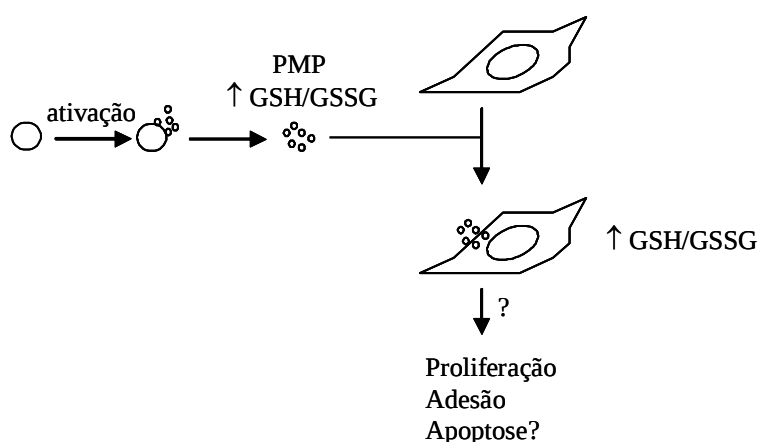


Figura 6 – Esquema representativo da atuação das micropartículas
Esquema representativo da atuação das micropartículas de plaquetas sobre a modulação fenotípica celular. Após ativação plaquetária, as micropartículas

produzidas (contendo alto teor de glutathione) interagem com a célula (mesenquimal, muscular lisa, etc) e modulam seu estado redox, levando-a a diferentes fenótipos.

Embora mais dados sejam necessários para se poder propor um modelo mais completo e conclusivo de ação das micropartículas, os dados obtidos podem explicar alguns dos efeitos das PMP em células, ao mostrar que elas podem ser consideradas como indutoras de um estado mais redutivo *in vitro*. Um contato sustentado das micropartículas com células, como ocorre em diversas situações patológicas onde já está documentado um aumento no número do *pool* de micropartículas circulantes, possivelmente pode ocasionar outros efeitos.

6. Conclusão

Este trabalho:

- Corrobora dados da literatura, que o plasma de pacientes portadores de doença coronariana apresenta mais micropartículas circulantes que os de não –portadores.
- Mostra por Western blotting que: (i) micropartículas circulantes de pacientes portadores de doença coronariana expressam mais QSOX do que as do grupo controle; (ii) micropartículas de plaquetas produzidas por dois diferentes agonistas (ionóforo de cálcio e trombina), assim como lisado de plaquetas, expressam níveis de QSOX.
- Indica que micropartículas de plaquetas produzidas por ionóforo de cálcio estimulam a proliferação de células mesenquimais, determinada pelo método do MTT.
- Sugere, através de resultados preliminares de HPLC e detecção eletroquímica, que micropartículas de plaquetas produzidas por ionóforo de cálcio são extremamente redutoras, e elevam a relação GSH/GSSG uma hora após o tratamento.

7. Referências Bibliográficas

1. BAJ-KRZYWORZEKA, M.; MAJKA, M.; PRATICO, D.; RATAJCZAK, J.; VILAIRE, G.; KIJOWSKI, J.; RECA, R.; JANOWSKA-WIECZOREK, A.; RATA CZAK, M.Z. **Platelet-derived microparticles stimulate proliferation, survival, adhesion, and chemotaxis of hematopoietic cells.** Exp. Hematol., v. 30, p. 450-459, 2002.
2. BARRY, O.P.; PRATICO, D.; LAWSON, J.A.; FITZGERALD, G.A. **Transcellular activation of platelets and endothelial cells by bioactive lipids in platelet microparticles.** J. Clin. Invest., v. 99, p. 2118-2127, 1997.
3. BARRY, O.P.; FITZGERALD, G.A. **Mechanisms of cellular activation by platelet microparticles.** Thromb. Haemost., v. 82, p. 794-800, 1999.
4. BENAYOUN, B.; ESNARD-FÈVE, A.; CASTELLA, S.; COURTY, Y.; ESNARD, F. **Rat seminal vesicle FAD-dependent sulfhydryl oxidase. Biochemical characterization and molecular cloning of a member of the new sulfhydryl oxidase/quiescin Q6 gene family.** J. Biol. Chem., v. 276, p. 13830-13837, 2001.
5. BERNAL-MIZRACHI, L.; JY, W.; JIMENEZ, J.J.; PASTOR, J.; MAURO, L.M.; HORSTMAN, L.L.; de MARCHENA, E.; AHN, Y.S. **High levels of circulating endothelial microparticles in patients with acute coronary syndrome.** Am. Heart. J., v. 145, p. 962-970, 2003.
6. BOLTON, C.H.; DOWNS, L.G.; VICTORY, J.G.G.; DWIGHT, J.F.; TOMSON, C.R.V.; MACKNESS M.I.; PINKNEY, J. H. **Endothelial dysfunction in chronic renal failure: roles of lipoprotein oxidation and pro-inflammatory cytokines.** Nephrol Dial Transplant, v. 16, p. 1189-1197, 2001.
7. BON, K.; ADAMI, P.; ESNARD, F.; JOUVENOT, M.; VERSAUX-BOTTERI, C. **Olfactory epithelium destruction by ZnSO₄ modified sulfhydryl oxidase expression in mice.** Neuroreport., v. 8, p. 179-182, 2005.
8. BOULANGER, C.M.; SCOAZEC, A.; EBRAHIMIAN, T.; HENRY, P.; MATHIEW, E.; TEDGUI, A.; MALLAT, Z. **Circulating microparticles from patients with myocardial infarction cause endothelial dysfunction.** Circulation, v. 104, p. 2649-2652, 2001.
9. BRADFORD, M.M. **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding.** Anal. Biochem., v. 72, p. 248-254, 1976.

10. BRUNETTI, M.; MARTINELLI, N.; MANARINI, S.; MASCETRA, N.; MUSIANI, P.; CERLETTI, C.; AIELLO, F.B.; EVANGELISTA, V. **Polymorphonuclear leukocyte apoptosis is inhibited by platelet released mediators. Role of TGF β .** Thromb. Haemost., v. 84, p. 478-483, 2000.
11. CHEN, K.; DETWILER, T.C.; ESSEX, D.W. **Characterization of protein disulphide isomerase released from activated platelets.** Br J Haematol., v. 90, p. 425-431, 1995.
12. CHLOPICKI, S.; OLZANECKI, R.; JANISZEWSKI, M.; LAURINDO, F.R.; PANZ, T.; MIEDZOBRODZKI, J. **Functional role of NAD(P)H oxidase in activation of platelets.** Antioxid. Redox Signal, v. 6, p. 691-698, 2004.
13. COMBES, V.; SIMON, A.C.; GRAU, G.E.; ARNOUX, D.; CAMOIN, L.; SABATIER, F.; MUTIN, M.; SANMARCO, M.; SAMPOL, J.; DIGNAT-GEORGE, F. **In vitro generation of endothelial microparticles and possible prothrombotic activity in patients with lupus anticoagulant.** J. Clin. Invest., v. 104, p. 93-102, 1999.
14. COPPOCK, D.L.; CINA-POPPE, D.; GILLERAN, S. **The quiescin Q6 gene (QSCN6) is a fusion of two ancient gene families: thioredoxin and ERV1.** Genomics, v. 54, p. 460-468, 1998.
15. COPPOCK, D.L.; KOPMAN, C.; SCANDALIS, S.; GILLERAN, S. **Preferential gene expression in quiescent human lung fibroblasts.** Cell Growth & Differ., v. 4, p. 483-493, 1993.
16. COPPOCK, D.L.; THORPE, C. **Multi-domain flavin-dependent sulfhydryl oxidase.** Antioxid. Redox Signal. In press, 2005.
17. DANTAS, K. E. **Caracterização inicial da estrutura responsável pela atividade NAD(P)H/lucigenina redutase secretada pela parede vascular após lesão.** Relatórios 1 e 2 de Iniciação Científica, FAPESP, 2002.
18. DE LA MOTTE, R.S.; WAGNER, F.W. **Aspergillus niger sulfhydryl oxidase.** Biochemistry, v. 26, p. 7363-7371, 1987.
19. DENIZOT, F.; LANG, R. **Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability.** J. Immunol Methods, v. 89, p. 271-277, 1986.

20. DIAMANT, M.; TUSHUIZEN, M.E.; STURK, A.; NIEUWLAND, R. **Cellular microparticles: new players in the field of vascular disease?** Eur. J. Clin. Invest., v. 34, p. 392-401, 2004.
21. DOUCET, C.; ERNOU, I.; ZHANG, Y.; LLENSE, J.R.; BEGOT, L.; HOLY, X.; LATAILLADE, J.J. **Platelet lysates promote mesenchymal stem cell expansion: A safety substitute for animal serum in cell-based therapy applications.** J Cell Physiol., v. 205, p. 228-236, 2005.
22. ESSEX, D.W.; CHEN, K.; SWIATKOWSKA, M. **Localization of protein disulfide isomerase to the external surface of the platelet plasma membrane.** Blood, v. 86, p. 2168-2173, 1995.
23. ESSEX, D.W.; LI, M. **Protein disulphide isomerase mediates platelet aggregation and secretion.** Br J Haematol., v. 104, p. 448-454, 1999.
24. ESSEX, D.W.; LI, M. **Redox control of platelet aggregation.** Biochemistry, v. 14, p. 129-136, 2003.
25. FIEDLER, J.; ETZEL, N.; BRENNER, R.E. **To go or not to go: Migration of human mesenchymal progenitor cells stimulated by isoforms of PDGF.** J Cell Biochem., v. 93, p. 990-998, 2004.
26. FORLOW, S.B.; McEVER, R.P.; NOLLERT, M.U. **Leukocyte-leukocyte interactions mediated by platelet microparticles under flow.** Blood, v. 95, p. 1317-1323, 2000.
27. FOURCADE, O.; SIMON, M.F.; VIODE, C.; RUGANI, N.; LEBALLE, F.; RAGAB, A.; FOURNIE, B.; SARDA, L.; CHAP, H. **Secretory phospholipase A2 generates the novel lipid mediator lysophosphatidic acid in membrane microvesicles shed from activated cells.** Cell, v. 80, p. 919-927, 1995.
28. GEMMELL, C.H.; SEFTON, M.V.; YEO, E.L. **Platelet-derived microparticle formation involves glycoprotein IIb-IIIa. Inhibition by RGDS and a Glanzmann's thrombasthenia defect.** J. Biol. Chem., v. 268, p. 14586-14589, 1993.
29. GILBERT, G.E.; SIMS, P.J.; WIEDMER, T.; FURIE, B.C.; SHATTIL, S.L. **Platelet-derived microparticles express high affinity receptors for factor VIII.** J. Biol. Chem., v. 266, p. 17261-17268, 1991.
30. HIGASHI, S.; MATSUMOTO, N.; IWANAGA, S. **Conformation of factor VIIa stabilized by a labile disulfide bond (Cys-310-Cys-329) in the protease domain**

is essential for interaction with tissue factor. J. Biol.Chem., v. 272, p. 25724-25730, 1997.

31. HOLME, P.A.; ORVIM, U.; HAMERS, M.J.; SOLUM, N.O.; BROSSTAD, F.R.; BARSTAD, R.M.; SAKARIESSEM, K.S. **Shear-induced platelet activation and platelet microparticle formation at blood flow conditions as in arteries with a severe stenosis.** Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., v. 17, p. 646-653, 1997.

32. HOOBER, K.L.; SHEASLEY, S.L.; GILBERT, H.F.; THORPE, C. **Sulfhydryl oxidase from egg white. A facile catalyst for disulfide bond formation in proteins and peptides.** J. Biol. Chem., v. 274, p. 22147-22150, 1999.

33. HOOBER, K.L.; JONEJA, B.; WHITE 3rd, H. B.; THORPE, C. **A sulfhydryl oxidase from chicken egg.** J. Biol. Chem., v. 271, p. 30510-30516, 1996.

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

35. HUGEL, B.; SOCIE, G.; VU, T.; TOTI, F.; GLUCKMAN, E.; FREYSSINET, J.M.; SCROBOHACI, M.L. **Elevated levels of circulating procoagulant microparticles in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and aplastic anemia.** Blood, v. 93, p. 3451-3456, 1999.

36. JANISZEWSKI, M.; PEDRO, M.A.; SCHEFFER, R.C.; van ASSELDONK, J.H.; SOUZA, L.C.; da LUZ, P.L.; AUGUSTO, O.; LAURINDO, F.R. **Inhibition of vascular NADH/NAD(P)H oxidase activity by thiol reagents: lack of correlation with cellular glutathione redox status.** Free Radic Biol Med., v. 29, p. 889-899, 2000.

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

38. JANISZEWSKI, M.; LOPES, L.R.; CARMO, A. O.; PEDRO, M.A ; BRANDES, R.P.; SANTOS, C. X.; LAURINDO, F.R. **Regulation of NAD(P)H oxidase by associated protein disulfide isomerase in vascular smooth muscle cells.** J Biol Chem., in press, 2005.

39. JIN, M.; DRWAL, G.; BOURGEOIS, T.; STALTZ, J.; WU, H.M. **Distinct proteoma features of plasma microparticles**. *Proteomics*, v. 5, p. 1940-1952, 2005.
40. JOOP, K.; BERCKMANS, R.J.; NIEUWLAND, R.; BERKHOUT, J.; ROMIJN, F.P.; HACK, C.E.; STURK, A. **Microparticles from patients with multiple organ dysfunction syndrome and sepsis support coagulation through multiple mechanisms**. *Thromb. Haemost.*, v. 85, p. 810-820, 2001.
41. JORDAN, P.A.; STEVENS, J.M.; HUBBARD, G.P.; BARRET, N.E.; SAGE, T.; AUTHI, K.S.; GIBBINS, J.M. **A role for the thiol isomerase protein ERP5 in platelet function**. *Blood*, v. 105, p. 1500-1507, 2005.
42. JY, W.; HORSTMAN, L.L.; ARCE, M.; AHN, Y.S. **Clinical significance of platelet microparticles in autoimmune thrombocytopenias**. *J. Lab. Clin. Med.*, v. 119, p. 334-345, 1992.
43. KIM, J.-M.; KIM, H.; KWON, S.B.; LEE, S.Y.; CHUNG, S.C.; JEONG, D.W.; MIN, B.M. **Intracellular glutathione status regulates mouse bone marrow monocyte-derived macrophage differentiation and phagocytic activity**. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 325, p. 101-108, 2004.
44. KIRSCHENLOHR, H. L.; METCALFE, J. C.; GRAINGER, D. J. **Cultures of proliferating vascular smooth muscle cells from adult human aorta**. In: *Methods in Molecular Medicine: Human cell culture protocols*. Ed. Jones, G.E., Humana Press, Totowa, NJ, 1996.
45. LAEMMLI, U. K. **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4**. *Nature*, v. 227, p. 680-685, 1970.
46. LEEUWENBERG, J.F.; SMEETS, E.F.; NEEFJES, J.J.; SHAFFER, M.A.; CINEK, T.; JEUNHOMME, T.M.; AHERN, T.J.; BUURMAN, W.A. **E-selectin and intercellular adhesion molecule-1 are released by activated human endothelial cells in vitro**. *Immunology*, v. 77, p. 543-549, 1992.
47. MAIRET-COELLO, G.; TURY, A.; ESNARD-FEVE, A.; FELLMANN, D.; RISOLD, P.Y.; GRIFFOND, B. **FAD-linked sulfhydryl oxidase QSOX: topographic, cellular, and subcellular immunolocalization in adult rat central nervous system**. *J. Comp. Neurol.*, v. 473, p. 334-363, 2004.
48. MAIRET-COELLO, G.; TURY, A.; FELLMANN, D.; JOUVENOT, M.; GRIFFOND, B. **Expression of SOx-2, a member of the FAD-dependent**

sulfhydryl oxidase/quiescin Q6 gene family, in rat brain. *Neuroreport*, v. 13, p. 2049-2051, 2002.

49. MAIRET-COELLO, G.; TURY, A.; FELLMANN, D.; RISOLD, P.Y.; GRIFFOND, B. **Ontogenesis of the sulfhydryl oxidase QSOX expression in rat brain.** *Neurol.*, v. 18, p. 403-417, 2005.

50. MALLAT, Z.; BENAMER, H.; HUGEL, B.; BENESSIANO, J.; STEG, P.G.; FREYSSINET, J.M.; TEDGUI, A. **Elevated levels of shed membrane microparticles with procoagulant potential in the peripheral circulating blood of patients with acute coronary syndromes.** *Circulation*, v. 101, p. 841-843, 2000.

51. MARESCA, M.; COLAO, C.; LEONCINI, G. **Generation of hydrogen peroxide in resting and activated platelets.** *Cell. Biochem. Funct.*, v. 10, p. 79-85, 1992.

52. MARTIN, S.; TESSE, A.; HUGEL, B.; MARTINEZ, C.; MOREL, O.; FREYSSINET, J.M.; ANDRIANTSITOHAINA, R. **Shed membrane particles from T lymphocytes impair endothelial function and regulate endothelial protein expression.** *Circulation*, v. 109, p. 1653-1659, 2004.

53. MATSUBA, S.; SUGA, Y.; ISHIDOH, K.; HASHIMOTO, Y.; TAKAMORI, K.; KOMINAMI, E.; WILHELM, B.; SEITZ, J.; OGAWA, H. **Sulfhydryl oxidase (SOX) from mouse epidermis: molecular cloning, nucleotide sequence, and expression of recombinant protein in the cultured cells.** *J. Dermatol. Sci.*, v. 30, p. 50-62, 2002.

54. MERCIER, E.; BRANGER, B.; VECINA, F.; SABADANI, B.; BERLAU, J.; DAUZAT, M.; FOURCADE, J.; GRIS, J.C. **Tissue factor coagulation pathway and blood cells activation state in renal insufficiency.** *Hematol. J.*, v. 2, p.18-25, 2001.

55. MIYAZAKI, Y.; NOMURA, S.; MIYAKE, T.; KAGAWA, H.; KITADA, C.; TANIGUCHI, H.; KOMIYAMA, Y.; FUJIMURA, Y.; IKEDA, Y.; FUKUHARA, S. **High shear stress can initiate both platelet aggregation and shedding of procoagulant containing microparticles.** *Blood*, v. 88, p. 3456-3464, 1996.

56. MIYOSHI, H.; UMESHITA, K.; SAKON, M.; IMAJOH-OHMI, S.; FUJITANI, K.; GOTOH, M.; OIKI, F.; KAMBAYASHI, J.; MONDEN, M. **Calpain activation in plasma membrane bleb formation during tert-butyl hydroperoxide-induced rat hepatocyte injury.** *Gastroenterology*, v. 110, p. 1897-1904, 1996.

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

58. MULLER, I.; KLOCKE, A.; ALEX, M.; KOTZSCH, M.; LUTHER, T.; MORGENSTERN, E.; ZIESENIS, S.; ZAHLER, S.; PREISSNER, K.; ENGELMANN, B. **Intravascular tissue factor initiates coagulation via circulating microvesicles and platelets.** *Faseb Journal express article* 10.1096/fje, v. 2, 2003.

59. MUSARD, J.F.; SALLOT, M.; DULIEU, P.; FRAICHARD, A.; ORDENER, C.; REMY-MARTIN, J.P.; JOUVENOT, M.; ADAMI, P. **Identification and expression of a new sulfhydryl oxidase Sox-3 during the cell cycle and the estrus cycle in uterine cells.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.* , v. 287, p. 83-91, 2001.

60. NIEUWLAND, R.; BERKMANS, J.R.; MCGREGOR, S.; BÖING, A.N.; ROMIJN, F.P.H.Th.M.; WESTENDORP, R.G.D. **Cellular origin and procoagulant properties of microparticles in meningococcal sepsis.** *Blood*, v. 95, p. 930-935, 2000.

61. NOIVA, R. **Protein disulfide isomerase: the multifunctional redox chaperone on the endoplasmic reticulum.** *Semin Cell Dev Biol.*, v. 10, p. 481-493, 1999.

62. NOMURA, S.; YANABU, M.; KIDO, H.; FUKUROI, T.; YAMAGUCHI, K.; SOGA, T.; NAGATA, H.; KOKAWA, T.; YASUNAGA, K. **Antiplatelet autoantibody-related microparticles in patients with idiopathic (autoimmune) thrombocytopenic purpura.** *Ann. Hematol.*, v. 62, p. 103-107, 1991.

63. NOMURA, S.; KOMIYAMA, Y.; MIYAKE, T.; MIYASAKI, Y.; KIDO, H.; SUZUKI, M.; KAGAWA, H.; YANABU, M.; TAKAHASHI, H.; FUKUHARA, S. **Amyloid beta-protein precursor-rich platelet microparticles in thrombotic disease.** *Thromb. Haemost.* , v. 72, p. 519-522, 1994.

64. NOMURA, S.; IMAMURA, A.; OKUNO, M.; KAMIYAMA, Y.; FUJIMURA, Y.; YKEDA, Y.; FUKUHARA, S. **Platelet-derived microparticles in patients with arteriosclerosis obliterans. Enhancement of high shear-induced microparticle generation by cytokines.** *Thromb. Res.*, v. 98, p. 257-268, 2000.

65. NOMURA, S.; SUZUKI, M.; KATSURA, K.; XIE, G.L.; MIYAZAKI, Y.; MIYAKE, T.; KIDO, H.; KAGAWA, H.; FUKUHARA, S. **Platelet-derived microparticles may influence the development of atherosclerosis in diabetes mellitus.** *Atherosclerosis*, v. 116, p. 235-240, 1995.

66. OGURA, H.; KAWASAKI, T.; TANAKA, H.; KOH, T.; TANAKA, R.; OZEKI, Y.; HOSOTSUBO, H.; KUWAGATA, Y.; SHIMAZU, T.; SUGIMOTO, H. **Activated platelets enhance microparticle formation and platelet-leukocyte interaction in severe trauma and sepsis.** *J. Trauma*, v. 50, p. 801-809, 2001.

67. OLAS, B.; WACHOWICZ, B.; SALUK-JUSZCZAK, J.; ZIELINSKI, T. **Effect of resveratrol, a natural polyphenolic compound, on platelet activation induced by endotoxin or thrombin.** *Thromb. Res.*, v. 107, p. 141-145, 2002.
68. OLAS, B.; WACHOWICZ, B.; SZEDCZUK, J.; SALUK-JUSZCZAK, J.; KACA, W. **The effect of resveratrol on the platelet secretory process induced by endotoxin or thrombin.** *Microbios*, v. 105, p. 7-13, 2001.
69. OSTROWSKI, M.C.; KISTLER, W.S. **Properties of a flavoprotein sulfhydryl oxidase from rat seminal vesicle secretion.** *Biochemistry*, v.19, p. 2639-2645, 1980.
70. PATEL, K.D.; ZIMMERMAN, G.A.; PRESCOTT, S.M.; McINTYRE, T. M. **Novel leukocyte agonists are released by endothelial cells exposed to peroxide.** *J. Biol. Chem.*, v. 267, p. 15168-15175, 1992.
71. PEDRO, M.A. **Micropartículas plasmáticas: um novo ambiente de sinalização redox transcelular no sistema vascular.** Tese de Doutorado, FMUSP, 2003.
72. PRESTON, R.A.; JY, W.; JYMENEZ, J.J.; MAURO, L.M.; HORSTMAN, L.L.; VALLE, M.; AIME, G.; AHN, Y.S. **Effects of severe hypertension on endothelial and platelet microparticles.** *Hypertension*, v. 41, p. 211-217, 2003.
73. SABATIER, F.; DARMON, P.; HUGEL, B.; COMBES, V.; SANMARCO, M.; VELUT, J.G.; ARNOUX, D.; CHARPIOT, P.; FREYSSINET, J.M.; OLIVER, C.; SAMPOL, J.; DIGNAT, G. F. **Type 1 and type 2 diabetic patients display different patterns of cellular microparticles.** *Diabetes*, v. 51, p. 2840-2845, 2002.
74. SATTA, N.; TOTI, F.; FEUGEAS, O.; BOHBOT, A.; DACHARY-PRINGENT, J.; ESCHWEGE, V.; HEDMAN, H.; FREYSSINET, J.M. **Monocyte vesiculation is a possible mechanism for dissemination of membrane-associated procoagulant activities and adhesion molecules after stimulation by lipopolysaccharide.** *J. Immunol.*, v. 153, p. 3245-3255, 1994.
75. SCHAFER, F. Q.; BUETTNER, G.R. **Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple.** *Free Radic. Biol. Med.*, v. 30, p. 1191-1212, 2001.
76. SCHECTER, A.D.; SPIRN, B.; ROSSIKHINA, M.; GIESEN, P.L.A.; BORDANOV, W.; FALLON, J.T.; FISHER, E.A.; SCHNAPP, L.M.; NEMERSON, Y.; TAUBMAN, M. B. **Release of active tissue factor by human arterial smooth muscle cells.** *Circ. Res.*, v. 87, p. 126-132, 2000.

77. SILJANDER, P.; CARPEN, O.; LASSILA, R. **Platelet-derived microparticles associate with fibrin during thrombosis.** Blood, v. 87, p. 4651-4663, 1996.
78. SIMS, P.J.; FAIONI, E.M.; WIEDMER, T.; SHATTIL, S.J. **Complement proteins C5b-9 cause release of membrane vesicles from the platelet surface that are enriched in the membrane receptor for coagulation factor Va and express prothrombinase activity.** J. Biol. Chem., v. 263, p. 18205-18212, 1988.
79. SIMS, P.J.; WIEDMER, T.; ESMON, C.T.; WEISS, H.J.; SHATTIL, S.J. **Assembly of the platelet prothrombinase complex is linked to vesiculation of platelet plasma membrane. Studies in Scott syndrome: an isolated defect in platelet procoagulant activity.** J. Biol.Chem., v. 264, p. 17049-17057, 1989.
80. TANS, G.; ROSING, J.; THOMASSEN, M.C.; HEEB, M.J.; ZWAAL, R.F.; GRIFFIN, J.H. **Comparison of anticoagulant and procoagulant activities of stimulated platelets and platelet-derived microparticles.** Blood, v.77, p. 2641-2648, 1991.
81. TAUBE, J.; McWILLIAM, N.; LUDDINGTON, R.; BYRNE, C.D.; BAGLIN, T. **Activated protein C resistance: effect of platelet activation, platelet-derived microparticles and atherogenic lipoproteins.** Blood, v. 93, p. 3792-3797, 1999.
82. THORPE, C.; HOOBER, K.L.; RAJE, S.; GLYNN, N.M.; BURNSIDE, J.; TURI, G.K.; COPPOCK, D.L. **Sulphydryl oxidase: emerging catalysts of protein disulfide bond formation in eukaryotes.** Arch. Biochem. Biophys., v. 405, p. 1-12, 2002.
83. TOTI, F.; SATTA, N.; FRESSINAUD, E.; MEYER, D.; FREYSSINET, J.M. **Scott syndrome, characterized by impaired transmembrane migration of procoagulant phosphatidylserine and hemorrhagic complications, is an inherited disorder.** Blood, v. 87, p. 1409-1415, 1996.
84. VAN WIJK, M.J.; VanBAVEL, E.; STURK, A.; NIEUWLAND, R. **Microparticles in cardiovascular diseases.** Cardiovasc. Res., v. 59, p. 277-287, 2003.
85. VAN WIJK, M.J.; NIEUWLAND, R.; BOER, K.; van der POST, J.A.; VanBAVEL, E.; STURK, A. **Microparticle subpopulations are increased in pre-eclampsia: possible involvement in vascular dysfunction?** Am. J. Obstet. Gynecol., v. 187, p. 450-456, 2002.
86. WEBER, A.A.; KÖPPEN, H.O.; SCHRÖR, K. **Platelet-derived microparticles stimulate coronary artery smooth muscle cell mitogenesis by a PDGF-independent mechanism.** Thromb. Res., v. 98, p. 461-466, 2000.

87. WEERHEIM, A.M.; KOLB, A.M.; STURK, A.; NIEUWLAND, R. **Phospholipid composition of cell-derived microparticles determined by one-dimensional high-performance thin-layer chromatography.** Anal Biochem., v. 302, p. 191-198, 2002.
88. WIEDMER, T.; SIMS, P.J. **Participation of protein kinases in complement C5b-9-induced shedding of platelet plasma membrane vesicles.** Blood, v. 78, p. 2880-2886, 1991.
89. WITTKE, I.; WIEDEMAYER, R.; PILLMANN, A.; SAVELYEVA, L.; WESTERMANN, F.; SCHWAB, M. **Neuroblastoma-derived sulfhydryl oxidase, a new member of the sulfhydryl oxidase/Quiescin6 family, regulates sensitization to interferon gamma-induced cell death in human neuroblastoma cells.** Cancer Res., v. 15, p. 7742-7752, 2003.
90. YAN, B.; SMITH, J.W. **A redox site involved in integrin activation.** J Biol Chem., v. 275, p. 39964-39972, 2000.
91. YAN, B.; SMITH, J.W. **Mechanism of integrin activation by disulfide bond reduction.** Biochemistry, v. 40, p. 8861-8867, 2001.
92. ZWAAL, R.F.; SCHROIT, A.J. **Pathophysiologic implications of membrane phospholipids asymmetry in blood cells.** Blood, v. 89, p. 1121-1132, 1997.