



UFBA

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**



FIOCRUZ

Curso de Pós-graduação em Patologia Humana

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**EFEITO DAS MICROPARTÍCULAS DERIVADAS DE
NEUTRÓFILOS NA LESÃO DE CÉLULAS ENDOTELIAIS
VASCULARES POR MECANISMO DEPENDENTE DE
MIELOPEROXIDASE**

Thassila Nogueira Pitanga

Salvador-Bahia-Brasil

2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ

Curso de Pós-graduação em Patologia Humana

**EFEITO DAS MICROPARTÍCULAS DERIVADAS DE
NEUTRÓFILOS NA LESÃO DE CÉLULAS ENDOTELIAIS
VASCULARES POR MECANISMO DEPENDENTE DE
MIELOPEROXIDASE**

THASSILA NOGUEIRA PITANGA

Orientador: Washington Luis Conrado dos Santos

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Patologia Humana como pré-requisito obrigatório para obtenção do título de Mestre em Patologia Humana.

Salvador-Bahia-Brasil

2011

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ – Salvador – Bahia.

Pitanga, Thassila Nogueira

P681e Efeito das micropartículas derivadas de neutrófilos na lesão de células endoteliais vasculares por mecanismo dependente de mieloperoxidase [manuscrito] / Thassila Nogueira Pitanga. - 2011
75 f. : Il., 30 cm

Datilografado (fotocópia)

Dissertação (mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz. Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, 2011.

Orientador: Prof. Dr. Santos, Washington Luis Conrado dos, Laboratório de Patologia e Biotecnologia.

1. Micropartículas Derivadas de Células. 2. Mieloperoxidase. 3. Estresse Oxidativo. 4. Aterosclerose. 5. Doenças Cardiovasculares. I. Título.

CDU 577.151.6:616-092.18

AGRADECIMENTOS

Considerando este trabalho como resultado de uma árdua caminhada que não começou no CPqGM, pode-se afirmar que agradecer não parece ser uma tarefa justa. Sendo assim, agradeço desde já a todos que contribuíram para minha formação e conquistas.

Obrigada!

À **Deus**.....meu amigo, meu pai, meu irmão, sou imensamente grata por absolutamente tudo!

À Dr. Lain Carvalho e Alberto Dutra, pelo carinho, atenção, apoio constante e confiança em mim. Aprendi muito com vocês!

À Dr. Washington Luis Conrado dos Santos, pela orientação e por ter estado presente sempre que precisei. Obrigada pelos ensinamentos.

À Dr. Ricardo David pela confiança depositada em mim. Nunca esquecerei!

À Dra. Tânia Barros, quem me iniciou na pesquisa, e a quem tenho profunda admiração e respeito.

Aos meus pais, Abílio César e Martha Pitanga, pelos princípios ensinados e por mostrar-me o lado mais rico da vida: a humildade. Por me ensinar o valor da amizade. Por me ensinar a ser tudo o que sou. Amo vocês!

À minha irmã Patrícia e minha prima Viviane, pela amizade e amor!

Ao meu grande amor, parceiro, amigo, Lúcio Barbosa. Obrigada por tornar possível a conclusão desta etapa. Obrigada por ser o meu apoio, o meu ponto de equilíbrio! Amo-te infinitamente.

À minha imensa e linda família, pelo amor e carinho eterno. Mas, minha eterna gratidão à pessoa mais linda do mundo: minha avó Lourdes. Quero ser igual à senhora quando eu “crescer”.

Aos meus amigos, meus irmãos, das antigas.....vocês sabem quem são. A vocês, o meu mais puro e verdadeiro amor de irmã.

Aos meus grandes parceiros da faculdade de farmácia da UFBA. Sinto muita falta de vocês!

Aos grandes amigos da pesquisa e da vida, Thayna Meirelles, Felipe Miranda, Viviane Junqueira, Luciana Aragão, Virgínia Goes e Pablo Oliveira, pela amizade, companhia, parceria! Por vocês sempre estarem ao meu lado, ajudando-me, cada um à sua maneira, em todas as circunstâncias. Eu afirmo: sem vocês eu não teria conseguido. OBRIGADA!

À Isabela, Andréia, Ayling, Cíntia, Camila e Yana, pela agradável convivência e contribuições ao meu trabalho. Obrigada!

Aos eternos membros da B05, Pilar Veras, Rodrigo Feitosa, David Garrido, Camila Ribeiro, Felipe Oliver e Tiago Amparo, pela ótima convivência durante o tempo em que estivemos juntos.

Aos amigos de outros laboratórios, pelas agradáveis conversas na copa.

Aos amigos da turma de mestrado, pelos momentos de alegria e parceria, pois se houve uma turma que cresceu unida, esta foi a nossa!

Ao amigo Diego Madureira, por manter viva a chama da pesquisa dentro de mim.

Ao grupo WLCS, Fernanda, Marcos, Maria, Glória, Labeni, Isadora, Taís, Josely, Micely, pelo acolhimento e pelas grandes contribuições em meu trabalho.

Ao grupo de Dr. Geraldo, Cris, Bia, Nayara, Tiago Landim, Gustavo pela amizade e boa convivência.

Aos pesquisadores Dra. Patrícia Veras, Fabíola Cardillo e Dr. Freitas pelas conversas agradáveis e contribuições em meu trabalho.

Aos parceiros, Zé Geraldo, Carlos, Isaac, Rodrigo, Lairton, Juliana, Priscila, Marcos, Manuela, Luana, Niara e Roberto por estarem sempre dispostos a me ajudar!

Aos queridos Sérgio Vasconcelos e Flávia Paixão, pela parceria e amizade durante todo o mestrado. O que você fizeram por mim vai muito além da simples ajuda na esterilização dos materiais ou questões burocráticas da administração. Valeu, amigos!!!

À Elivani de Jesus pela ajuda em vários momentos que precisei. Obrigada!!!

Aos colegas do LPBI, especialmente aos amigos da “bancada 05”.

A todos os professores do curso de Pós-graduação em Patologia, pelos ensinamentos e excelente convivência.

Ao Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz/FIOCRUZ, em especial Tauar e Flávia Maciel, por tornar possível o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Hospital Aliança, em especial Dr. Luiz Antônio e Dra. Katiaci Araújo, pelos cordões umbilicais fornecidos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pelo apoio financeiro.

...como dizia meu caro Charles Chaplin,

*Bom mesmo é ir à luta com determinação,
abraçar a vida e viver com paixão, perder com
classe e vencer com ousadia, pois o triunfo
pertence a quem se atreve e a vida é “muito”
para ser insignificante.*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	NMPs foram caracterizadas como eventos fluorescentes adquiridos na citometria de fluxo.	38
Figura 2	NMPs derivadas de PMNs.	39
Figura 3	NMPs de diferentes diâmetros derivadas de PMNs.	40
Figura 4	Frequência absoluta dos diâmetros (nm) para 21 NMPs derivadas de PMNs, avaliadas em MEV.	40
Figura 5	NMPs foram caracterizadas como os eventos fluorescentes verdes (CFDA) adquiridos na citometria de fluxo.	41
Figura 6	Associação de MPO na superfície das NMPs derivadas de PMNs.	42
Figura 7	Atividade de mieloperoxidase detectada nas NMPs derivadas de PMNs.	44
Figura 8	Expressão de moléculas de adesão na superfície das NMPs detectadas por citometria de fluxo.	45
Figura 9	Expressão de CD45-FITC e MPO-PE, em MPs derivadas de PMN.	46
Figura 10	Expressão de CD95 na superfície das MPs derivadas de PMNs.	47
Figura 11	Expressão de fosfatidilserina em NMPs derivadas de PMNs	48
Figura 12	Associação de NMPs derivadas de PMNs marcados com CFDA (fluorescência verde).	49
Figura 13	Deteção da atividade da MPO na superfície endotelial após incubação da HUVEC com NMPs.	50
Figura 14	Morfologia de HUVEC avaliadas em microscopia por contraste de fase.	52

Figura 15	Porcentagem de HUVEC lesadas após incubação com NMPs.	53
Figura 16	Atividade de MPO das NMPs incubadas com HUVEC.	54
Figura 17	Perda da integridade da membrana plasmática das células HUVEC após incubação com NMPs.	56

LISTA DE ABREVIATURAS

CFDA	Diacetado de carboxifluoresceína
DCV	Doenças cardiovasculares
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
HBSS	solução salina balanceada de Hanks
HOCl	Ácido hipocloroso
HUVEC	Célula endotelial da veia umbilical humana
ME/CN	Microscopia eletrônica/contraste negativo
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MPO	mieloperoxidase
MPs	Micropartículas
NMPs	Micropartículas de neutrófilos
NO	Óxido nítrico
PBS	Salina tamponada com fosfato
PBS	tampão fosfato-salina
PE	Ficoeritrina
PI	Iodeto de propídio
PMNs	polimorfonucleares
PS	Fosfatidilserina
RAEC	Linhagem de células endoteliais de aorta de coelho

RESUMO

Micropartículas (MPs) são vesículas liberadas da membrana plasmática após ativação celular ou fases iniciais de apoptose. MPs de neutrófilos (NMPs) apresentam em suas membranas diferentes proteínas com diferentes funções e diretamente relacionadas com seus efeitos biológicos, tais como mediadores inflamatórios (integrinas e L-selectina) e mieloperoxidase (MPO). A MPO é uma enzima catiônica, presente nos grânulos azurófilos de neutrófilos e monócitos, responsável pela formação de espécies reativas de oxigênio (ROS). Na presença de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), a enzima catalisa a oxidação de íons cloro com a formação de ácido hipocloroso (HOCl). MPs de diversas origens parecem afetar a função vascular por mecanismos dependentes do estresse oxidativo. No presente trabalho investigamos o possível papel de NMPs na lesão de células endoteliais vasculares *in vitro*. NMPs foram produzidas por ativação de polimorfonucleares (PMNs) humanos com ionóforo de cálcio e caracterizadas por microscopia eletrônica de transmissão e varredura como estruturas delimitadas por bicamada lipídica e com diâmetro menor do que 1 μm . A presença da MPO foi confirmada por citometria de fluxo, utilizando o anticorpo anti-MPO, e pela atividade enzimática detectada por quimioluminescência de HOCl, uma ROS catalisada unicamente pela MPO. A adição de azida, inibidor de peroxidases, ou de taurina, “scavenger” de HOCl, inibiu ou reduziu a atividade enzimática, respectivamente. Identificamos moléculas expressas na superfície das NMPs (CD62L, CD66b, CD45, CD95 e fosfatidilserina). A atividade de MPO foi observada após incubação das células endoteliais vasculares *in vitro* com NMPs, sugerindo que estas apresentam um potencial de carrear a MPO para a superfície endotelial vascular. A exposição de células endoteliais a NMPs induziu alterações morfológicas e perda da integridade da membrana celular, analisadas, respectivamente, por microscópio de contraste de fase e microscopia de fluorescência. Nossos resultados sugerem que NMPs atuam como carreadoras de MPO para a superfície de células endoteliais vasculares e induzem lesão destas células em um mecanismo dependente de MPO, sugerindo sua participação no desenvolvimento das complicações cardiovasculares.

Palavras-chave: Micropartículas; Mieloperoxidase; Estresse oxidativo; aterosclerose; Doenças cardiovasculares

ABSTRACT

Microparticles (MPs) are vesicles released from the plasma membrane after cell activation or early stages of apoptosis. In its membranes, neutrophil MPs (NMPs) present different proteins with different functions, directly associated with the cell's biological activities, such as inflammatory mediation via integrins, L-selectin and myeloperoxidase (MPO). MPO is a cationic enzyme found in the azurophilic granules of neutrophils and monocytes that produces reactive oxygen species (ROS). In the presence of hydrogen peroxide (H₂O₂) it catalyzes the oxidation of chlorine ions with the formation of hypochlorous acid (HOCl). MPs from different sources seem to affect vascular function through oxidative stress dependent mechanisms. In this study we investigated the possible role of NMP in vascular endothelial cell injury in vitro. NMPs were produced by activation of human polymorphonuclear (PMN) cells with calcium ionophore and characterized as structures bounded by lipid bilayer and with less than 1 μm diameter by transmission and scanning electron microscopy. MPO presence was confirmed by flow cytometry using anti-MPO antibody, and the enzyme activity detected by chemiluminescence of HOCl, a ROS catalyzed solely by the MPO. The addition of azide, peroxidase inhibitor, or taurine, HOCl scavenger, inhibited and reduced enzymatic activity, respectively. We identified molecules expressed on the NMPs surface (CD62L, CD66b, CD45, CD95 and phosphatidylserine). MPO activity was observed after incubation of vascular endothelial cells in vitro with NMPs, suggesting that they have the potential to carry MPO to the vascular endothelial surface. Exposure of endothelial cells to NMPs induced morphological changes and loss of cell membrane integrity, which were evaluated, respectively, by phase contrast microscopy and fluorescence microscopy. Our findings suggest that NMPs act as carriers of MPO to the surface of vascular endothelial cells and induce damage to these cells with an MPO-dependent mechanism, suggesting its participation in the development of cardiovascular complications.

Palavras-chave: Microparticles; Myeloperoxidase; Oxidative Stress; Atherosclerosis; Cardiovascular diseases.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
	1.1. Aspectos gerais das doenças cardiovasculares (DCV)	13
	1.2. Micropartículas (MPs)	15
	1.3. Mieloperoxidase (MPO)	17
	1.4. O papel da MPO e MPs na lesão do endotélio vascular	18
2	JUSTIFICATIVA	22
3	HIPÓTESE	23
4	OBJETIVOS	24
	4.1 Geral	24
	4.2 Específicos	24
5	METODOLOGIA	25
	5.1 Obtenção de células	25
	5.1.1. Polimorfonucleares (PMNs) humanos	25
	5.1.2. Células endoteliais da veia umbilical humana (HUVEC)	26
	5.1.3. Linhagem de células endoteliais de aorta de coelho (RAEC)	27
	5.2 Obtenção de micropartículas de neutrófilos PMNs (NMPs)	28
	5.2.1. Quantificação de proteínas das NMPs	29
	5.2.2. Microscopia eletrônica/contraste negativo (ME/CN)	29
	5.2.3. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	30
	5.2.4. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)	30
	5.2.5. Integridade das NMPs	31
	5.3. Detecção de MPO associado às NMPs	31
	5.3.1. Detecção de MPO por Citometria de Fluxo	31
	5.3.2. Detecção da atividade de MPO por quimioluminescência	32
	5.4. Detecção de moléculas de adesão na superfície das NMPs	33
	5.5. Detecção do receptor Fas (CD95) na superfície de NMPs	34
	5.6. Ligação de anexina V às NMPs	34
	5.7. Tratamento de células endoteliais com NMPs	34
	5.7.1. Adesão de MPs às RAEC	34
	5.7.2. MPO associada à superfície de HUVEC	35
	5.7.3. Morfologia da cultura de HUVEC	36
	5.7.4. Integridade da membrana plasmática de HUVEC	36

5.8. Análises Estatísticas	37
6 RESULTADOS	38
6.1. Obtenção de micropartículas de neutrófilos (NMPs)	38
6.1.1. Microscopia eletrônica das NMPs	38
6.1.2. Integridade das NMPs	41
6.2. Detecção de MPO associada às NMPs	42
6.2.1. Detecção de MPO por Citometria de Fluxo	42
6.2.2. Produto da atividade da MPO: ácido hipocloroso (HOCl)	42
6.3. Detecção das moléculas de adesão na superfície das NMPs	45
6.4. Expressão do receptor Fas (CD95) na superfície de NMPs	47
6.5. Detecção de fosfatidilserina na superfície de NMPs	48
6.6. Tratamento de células endoteliais com NMPs	49
6.6.1. NMPs aderem às RAEC	49
6.6.2. MPO associada à superfície da HUVEC	50
6.6.3. Alterações morfológicas da cultura de HUVEC	51
6.6.4. Perda da Integridade da membrana plasmática de HUVEC	54
7. DISCUSSÃO	57
8. CONCLUSÕES	67
9. REFERÊNCIAS	68

1. INTRODUÇÃO

1.1. Aspectos gerais das doenças cardiovasculares (DCV)

As doenças cardiovasculares (DCV), tais como doença arterial coronária e acidente vascular cerebral, são a principal causa de morte nos países desenvolvidos e estão projetadas para ser a maior causa de mortalidade no mundo até 2030 (KREATSOULAS & ANAND, 2010). As doenças ateroscleróticas representam eventos que predis põem ao desenvolvimento de DCV (LIBBY, 2002), e correspondem a uma série de respostas moleculares e celulares altamente específicas que podem ser descritas como doenças inflamatórias (ROSS, 1999; FAN & WATANABE, 2003).

A aterosclerose é uma doença inflamatória progressiva caracterizada pelo acúmulo de lipídios e componentes fibrosos nas artérias (LIBBY, 2002). É resultante da disfunção endotelial, iniciada após lesão do endotélio vascular, caracterizada por alterações nas propriedades anticoagulantes e anti-inflamatórias do endotélio (ROSS, 1999). Há o aumento da expressão de moléculas de adesão, produção de citocinas pró-inflamatórias e redução da biodisponibilidade do óxido nítrico (NO), principal responsável pela manutenção do estado anti-trombogênico do endotélio. Estas características favorecem a adesão e infiltração de leucócitos para o espaço subendotelial (FAN & WATANABE, 2003). A migração leucocitária contribui para a evolução da aterosclerose, principalmente, através da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês “reactive oxygen species”) (FORGIONE et al, 2000).

O estresse oxidativo no ambiente aterosclerótico tem importante implicação na integridade estrutural da placa de ateroma e na ampliação da resposta

inflamatória. A produção excessiva de ROS promove a ativação de enzimas, como metaloproteinases, que degradam a matriz extracelular, principal componente da cápsula fibrosa que reveste a placa (UEMURA *et al.*, 2001). Além disso, estas espécies reativas promovem depleção de NO (FORGIONE *et al.*, 2000), implicando em alterações funcionais do endotélio e aumentando a resposta inflamatória. O NO apresenta, entre outras funções, a propriedade de manter a superfície endotelial pouco adesiva a leucócitos (FORGIONE *et al.*, 2000), os principais agentes da inflamação e disfunção endotelial.

Neste contexto, a participação da mieloperoxidase (MPO), uma enzima pró-inflamatória, secretada por neutrófilos (SCHULTZ & KAMINKER, 1962) e monócitos (NICHOLS, 1973 *Apud* KLEBANOFF, 2005), parece contribuir de maneira significativa para o desenvolvimento e complicação da aterosclerose. Esta enzima é abundante em placas ateroscleróticas instáveis (DAUGHERTY *et al.*, 1994; HAZEN & HEINECKE, 1997; SUGIYAMA *et al.*, 2001), e seus produtos oxidativos participam, por exemplo, na peroxidação de lipídios (DAUGHERTY *et al.*, 1994) e ativação de metaloproteinases (PEPPIN & WEISS, 1986), contribuindo para a formação e instabilidade da placa aterosclerótica, respectivamente.

Embora muitos trabalhos investiguem acerca dos eventos envolvidos nas DCV, os mecanismos que iniciam e propagam a aterosclerose ainda não foram completamente elucidados. Neste contexto, estudos mais recentes vêm despertando interesse especial no papel das micropartículas e da MPO como agentes envolvidos na complicação da aterosclerose.

1.2. Micropartículas (MPs)

As micropartículas (MPs) foram primeiramente descritas em 1967, por Wolf, como restos de plaquetas, com propriedades procoagulantes (WOLF, 1967). Desde então, numerosos estudos vem reportando a liberação de MPs durante a ativação celular e fases iniciais de apoptose (MALLAT *et al.*, 1999).

Entre as diferentes vesículas de membrana que as células podem liberar, MPs são referidas como vesículas de diâmetro heterogêneo, iguais ou maiores do que 100nm e derivadas de membrana plasmática, apresentando, portanto, bicamada lipídica (ZWAAL & SCHROIT, 1997). Vesículas menores (40 a 100 nm) originadas de membranas endoplasmáticas são descritas como “exossomos”, e partículas maiores do que 1,5 μm , contendo material nuclear e organelas citoplasmáticas, são denominadas corpos apoptóticos (BEYER & PISETSKY, 2010).

MPs são vesículas íntegras que carregam, em seu interior, componentes citoplasmáticos (ZWAAL & SCHROIT, 1997). O comitê da Sociedade Internacional de Trombose e Homeostase desenvolveu a seguinte definição para MPs, em agosto de 2005: elas variam em tamanho de 0.1 – 1.0 μm ; contêm citoesqueleto de membrana; podem ser liberadas por uma variedade de células e conter quantidades variáveis de fosfatidilserina (FS) em sua superfície (ENJETI *et al.*, 2007).

A composição das MPs ainda não está elucidada, mas as diferenças observadas entre elas dependem da origem celular e do tipo de estímulo utilizado para promover a vesiculação (DISTLER *et al.*, 2005), e conferem a elas funções especializadas no ambiente vascular (BOULANGER *et al.*, 2006). MPs derivadas

de endotélio exibem o fator *von Willebrand* (JIMINEZ *et al.*, 2003), enquanto que MPs de polimorfonucleares expressam CD66b (LEROYER *et al.*, 2007) e MPO (HESS *et al.*, 1999; GASSER *et al.*, 2003). MPs geradas de PMNs ativadas com n-formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLP) expressam CD11a (GASSER *et al.*, 2003) e MPs de monócitos ativados com LPS expressam CD14 (SATA *et al.*, 1994).

O interesse pelas MPs tem aumentado substancialmente nos últimos anos, após evidências de que seus níveis apresentam-se aumentados no sangue de pacientes em situações clínicas de hipercoagulação, uma das características das DCV (VAN WIJK *et al.*, 2003). Sendo assim, as MPs poderiam desempenhar um papel importante nestas condições clínicas, iniciando ou amplificando a resposta pró-trombótica de tais doenças.

In vitro, a liberação de MPs tem sido demonstrada ocorrer virtualmente em todos os tipos celulares. Diferentes populações de MPs são encontradas circulantes em indivíduos saudáveis e, mais acentuadamente, em pacientes com síndrome coronariana aguda (BERNAL-MIZRACHI *et al.*, 2003), diabetes (DIAMANT *et al.*, 2002) e hipertensão severa (PRESTON *et al.*, 2003), entre outras doenças decorrentes de desordens cardiovasculares.

Pacientes com DCV apresentam um elevado risco de desenvolver trombose (BECKER, 2001). Há fortes evidências *in vitro* de que MPs estão envolvidas na ativação do sistema de coagulação. A coagulação requer não apenas fatores de coagulação ativados e íons cálcio. Tal atividade pró-coagulante deve-se à presença de fosfolípidios aniônicos, como a fosfatidilserina (FS) em sua membrana externa, o que a torna uma superfície catalítica para o complexo pró-trombinase (DIAMANT *et al.*, 2004).

Alguns trabalhos vêm mostrando que MPs realizam funções específicas em diversos processos, estando envolvidas na comunicação intercelular (ENJETI *et al.*, 2007). Albanese e colaboradores (1998) demonstraram que MPs derivadas de células de adenocarcinoma humano apoptóticas expressam receptor de apoptose CD95/FAS e reduzem a apoptose de linfócitos, possivelmente por competir com o receptor expresso neste, pelo ligante FAS.

Estudos vêm mostrando que MPs oriundas de diversas células participam na regulação do tônus vascular, notavelmente pelo decréscimo da produção de NO. MPs derivadas de células endoteliais potencializam a produção do ânion superóxido, levando à redução da biodisponibilidade de NO em células endoteliais vasculares de camundongos (BRODSKY *et al.*, 2004). Além disso, MPs de linfócitos isolados de pacientes diabéticos induzem à disfunção endotelial por reduzir a expressão da sintase do óxido nítrico endotelial (eNOS) (MARTIN *et al.*, 2004).

MPs derivadas de neutrófilos contêm mediadores inflamatórios, tais como fator de ativação plaquetária, CD11a, CD11b e selectinas, entre outras moléculas, e ativam células endoteliais, levando à secreção das citocinas próinflamatórias interleucina-6 e interleucina-8 (MESRI & ALTIERI, 1998).

1.3. Mieloperoxidase (MPO)

A mieloperoxidase, uma proteína abundante em neutrófilos e monócitos, possui um papel essencial nos mecanismos de defesa do sistema imune (KLEBANOF, 1970). Esta hemoproteína é estocada em grânulos azurófilos (SCHULTZ & KAMINKER, 1962) e secretada, após ativação leucocitária, para o

espaço extracelular e compartimento fagolisossomal (HANSSON *et al.*, 2006). A MPO oxida o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), gerado pelo decaimento do superóxido por ação da superóxido dismutase ou espontaneamente, gerando oxidantes citotóxicos importantes para a atividade microbicida dos leucócitos (HAZEN *et al.*, 1996). Entretanto, os oxidantes derivados da atividade da MPO, tal como o ácido hipocloroso (HOCl), o maior oxidante gerado pelo sistema MPO/ H_2O_2/Cl^- (HAZEN *et al.*, 1996), têm a capacidade de lesar tecidos, amplificando a resposta inflamatória.

Crescentes evidências demonstram o papel da MPO como participante do elo entre inflamação e doença cardiovascular. Inflamação e estresse oxidativo têm sido relacionados às diversas etapas envolvidas no desenvolvimento da placa aterosclerótica, desde a deposição lipídica à ruptura da placa. Estudos recentes têm demonstrado a presença da MPO e suas espécies reativas no sítio aterosclerótico (DAUGHERTY *et al.*, 1994; HAZEN & HEINECKE, 1997; SUGIYAMA *et al.*, 2001). O estresse oxidativo vascular apresenta múltiplas contribuições no desenvolvimento da aterosclerose, particularmente, nas modificações oxidativas de lipoproteínas e membranas lipídicas observadas ativamente na presença de HOCl (BERLINER & HEINECKE, 1996; HAZEN & HEINECKE, 1997; PODREZ *et al.*, 2000).

1.4. O papel da mieloperoxidase e micropartículas na lesão do endotélio vascular

Sob condições não estimulatórias, o endotélio mantém uma superfície luminal não adesiva, com propriedades anti-trombogênica, anticoagulante e anti-

oxidativa; regula o tônus vascular e inibe o crescimento das células musculares lisas vasculares. Em resposta à lesão, ativação por fatores de crescimento, mediadores inflamatórios ou outros estímulos agressores, as células endoteliais sofrem alterações estruturais e funcionais, passando a favorecer a adesão de leucócitos (FORGIONE *et al.*, 2000), os principais agentes envolvidos no processo inflamatório da aterosclerose.

Na hipótese de “resposta à injúria”, o processo aterosclerótico inicia-se como uma resposta a uma mínima lesão crônica ao endotélio. Esta lesão leva a uma série de respostas endoteliais, resultando na aterosclerose (DELOUGHERY & GOODNIGHT, 1993 *apud* JACOBI *et al.*, 2006). Neste contexto, o estresse oxidativo e a inflamação contribuem, de maneira significativa, à lesão e disfunção endotelial (GALLE *et al.*, 1999). Entretanto, pouco é conhecido sobre os mediadores envolvidos na produção excessiva de ROS na lesão endotelial.

Embora muitos estudos correlacionem MPO e DCV, só recentemente, alguns trabalhos vêm demonstrando o envolvimento da enzima e seus oxidantes no desenvolvimento de placas ateroscleróticas vulneráveis.

Um dos maiores contribuintes para a lesão endotelial é o HOCl, ROS gerada unicamente pela MPO (HANSSOM *et al.*, 2006). Seus efeitos nos tecidos são numerosos. Sugiyama e colaboradores (2004) descreveram uma intensa co-localização entre MPO e proteínas modificadas por HOCl em lesões ateroscleróticas. O ácido hipocloroso pode induzir apoptose e expressão de fator tecidual sobre a célula endotelial, contribuindo para trombose (SUGIYAMA *et al.*, 2004). Além disso, pode inativar TIMP-1 (inibidor tecidual de metaloproteínase-1) (SHABANI *et al.*, 1998) e ativar pró-metaloproteínases (PEPPIN & WEISS, 1986), que são expressas em ateroma humano (GALIS *et al.*, 1994), contribuindo para a

instabilidade da placa. O HOCl também degrada proteoglicanos e reduz a adesão das células endoteliais à matriz extracelular causando retração e morte celular (KLEBANOF *et al.*, 1993; VISSERS & THOMAS, 1997).

A perda da integridade funcional das células endoteliais, acompanhada da disfunção endotelial, parece ser uma desordem molecular comum encontrada nas DCV durante a instabilidade da placa aterosclerótica. O HOCl, em concentrações acreditadas *in vivo* nos sítios inflamatórios (1 a 100 μM) (SUGIYAMA *et al.*, 2004), apresenta um comportamento bifásico. Concentrações menores do que 35 μM de HOCl induzem apoptose das células endoteliais, enquanto que concentrações acima de 50 μM induzem alterações rápidas na morfologia celular, seguida de morte celular por necrose (VISSERS *et al.*, 1999).

MPs presentes em lesões ateroscleróticas humanas iniciam a formação de trombos no momento da ruptura da placa, quando entram em contato com fatores de coagulação plasmáticos (MALLAT *et al.*, 1999). No isolamento de MPs da placa aterosclerótica, Leroyer e colaboradores (2007) demonstraram que a maioria destas MPs é derivada de leucócitos ativados e de eritrócitos, sugerindo, respectivamente, a contribuição destas MPs na inflamação local e a ocorrência de hemorragias no interior do ateroma. A placa também contém MPs derivadas de células endoteliais, possivelmente originadas de células lesadas (TRICOT *et al.*, 2000). Quanto às MPs de plaquetas, elas estão ausentes nas lesões ateroscleróticas (MALLAT *et al.*, 1999), possivelmente devido à remoção seletiva de plaquetas por fagócitos (De MEYER *et al.*, 2002).

Assim, vários estudos indicam que MPs circulantes de várias origens celulares podem ser consideradas como marcadores da lesão vascular e ativação da coagulação. Entretanto, MPs parecem ser também efetoras-chave em várias

condições fisiopatológicas, envolvidas nas fases iniciais da lesão endotelial à desestabilização, ruptura da placa aterosclerótica e trombose aguda.

2. JUSTIFICATIVA

O desenvolvimento e progressão de placas ateroscleróticas estão associados à lesão e morte de células endoteliais vasculares. Os mecanismos que induzem esta lesão ainda não foram completamente elucidados. A identificação de agentes envolvidos na patogênese da aterosclerose, doença que mais mata no mundo, pode determinar o desenvolvimento de estratégias na prevenção e tratamento de desordens cardiovasculares como doença arterial coronária e acidente vascular cerebral.

Neste contexto, o presente estudo foi realizado para investigar um possível mecanismo de lesão endotelial vascular induzido por micropartículas derivadas de neutrófilos (NMPs). A escolha desta população de micropartículas ocorreu em razão das mesmas apresentarem, em sua superfície, mieloperoxidase (MPO), enzima encontrada ativa em lesões ateroscleróticas, única capaz de gerar ácido hipocloroso (HOCl). O HOCl é uma espécie reativa de oxigênio reconhecida por induzir lesão endotelial, podendo, portanto, iniciar ou amplificar a resposta inflamatória.

Uma vez que as NMPs parecem estar envolvidas em mecanismos dependentes do estresse oxidativo, a confirmação da hipótese de que estas micropartículas induzem lesão de células endoteliais por mecanismos dependentes de MPO permitirá não apenas a compreensão de novas rotas envolvidas no desenvolvimento da aterosclerose, como reforçará a participação das NMPs como preditoras de risco cardiovascular.

3. HIPOTESE

Micropartículas derivadas de neutrófilos induzem lesão das células endoteliais vasculares por mecanismo dependente de mieloperoxidase.

4. OBJETIVOS

4.1 Geral

Investigar o possível papel de MPs derivadas de neutrófilos na lesão de células endoteliais vasculares

4.2 Específicos

- I. Avaliar a atividade de mieloperoxidase (MPO) nas MPs de neutrófilos (NMPs);
- II. Investigar o transporte da MPO para a superfície das células endoteliais *in vitro* via NMPs;
- III. Investigar a lesão de células endoteliais vasculares *in vitro* por NMPs.

5. METODOLOGIA

5.1. Obtenção das células

Neste estudo foram obtidas células polimorfonucleares (PMNs) de sangue periférico humano como fontes de micropartículas e dois tipos de células endoteliais vasculares, para os ensaios de adesão e lesão celular: células endoteliais de cordão umbilical humano (HUVEC) e RAEC, uma linhagem imortalizada de células endoteliais de aorta de coelho.

5.1.1. Polimorfonucleares (PMNs) humanos

Os protocolos experimentais foram submetidos à análise e aprovados pela Comissão de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, da FIOCRUZ-RJ (Parecer n° 203/2009 e protocolo n° 313). Os PMNs foram obtidos a partir de 20 mL de sangue doados por voluntários sadios, coletados em presença de heparina (40 U/mL). Foi acrescentada à amostra uma solução de dextran T-500 a 3% (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA), preparada em solução salina a 0,9%, na proporção 2:1. Esta solução foi deixada a temperatura ambiente por 25 minutos para sedimentação das hemácias. O sobrenadante, porção do tubo rica em leucócitos, foi aspirado e posteriormente centrifugado por 10 minutos a 750 x g, à temperatura ambiente (T.A.). O sedimento foi ressuspensão em 6 mL de tampão fosfato-salina contendo 2 mM de ácido etilenodiaminotetracético (PBS-EDTA) e, posteriormente, adicionado cuidadosamente sobre 3 mL de Ficoll (Ficoll-Hypaque (GE Healthcare Bio-Sciences Corp. Piscataway, NJ, USA)). A suspensão foi centrifugada a 800 x g por 20 minutos à T.A. O sobrenadante e as células mononucleares foram descartados e o sedimento rico em PMNs foi ressuspensão

em 2 mL de PBS. As hemácias remanescentes foram lisadas pela adição de 5 mL de água destilada e inversão lenta durante 1 minuto, seguido da reconstituição isotônica do meio com 2 mL de uma solução de NaCl a 3,5%. Após a lise, a suspensão foi centrifugada por três vezes a 150 x g por 10 minutos a 4° C. PBS-EDTA foi utilizado para ressuspender as células entre as centrifugações.

5.1.2. Células Endoteliais de Veia Umbilical Humana (HUVEC)

As HUVEC foram obtidas a partir de cordões umbilicais doados pelo Hospital Aliança (HA), sob a coordenação da médica pediatra e presidente do comitê de ética do HA Dra. Katiaci Araújo. O projeto foi aprovado pelo comitê de ética do HA e da Fiocruz-RJ (Parecer n° 203/2009 e protocolo n° 313). Todas as gestantes voluntárias consentiram com a doação dos cordões umbilicais e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

Para a obtenção das células endoteliais foi utilizada a técnica modificada do protocolo descrito por JEFFE *et al.*, em 1973. A veia do cordão foi lavada com 60 mL de solução salina balanceada de Hank (HBSS), perfundida com 10 mL de colagenase (0,1% - Worthington Diagnostic systems Inc. Freehold, NJ, USA) e incubada na presença da enzima por 15 minutos, em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Após a incubação, as células foram centrifugadas com meio de cultura completo - RPMI 1640 suplementado com soro fetal bovino 10% (Gibco), ECGS (endothelial cell growth supplement – suplemento de crescimento celular endotelial) (BD Biosciences), heparina (10 U/mL) e sedimentadas a 450 x g, por 6 minutos à 4°C. O sedimento foi ressuspensão em cinco mililitros de meio completo, transferido

para uma garrafa de cultura de 25 cm², previamente revestida por gelatina tipo A (Sigma) a 1% e incubada em estufa a 37°C e 5% de CO₂.

5.1.3. Linhagem de células endoteliais de aorta de coelho (RAEC)

HUVEC são tecnicamente fáceis de serem isoladas, mas difíceis de serem produzidas em quantidade suficiente para os diferentes ensaios aplicados neste trabalho. Diferentemente da HUVEC, a linhagem RAEC apresenta um índice de crescimento e multiplicação celular bastante rápido, além de não necessitar de fatores de crescimento nem de um substrato para aderirem (a exemplo do ECGS e gelatina, necessários para a proliferação e adesão, respectivamente, de HUVEC). Embora haja facilidades em utilizar a linhagem, preferimos trabalhar com a cultura de HUVEC na maioria dos ensaios por ser um modelo bem estabelecido nos estudos de disfunção e morte celular (JACOBI *et al.*, 2006). Assim, decorrente da demora em se obter HUVEC prontamente confluyente para todos os experimentos, a RAEC foi utilizada nos ensaios de adesão micropartículas - células endoteliais (avaliados em microscopia de fluorescência).

A linhagem foi gentilmente doada pelo Laboratório de Biologia Vascular, do Instituto do Coração (INCOR/USP). 10⁵ células RAEC foram cultivadas em placa de 24 poços com lamínulas e incubadas com meio RPMI completo, sem a suplementação necessária à HUVEC (fator de crescimento e heparina), em estufa a 37 °C e 5% de CO₂. Após 36-48h, as células atingiram a confluência e foram usadas para o ensaio de adesão com MPs.

5.2. Obtenção das micropartículas de PMNs

As micropartículas (MPs) foram geradas a partir da ativação dos PMNs, que se encontravam na concentração de 10^7 células/mL em HBSS. Os PMNs foram ativados com a utilização de 2 μ M do ionóforo de cálcio (A23187) (Sigma) por 20 minutos a 37°C. Após este período, as células foram centrifugadas a 8000 x g, por 7 minutos a 4°C, a fim de remover os debris celulares. O sobrenadante foi ultracentrifugado a 100.000 x g, por 45 minutos, a 4°C, para obter o sedimento de MPs. Foi feito um *pool* de sedimentos de MPs dos doadores, o qual foi ressuspenso em 500 μ L de HBSS, sem vermelho de fenol (pois interfere nos ensaios de quimioluminescência), e mantido a 4°C. O nosso grupo já mostrou que MPs mantêm-se íntegras quando armazenadas a 4°C (MEIRELLES, 2009).

Nos ensaios na citometria de fluxo, as MPs (1 μ g/mL) foram marcadas com o kit PKH26 (Sigma), para a marcação seletiva da membrana lipídica com fluorescência vermelha, ou derivadas de PMNs marcados com CFDA (Sigma, St-Louis, USA), para marcação seletiva do conteúdo citoplasmático com fluorescência verde. A calibração das MPs foi feita utilizando calibradores (“*beads*”) com 1 μ m de diâmetro.

Diferente dos PMN basófilos e eosinófilos, que são encontrados normalmente com uma freqüência de 0 - 1% e 2 - 4%, respectivamente, do total de leucócitos (valores de referência de leucograma humano), os neutrófilos são os PMNs mais freqüentes (65% do total de leucócitos) na circulação sanguínea. Por isso, resolvemos chamar as MPs derivadas de PMNs de micropartículas de neutrófilos ou NMPs.

5.2.1. Quantificação de proteína de NMPs

A concentração de proteínas totais das NMPs foi determinada pelo método BCA (Thermo Scientific, USA) usando uma curva de albumina como padrão, com concentração inicial de 200 $\mu\text{g/mL}$ e final de 3,125 $\mu\text{g/mL}$. O ensaio combina a redução de íon cúprico (Cu^{2+}) em íon cuproso (Cu^{1+}) por proteínas, em meio alcalino, e a detecção colorimétrica deste pelo ácido bicinconínico (BCA).

As amostras de MPs foram diluídas 1:2 em HBSS acrescido de dodecil-sulfato de sódio (SDS) 2%. Conforme o protocolo fornecido pelo fabricante, 150 μL da mistura de reagentes do kit (25 partes do reagente MA, 24 partes de MB e 1 parte de MC) foi adicionado à curva padrão, amostras e branco (HBSS), em ambiente protegido da luz. As amostras foram incubadas em estufa a 37°C, 5% de CO_2 , por 2h. A leitura da densidade óptica foi realizada em espectrofotômetro (Spectra Max 340PC – Molecular Devices, Califórnia, EUA) com luz no comprimento de onda de 562nm.

5.2.2. Microscopia eletrônica/contraste negativo (ME/CN)

Para a realização da contrastação negativa, foi necessária a utilização de grades revestidas por resina polivinil formal (FORMVAR). Em cada grade foi acrescentado 8 μL da suspensão de MPs, em HBSS. Após oito minutos, o excesso de líquido foi retirado e foi acrescentado 5 μL de acetato de uranila 2%. Após 2 minutos, o excesso foi retirado e a grade foi colocada em papel filtro tempo suficiente para a secagem completa da mesma. Em seguida, as amostras de MPs foram observadas em microscópio Zeiss EM109 e as imagens foram

adquiridas no programa Soft Imaging Viewer (Soft Imaging System GmbH, Olympus, Hamburgo, Alemanha).

5.2.3. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Uma alíquota de 50 μ L de MPs foi transferida para lamínulas previamente revestidas com poli-L-lisina (0,01%). As MPs foram deixadas em repouso sobre as lamínulas por 20 minutos. Em seguida, o excesso de MPs foi retirado e as lamínulas foram mantidas em placas de petri semi-abertas, à temperatura ambiente, a fim de secarem. Após esta etapa, as lamínulas foram metalizadas em ouro e observadas em MEV. O material foi observado no microscópio JSM 6390 LV Low Vacuum - JEOL (USA).

5.2.4. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

As NMPs foram analisadas em microscopia eletrônica de transmissão (MET) a fim de avaliar a presença da bicamada lipídica. Elas foram fixadas com 50 μ L de glutaraldeído 2% em tampão cacodilato de sódio (0,1 M, pH 7,4, temperatura ambiente, 30 minutos), lavadas com o tampão cacodilato (a 100.000 x g, 45 minutos, à temperatura ambiente) e pós fixadas em tetróxido de ósmio 1%, ferricianeto de potássio 0,8% e cloreto de cálcio 5 mM em tampão cocodilato de sódio (30 minutos, à temperatura ambiente, na ausência de luz). Em seguida, as MPs foram lavadas em tampão cocodilato e incluídas em gelatina 1%. Na etapa seguinte, as MPs passaram pelas etapas de desidratação, por 5 minutos, em séries crescentes de acetona (30, 50, 70 90, 100%), substituição (com acetona e resina Polibed 812 por 6h, a temperatura ambiente), impregnação (resina pura com catalisador por 8h), emblocamento (em resina) e polimerização (em estufa a

60 °C por três dias). O material foi observado em microscópio Zeiss EM109 e as imagens foram adquiridas no programa Soft Imaging Viewer (Soft Imaging System GmbH, Olympus, Hamburgo, Alemanha).

5.2.5. Integridades das NMPs

As NMPs foram avaliadas quanto à integridade de sua membrana por citometria de fluxo. Para este ensaio, 2×10^7 PMN/mL foram marcados com 20 μ M de CFDA (um marcador de citoplasma) por 30 minutos em estufa (37°C, 5% CO₂). Em seguida, as células foram centrifugadas com PBS-EDTA (170 x g por 7 minutos, a 4°C) e ressuspensas em HBSS. Esta suspensão foi ativada com ionóforo de cálcio 2 μ M (A23187), por 20 minutos em estufa (37°C, 5% CO₂). O sobrenadante foi então, centrifugado a 8.000 x g, por 7 minutos, depois a 100.000 x g, por 45 minutos a 4°C. O sedimento de MPs foi ressuspenso em 500 μ L de HBSS. 1 μ g/mL de NMPs foram analisadas por citometria de fluxo para o canal de fluorescência verde (FL1).

5.3. Detecção de MPO associada às NMPs

5.3.1. Detecção de MPO por Citometria de Fluxo

Para a detecção de MPO, por citometria de fluxo, 1 μ g/mL de NMPs foram marcadas inicialmente com PKH67, seguida da marcação com anticorpos anti-MPO marcados com ficoeritrina (PE) (Novus Biologicals, Littleton, CO, USA). O isotipo controle foi adquirido da AbD Serotec (North Carolina, USA). As NMPs foram lavadas uma vez para a remoção do excesso do anticorpo não ligado, com a adição de 3 mL de tampão de citometria de fluxo (PBS com 5% SBF e 0,1% de

azida sódica), seguida de ultracentrifugação (100.000 x g, 45 minutos, 4°C). Depois, mais duas centrifugações com PBS para a retirada do excesso do tampão. O sedimento de NMPs marcadas foi ressuspenso em 300 µL de PBS para a aquisição na citometria de fluxo. O *gate* das NMPs (Figura 1) foi definido usando calibradores de 1 µm de diâmetro. As NMPs foram submetidas à aquisição de 100.000 eventos, e todas as aquisições foram realizadas no citômetro de fluxo FACSorter usando o programa CellQuest (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). A análise dos dados foram realizados no programa FlowJo (Tree Star Inc, CA, USA), utilizando sempre os canais de dispersão frontal (FSC-H), dispersão lateral (SSC-H) e fluorescências medidas em escalas logarítmicas.

5.3.2 Detecção da atividade de MPO por quimioluminescência

A detecção da atividade da MPO foi feita, indiretamente, por quimioluminescência do ácido hipocloroso (HOCl). A produção de HOCl por NMPs foi avaliada conforme descrito no trabalho de Meirelles (2009). A quimioluminescência foi mensurada com um luminômetro que possui um tubo fotomultiplicador (que incorpora uma superfície de gálio), resfriado a -20° 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 uma contagem digital. Os dados são então coletados como média de contagens/segundo, correspondendo aos fótons/segundo emitidos na reação de luminescência (ASSREUY *et al.*, 1994). As amostras (quantidades de MPs em µg/mL) foram adicionadas às placas de Petri de 35 x 10 mm com 20 µM de

luminol (Sigma Chemical Co., St Louis, EUA), 20 μM de H_2O_2 (Proquimios) e HBSS (volume para completar 1 mL/placa), cobertas com filme plástico e mantidas em câmara escura conectada a banho-maria a 37° C, durante todo o tempo da leitura. Na reação em sequência, com a emissão de luminescência, o luminol é oxidado pelo OCl^- , em uma reação que resulta na liberação de energia como fótons. O ensaio foi feito em duplicata para cada amostra, na presença ou ausência de 10 μM de azida sódica, um inibidor de peroxidases, dentre elas a MPO, e na presença ou ausência de 1mM de taurina (Sigma), um “scavenger” de HOCl. A taurina reage com o HOCl formando taurina cloramina e reduzindo a quantidade de HOCl disponível para reagir com o luminol. Após a leitura basal da amostra, que acontece com 200 segundos, 20 μM de H_2O_2 foi adicionado, e a leitura realizada durante os cinco minutos seguintes. Em nossos experimentos, como controle, placas contendo apenas luminol e HBSS, e placas contendo este sistema acrescido de H_2O_2 , foram submetidas à leitura basal.

5.4. Detecção de moléculas na superfície de adesão em NMPs

As NMPs foram incubadas com tampão de citometria de fluxo contendo os anticorpos anti-CD66b (AbD Serotec, USA), anti-CD11a (Littleton, CO, USA) e anti-CD49d (AbD Serotec, USA), anti-CD45 (BD Bioscience, USA) conjugados a FITC, e anti-CD62L (BD Bioscience, USA) conjugado a ficoeritrina (PE), por 20 minutos, a 4°C, na ausência de luz. As NMPs foram lavadas duas vezes em PBS para a retirada do excesso de anticorpo não ligado (a 100.000 $\times g$, por 45 minutos a 4°C). O sedimento de NMPs foi ressuspensão em 300 μL de PBS para a aquisição dos resultados na citometria de fluxo, a partir de 100.000 eventos lidos.

Os isotipos controles utilizados foram adquiridos da AbD Serotec (North Carolina, USA).

5.5. Detecção do receptor Fas (CD95) na superfície das NMPs

As NMPs foram incubadas com tampão de citometria de fluxo contendo o anticorpo anti-CD95 conjugado à ficoeritrina (PE) (BD Bioscience, USA), por 20 minutos, a 4°C, na ausência de luz. As MPs foram lavadas duas vezes em PBS para a retirada do excesso de anticorpo não ligado (a 100.000 xg, por 45 minutos a 4°C). O sedimento de NMPs foi ressuspensão em 300 µL de PBS para a aquisição dos resultados na citometria de fluxo, a partir de 100.000 eventos lidos. Os isotipo controle conjugado à ficoeritrina (PE) foi adquirido da AbD Serotec (North Carolina, USA).

5.6. Ligação de anexina V às NMPs

As MPs ressuspensas em 300 µL de HBSS foram incubadas por 10 minutos com 3 µL de anexina V (BD Biosciences, conjugado ao fluorocromo PE), em meio com cálcio, à temperatura ambiente. O controle foi feito em meio ausente de cálcio. Em seguida a amostra foi imediatamente avaliada por citometria de fluxo quanto à presença de fosfatidilserina em sua superfície.

5.7. Tratamento de células endoteliais com NMPs

5.7.1. Adesão de MPs às RAEC

A RAEC foi cultivada em placa de 24 poços, contendo lamínulas estéreis, em uma concentração de 10^5 células/poço, em estufa (37 °C, 5% de CO₂). Cerca de 36h após, as células atingiram uma confluência de aproximadamente 70%, o

meio foi retirado e a cultura foi lavada três vezes com HBSS pré-aquecido. As células em cultura foram marcadas com 2 μM de PKH26 (emissor de fluorescência vermelha), durante 2 minutos. Em seguida, a reação foi parada acrescentando meio RPMI completo. As células foram lavadas com HBSS pré-aquecido, e incubadas em estufa (37 °C, 5% de CO_2), por 6 minutos, na ausência ou presença de H_2O_2 , com 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de NMPs derivados de PMN previamente marcados com CFDA (emissor de fluorescência verde), ativados com ionóforo de cálcio A23187 por 20 minutos a 37 °C. Como controle negativo para a marcação da CFDA, células marcadas com PKH26 não foram incubadas com NMPs. Em seguida, as culturas foram lavadas, e fixadas com 1,7 mM de formaldeído (Isofar) por 8 minutos, em estufa (37 °C, 5% de CO_2). As culturas foram lavadas, e cada lamínula foi montada com a respectiva lâmina. Para isto, foi acrescentado, em cada lâmina, 7 μL do reagente ProLong Gold (Invitrogen, USA). Este contém DAPI (4,6'-diamidino-2-phenylindole), emissor de fluorescência nuclear azul, para a identificação automática das células em microscópio de fluorescência (Olympus BX51, USA).

5.7.2. MPO associada à superfície de HUVEC

A HUVEC foi cultivada em placas de Petri de 35 X 10 mm (5×10^5 células/placa) e mantidas em estufa (37 °C, 5% de CO_2). Cerca de 48h após as células atingirem confluência adequada para os ensaios, o meio de cultura foi descartado, as culturas foram lavadas com HBSS e tratadas com 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de NMPs, em HBSS contendo 20 μM de H_2O_2 e 20 μM de luminol. As células foram incubadas com as NMPs por 6 minutos. Como controle negativo, as células foram incubadas com HBSS puro ou HBSS e 20 μM de H_2O_2 , em ambos os casos, com

20 μM de luminol. Durante a leitura, foi acrescentado 10 μM de azida sódica, como controle de atividade da MPO. As análises foram feitas no aparelho de quimioluminescência.

5.7.3. Morfologia da cultura de HUVEC

A HUVEC foi cultivada em placas de 35 X 10 mm (5×10^5 células/placa) e mantida em estufa (37 °C, 5% de CO_2). Cerca de 48h após, as células, com 90% de confluência, foram tratadas com as NMPs em concentrações crescentes (0,5; 1 e 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), em HBSS contendo 20 μM de H_2O_2 . As células foram mantidas em cultura com as NMPs por 2, 8 e 16 minutos, e fotografadas ao fim de cada período. Como controle, as células foram mantidas nos mesmos intervalos de tempo com HBSS puro e HBSS e 20 μM de H_2O_2 . Repetimos o mesmo tratamento anterior, com a maior concentração de NMPs (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), mas incluindo 1 mM de taurina. As fotos foram tiradas no microscópio de contraste de fase (Olympus CK2, USA), e as imagens foram analisadas utilizando o programa Image Pro Plus 6.1 (Media Cybernetics, Silver Spring, EUA).

5.7.4. Integridade da membrana plasmática de HUVEC

Para avaliar a integridade da membrana plasmática, as HUVEC foram submetidas à marcação dupla com o iodeto de propídio (PI) e CFDA. O PI, sonda fluorescente de coloração vermelha que apresenta afinidade ao DNA, não é permeável às células com membrana intacta, corando, desta forma, apenas as células lesadas. Diferente deste, o CFDA é um corante permeável à membrana, e é rapidamente convertido pelas esterases intracelulares em um derivado verde fluorescente (HARRISON & VICKERS, 1990).

As HUVEC foram cultivadas em placas de 24 poços, contendo lamínulas estéreis, em uma concentração de 5×10^5 células/poço. Ao atingirem uma confluência de aproximadamente 70%, o meio foi retirado e a cultura foi lavada três vezes com HBSS pré-aquecido. As células foram tratadas com NMPs 2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, em presença de 20 μM de H_2O_2 , por 30 minutos. Em seguida, as células foram reincubadas em meio completo, e mantidas em estufa (37°C , 5% CO_2), por 10h. Como controle negativo, as células foram incubadas com HBSS. Fizemos um controle para avaliar se a integridade da membrana plasmática era dependente da atividade de MPO. Incubamos as células com 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de NMPs e 10 μM azida sódica (inibidor da MPO). Após o período de incubação, as células foram marcadas com 20 μM de CFDA e 2,4 μM de PI por 30 minutos em estufa (37°C , 5% CO_2). Em seguida, a cultura foi lavada com HBSS e incubada por 8 minutos com formaldeído (1,7 mM), em estufa (37°C , 5% CO_2). As culturas foram lavadas, e cada lamínula foi montada com a respectiva lâmina. Para isto, foi acrescentado, em cada lâmina, 7 μL do reagente ProLong Gold (Invitrogen, USA), contendo DAPI, para a identificação automática das células em microscópio de fluorescência (Olympus BX51).

5.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

São apresentadas as médias e desvio padrão (SD). O teste t de *Student* pareado foi aplicado para comparar dois grupos experimentais dependentes. Todos os dados foram analisados utilizando o software Prisma 5.01 (GraphPad, San Diego, EUA). Diferenças estatísticas foram consideradas significativas para $p < 0,05$.

6. RESULTADOS

6.1. Obtenção de micropartículas de neutrófilos (NMPs)

A eficiência da obtenção de NMPs foi avaliada através da citometria de fluxo. Observou-se que de todos os eventos fluorescentes marcados com PKH26 (fluorescência vermelha), cerca de 50% corresponderam às NMPs, em uma região definida com o auxílio de calibradores com 1 μm de diâmetro (Figura 1).

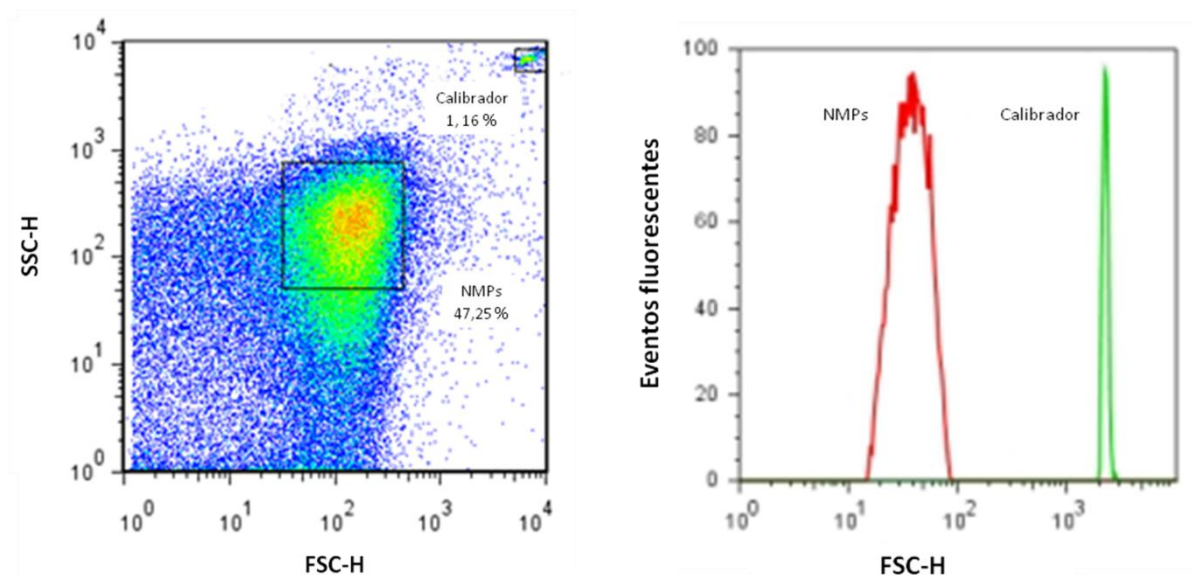


Figura 1: NMPs foram caracterizadas como eventos fluorescentes adquiridos na citometria de fluxo. As NMPs são os eventos marcados com 2 μM de PKH26 (fluorescência vermelha). Para avaliar o tamanho das NMPs, foram utilizados calibradores com 1 μm de diâmetro. Observa-se que a população de NMPs é representada por eventos com diâmetro menor do que 1 μm . FSC-H: tamanho; SSC-H: granulosidade. Análise representativa de 5 ensaios diferentes.

6.1.1. Microscopia eletrônica das NMPs

A preparação das NMPs foi avaliada quanto à sua qualidade e pureza por microscopia eletrônica de contraste negativo (ME/CN) (Figura 2A) e microscopia eletrônica de varredura (MEV) (Figura 2B). A amostra de NMPs não apresentou

contaminação com debris celulares, e as estruturas observadas foram as mesmas já previamente descritas: estruturas arredondadas, de tamanhos variados.

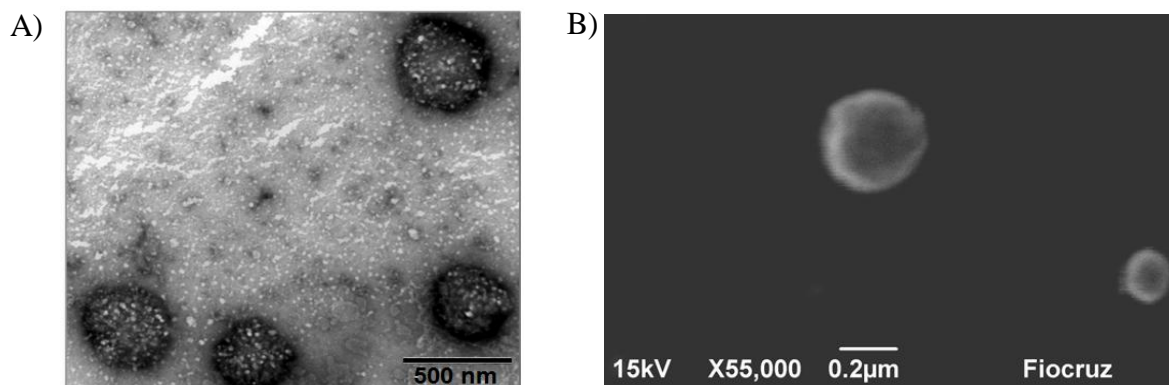


Figura 2: NMPs derivadas de PMNs ativados com 2 μ M de ionóforo de cálcio A23187, por 20 minutos a 37 °C. A) NMPs marcadas com acetato de uranila 2% e analisadas em ME/CN; B) NMPs metalizadas em ouro e avaliadas em MEV. ME/CN: microscopia eletrônica por contraste negativo; MEV: microscopia eletrônica de varredura.

Como as micropartículas são derivadas de membrana celular, avaliamos a presença de bicamada lipídica nas NMPs por microscopia eletrônica de transmissão (MET) para descartar a possibilidade de estarem presentes corpos apoptóticos, pois estes apresentam, em seu interior, fragmentos nucleares e organelas bem preservadas tais como mitocôndria e retículo endoplasmático (KERR & HARMON, 1978 *Apud* ALBANESE *et al.*, 1998). As amostras obtidas não apresentaram as características observadas em corpos apoptóticos, reforçando que se trata de NMPs. Além disso, duas faixas mais eletrodensas circundando uma região menos eletrodensa foram observadas, reforçando que a amostra era de micropartículas: vesículas arredondadas, oriundas da bicamada lipídica (Figuras 3A e 3B).

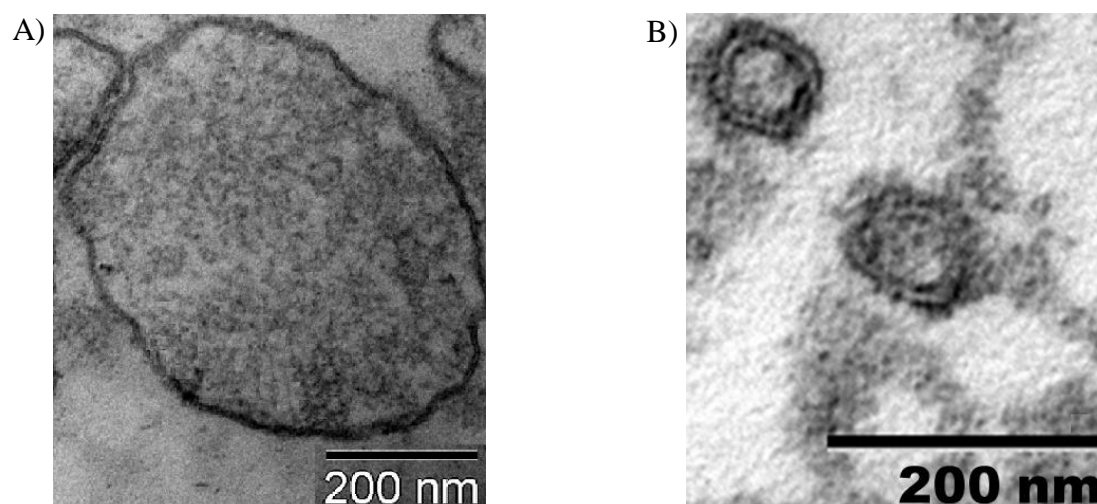


Figura 3: NMPs de diferentes diâmetros derivadas de PMNs ativados com 2 μM de ionóforo de cálcio A23187, por 20 minutos a 37 $^{\circ}\text{C}$, analisadas em MET. Nas figuras A e B, as NMP aparecem circundadas por duas linhas mais eletrodensas e uma região central menos eletrodensa. MET: microscopia eletrônica de transmissão.

Os diâmetros das NMPs foram avaliados por MEV, apresentando-se bastante heterogêneos, variando de 0,1 a 1 μm ; a maioria das NMPs apresentou diâmetro entre de 200 a 500 nm (Figura 4).

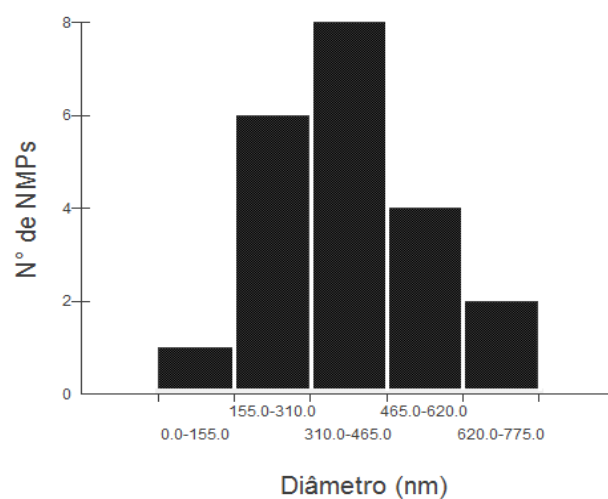


Figura 4: Frequência absoluta dos diâmetros (nm) para 21 NMPs derivadas de PMNs, avaliadas em MEV. MEV: microscopia eletrônica de varredura

6.1.2. Integridade de NMPs

Para avaliar a integridade das NMPs e a presença de conteúdo citoplasmático, PMNs foram previamente tratados com CFDA, sonda que adquire fluorescência verde ao ser clivada pela ação de esterases no citoplasma celular, e em seguida ativados com ionóforo de cálcio A23187 para liberação das NMPs. Em seguida, as NMPs foram avaliadas por citometria de fluxo. Cerca de 80% do total de eventos menores que $1 \mu\text{M}$ apresentaram-se positivos para a marcação com CFDA, correspondendo à NMPs íntegras, com conteúdo de origem citoplasmática (Figura 5).

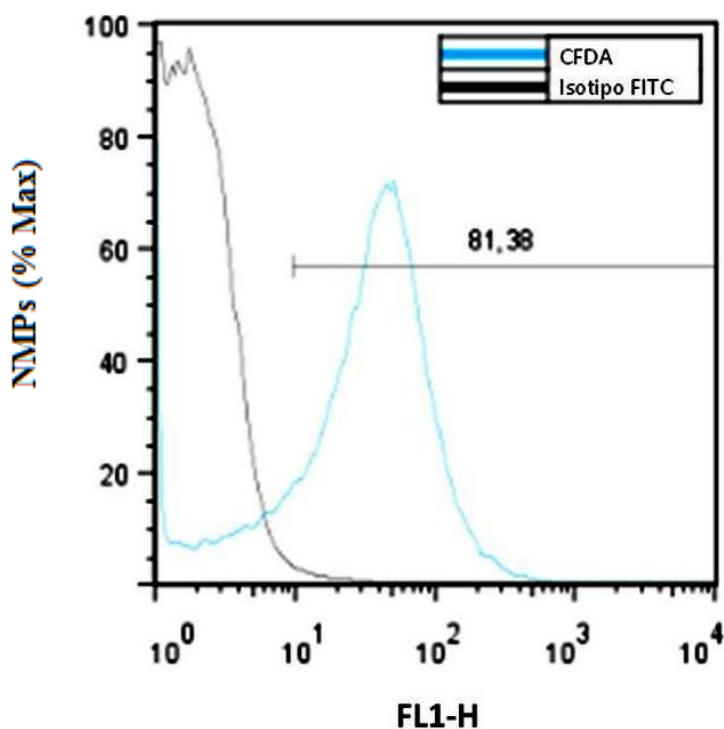


Figura 5: NMPs foram caracterizadas como os eventos fluorescentes verdes (CFDA) adquiridos na citometria de fluxo. As NMPs foram derivadas de 2×10^7 PMNs marcados com CFDA, ativados com $20 \mu\text{M}$ de ionóforo de cálcio A23187. FL1-H: Fluorescência verde.

6.2. Detecção de MPO associada às NMPs

6.2.1. Detecção de MPO por citometria de fluxo

NMPs apresentam em sua superfície proteínas de membrana específicas, tais como a MPO (GASSER *et al.*, 2003). Confirmamos a associação da MPO às NMPs por citometria de fluxo. Cerca de 80% das NMPs adquiridas apresentaram MPO em sua superfície (Figura 6).

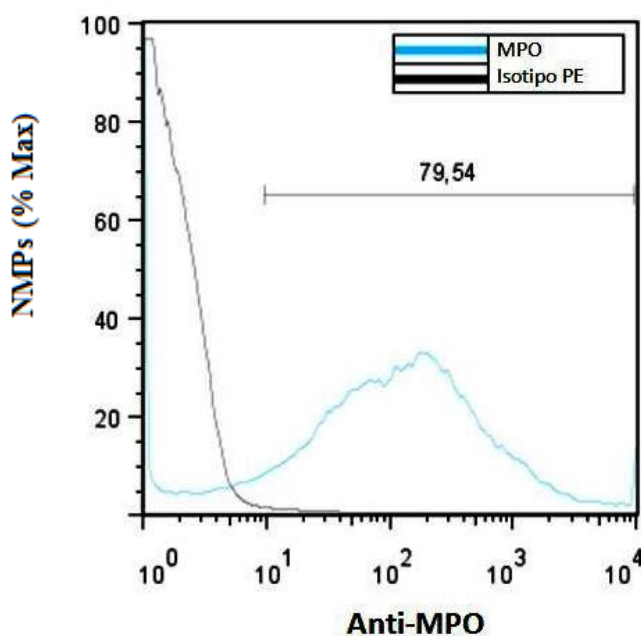


Figura 6: Associação de MPO na superfície das NMPs derivadas de PMNs ativados com ionóforo de cálcio A23187 (2 μ M) por 20 minutos a 37° C. A enzima foi detectada por citometria de fluxo utilizando anticorpos anti-MPO. Resultado representativo de três ensaios realizados.

6.2.2. Produto da atividade da MPO: ácido hipocloroso (HOCl)

Uma vez confirmada a presença da MPO associada às NMPs, investigamos se esta se encontrava cataliticamente ativa. A atividade da MPO foi avaliada indiretamente, por quimioluminescência gerada pela reação de espécie

reativa derivada da MPO com luminol, após adição de H_2O_2 , e na presença de cloro (presente no HBSS).

Inicialmente, a contagem encontrava-se acima de 1300 fótons/segundo (Figuras 7A e 7B). A adição de azida, inibidor de peroxidases, reduziu a contagem de fótons a quantidades basais de aproximadamente 19 fótons/segundo (Figura 7B). A redução na contagem de fótons também foi observada após a adição de taurina, “scavenger” de HOCl, ao sistema. A taurina reage com esta espécie reativa gerando taurina cloramina (DALLEGRI *et al.*, 1990), e reduzindo a quantidade de HOCl livre para reagir com o luminol (Figura 7A).

A MPO é a única enzima humana capaz de gerar HOCl em meio contendo H_2O_2 e cloro (HANSSOM *et al.*, 2006). Por isso, avaliamos se a atividade enzimática observada era decorrente da MPO e se o produto detectado na quimioluminescência era o HOCl .

Os resultados revelaram que a emissão de fótons, durante a leitura, foi dependente de cloro. Este achado, junto à inibição decorrente da adição de azida, confirmou que a atividade foi decorrente da MPO, e que o produto detectado foi o HOCl (Figura 7C). Na presença de cloro, a contagem de fótons foi cerca de 4.000 ± 66 enquanto que na ausência de cloro, ela foi reduzida para 200 ± 16 . Embora o HBSS estivesse ausente de cloro, as NMPs foram ressuspensas em HBSS com cloro, justificando a leitura residual da atividade da MPO. Em ambos os casos, a contagem de fótons foi reduzida a quantidades basais quando azida sódica foi acrescentada ao sistema, semelhante aos valores observados nos controles negativos, HBSS e H_2O_2 .

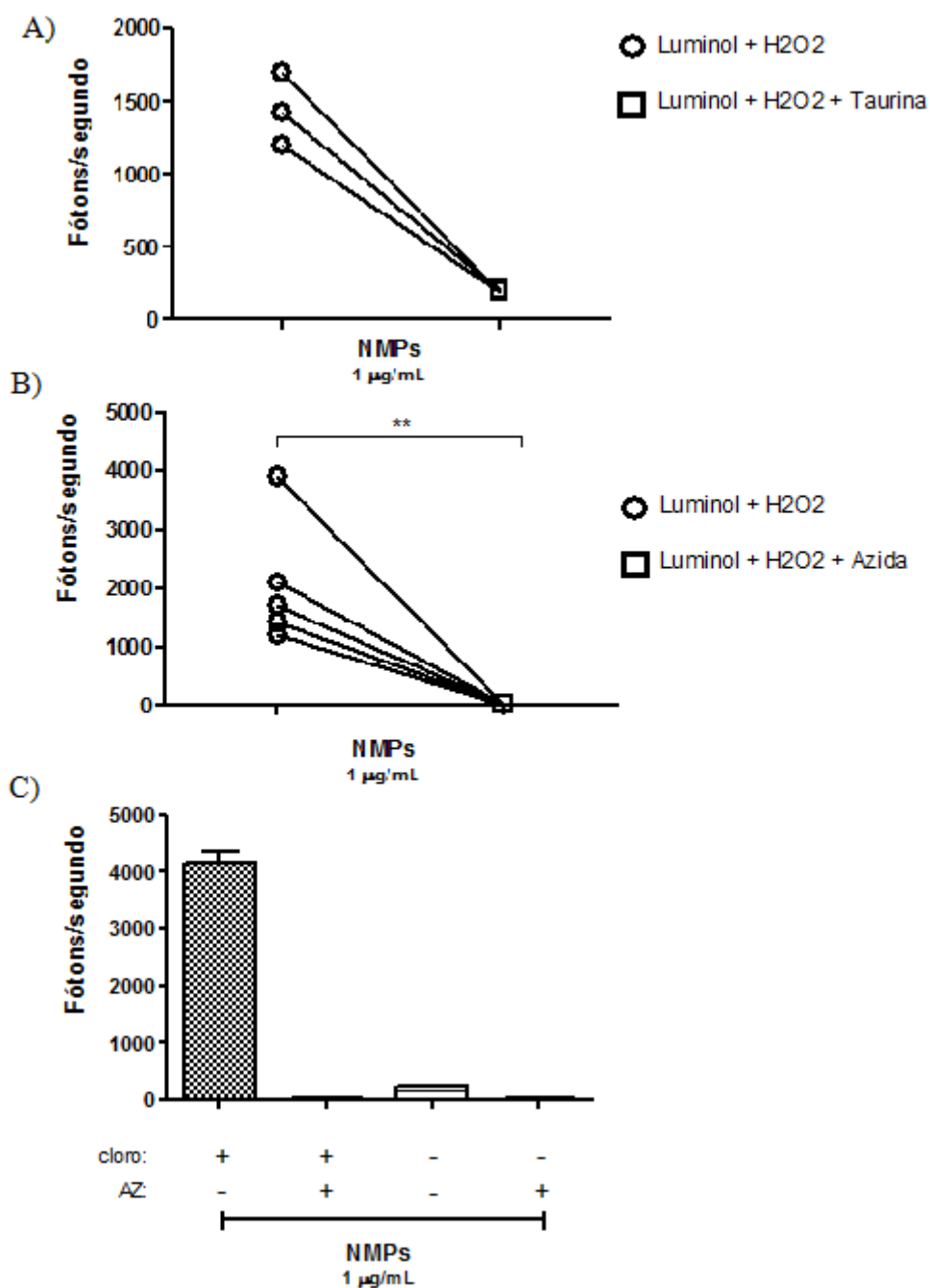


Figura 7: Atividade de mieloperoxidase detectada nas NMPs derivadas de PMNs ativados com 2 μM do ionóforo de cálcio A23187 por 20 minutos a 37° C, em uma reação de quimioluminescência dependente de luminol (20 μM). Cada ponto ou coluna representa a média de fótons de cada duplicata, detectados durante 5 minutos após adição de H_2O_2 (20 μM). (A) Ausência (○) ou presença (□) de taurina (1mM) (n=3); (B) Ausência (○) ou presença (□) de Azida (10 μM) (n=5) (**p<0,01; test t *Sudent* pareado). (C) Ausência ou presença de cloro e Ausência ou presença de azida. Em A e B os pontos estão ligado por linhas para demonstrar a redução na emissão de fótons. Em C, o valor expresso em cada coluna corresponde à média da duplicata e SD.

6.3. Detecção de moléculas de adesão na superfície de NMPs

As micropartículas expressam marcadores de superfície específicos das células que as originaram. Investigamos a presença de moléculas de adesão expressas em neutrófilos, na superfície das NMPs. Detectamos a expressão de CD66b, marcador de granulócitos, em cerca de 30% das NMPs, e de CD62L (L-selectina) em cerca de 60% das NMPs (Figuras 8B e 8C). Não foram detectadas nas NMPs as integrinas CD49d nem CD11a (Figura 8A).

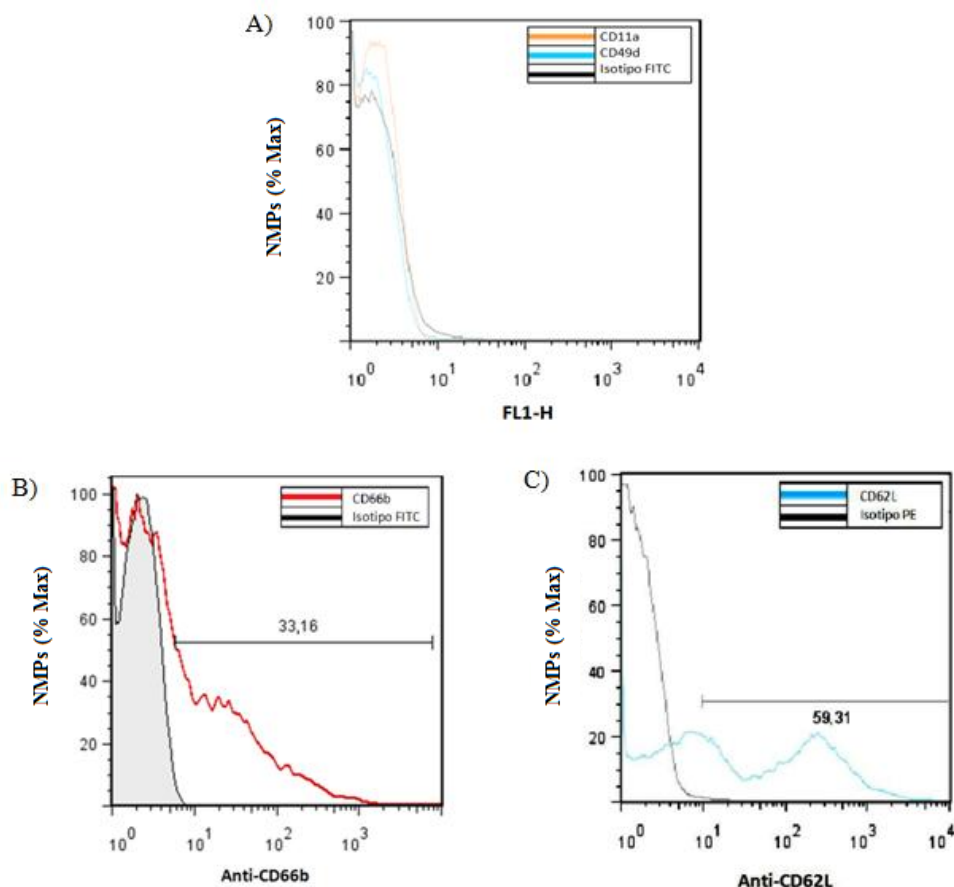


Figura 8: Expressão de moléculas de adesão na superfície das NMPs detectadas por citometria de fluxo. A) Expressão de CD11a-FITC e CD49d-FITC. B) Expressão de CD66b-FITC. C) Expressão de CD62L-PE. Resultado representativo de dois ensaios realizados.

Para avaliar a população de NMPs associadas à MPO que expressam CD45 (marcador de leucócitos), fizemos uma dupla marcação (Figura 9). Cerca de 50% das NMPs positivas para MPO expressaram CD45. Do total de NMPs, 4% apresentaram marcação apenas para CD45 e 40% apresentaram marcação apenas para MPO, demonstrando que nem todas as MPs de leucócitos (tais como NMPs) apresentam este receptor.

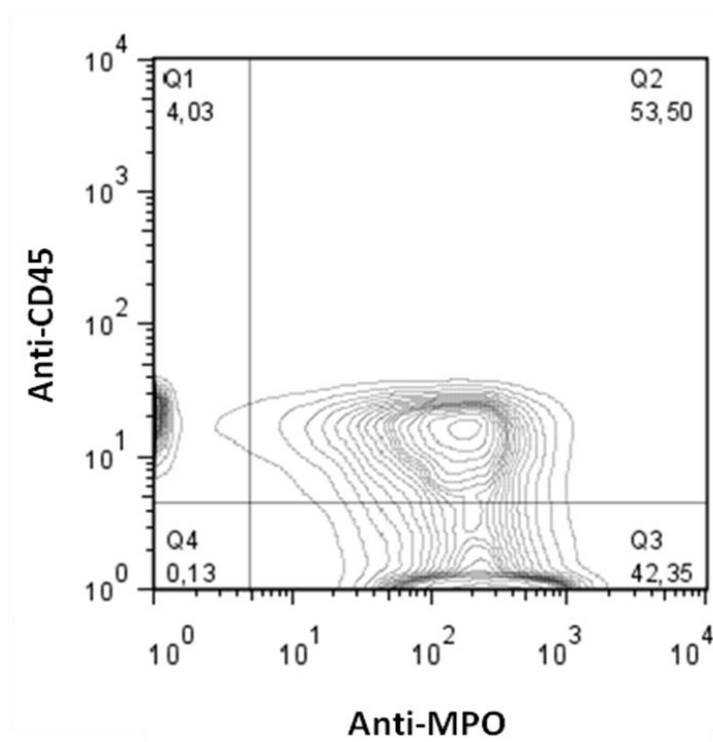


Figura 9: Expressão de CD45-FITC e MPO-PE, em MPs derivadas de PMN ativados com ionóforo de cálcio A23187 (2 μ M), detectada por citometria de fluxo.

6.4. Expressão do receptor Fas (CD95) na superfície das NMPs

Como as NMPs são liberadas a partir da ativação celular ou apoptose, investigamos a presença do receptor de apoptose FAS (CD95) na superfície das NMPs. A avaliação, por citometria de fluxo, demonstrou que cerca de 14% das NMPs expressaram CD95 em sua superfície (Figura 10), sugerindo que uma parcela destas NMPs são derivadas de PMN apoptóticos.

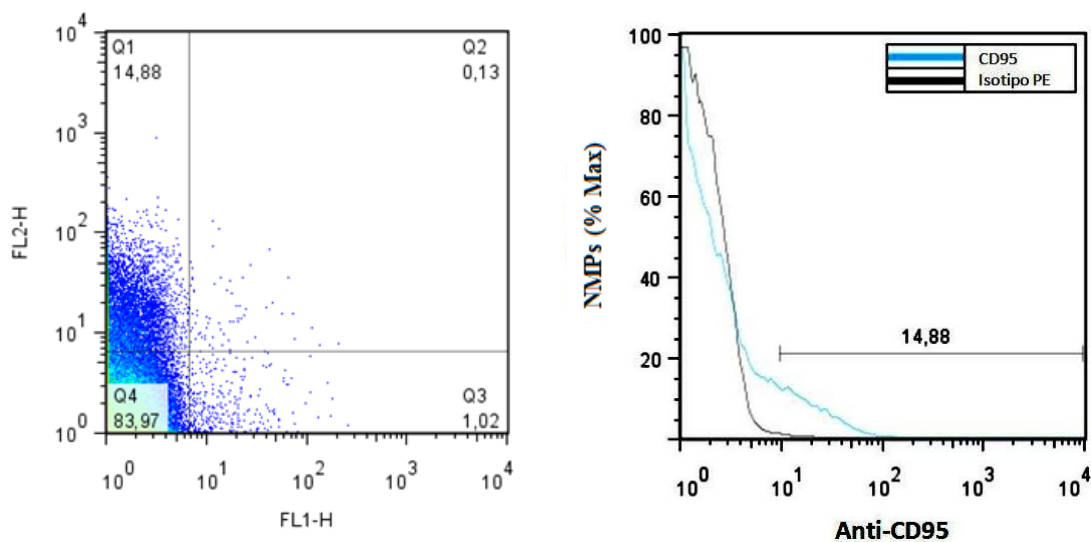


Figura 10: Expressão de CD95 na superfície das MPs derivadas de PMNs ativados com 2 μ M de ionóforo de cálcio A23187, detectada por citometria de fluxo. FL1: fluorescência verde; FL2: fluorescência vermelha.

6.5. Detecção de fosfatidilserina na superfície de NMPs

Por citometria de fluxo, demonstramos que cerca de 20% das NMPs ligaram-se à anexina V, o qual se liga à FS em meio contendo cálcio (AHN *et al.*, 2004) (Figura 11). Esta ligação foi impedida em salina livre de cálcio, sugerindo que NMPs derivadas de PMN ativados expressam fosfatidilserina em sua superfície.

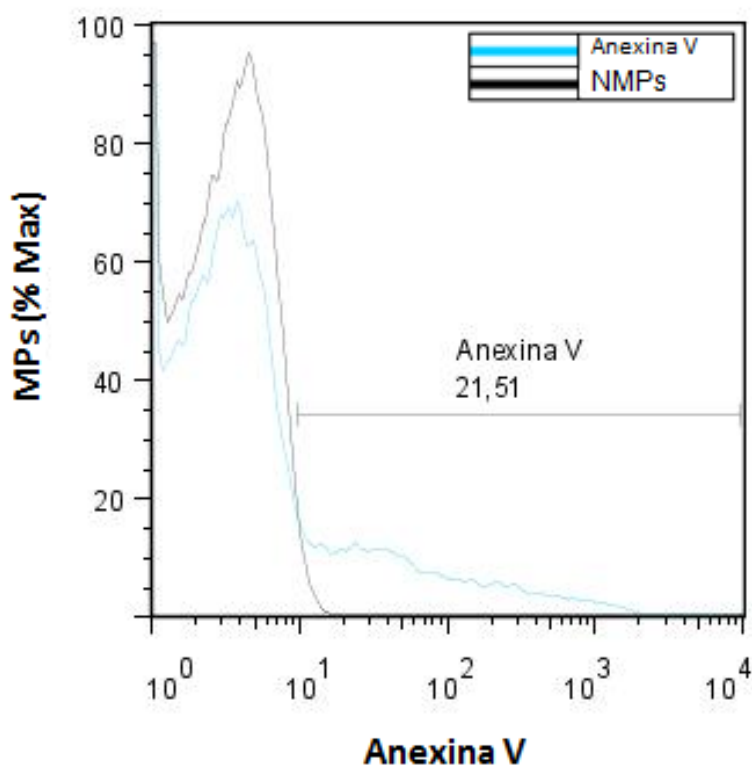


Figura 11: Expressão de fosfatidilserina (NMPs ligadas à anexina V) em NMPs derivadas de PMNs ativados com ionóforo de cálcio A23187 (2 μ M) detectada por citometria de fluxo. Como controle, as NMPs foram incubadas com anexina V, na ausência do cálcio. Resultado representativo de dois ensaios realizados.

6.6. Tratamento das células endoteliais com NMPs

6.6.1. NMPs aderem às RAEC

Nossos resultados anteriores demonstraram que NMPs apresentam CD62L, o que confere a estas micropartículas propriedades adesivas. Assim, investigamos se as NMPs aderiam às células endoteliais. Para este ensaio, incubamos células endoteliais da aorta de coelho (RAEC), previamente marcadas com 2 μ M de PKH26 (fluorescência vermelha), por 6 minutos (em estufa a 37 °C e 5% de CO₂), com 20 μ M de H₂O₂ e 5 μ g/mL de NMPs derivadas de PMNs previamente marcados com CFDA (fluorescência verde). A cultura foi avaliada em microscopia de fluorescência (Figura 12). O resultado revelou que as NMPs aderiram às células endoteliais, na presença de H₂O₂. A adesão não foi observada em células incubadas com NMPs, na ausência de H₂O₂ (dados não mostrados).

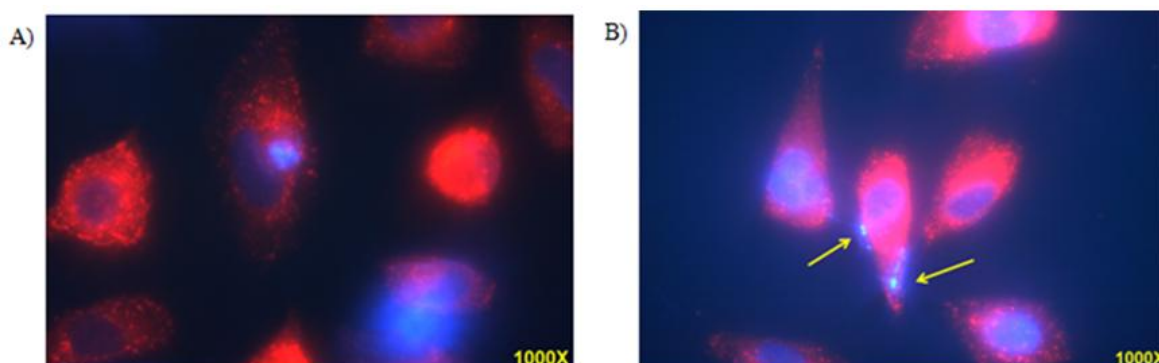


Figura 12: Associação de NMPs derivadas de PMNs marcados com CFDA (fluorescência verde), ativados com ionóforo de cálcio A23187, na superfície da cultura de RAEC. A) Cultura de RAEC marcadas com PKH26 (fluorescência vermelha), na ausência de NMPs. B) Cultura de RAEC incubada com 1 μ g/mL de NMPs e 20 μ M de H₂O₂ por 6 minutos, e posteriormente lavadas duas vezes com HBSS pré-aquecido. Em ambos os casos, as células foram fixadas em formaldeído 1,7 mM por 8 minutos em estufa a 37°C e 5% de CO₂, e observadas em microscopia de fluorescência. As setas indicam NMPs aderidas à RAEC. A fluorescência azul, observada nos núcleos das células, decorrente da coloração com DAPI, foi empregada para a identificação automática das células.

6.6.2. MPO associada à superfície da HUVEC

Para investigar se as NMPs são capazes de carrear a MPO para superfície das células endoteliais, investigamos a associação da MPO de NMPs com a superfície das células HUVEC para avaliar se a MPO se mantinha ativa na superfície endotelial (Figura 13). Depois de atingida a confluência de 80%, as culturas foram tratadas com as NMPs por 6 minutos, e em seguida, lavadas com HBSS, para a retirada de MPs não aderentes. Após ser acrescentado HBSS novo acrescido de 20 μM de H_2O_2 , as células endoteliais mantiveram a atividade da MPO detectada antes da lavagem, sugerindo que as NMPs carregaram a MPO para a superfície das células endoteliais.

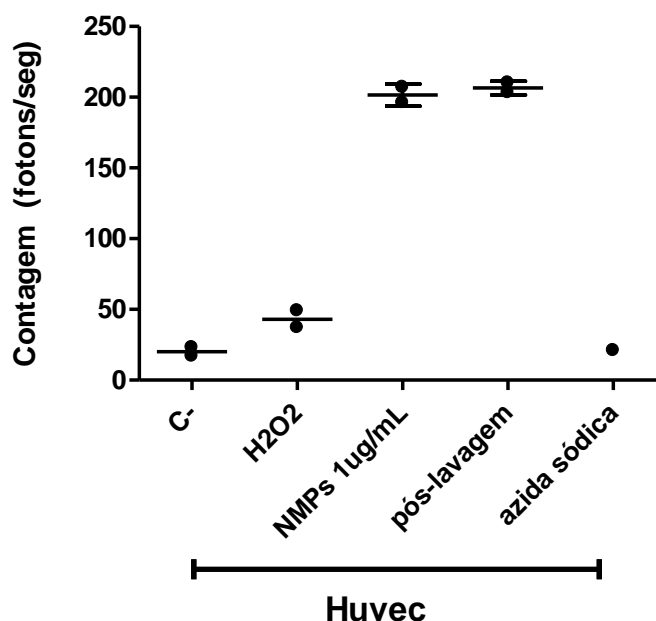


Figura 13: Detecção, por quimioluminescência, da atividade da MPO na superfície endotelial após incubação da HUVEC com NMPs. As células foram incubadas com 1 $\mu\text{g/mL}$ de NMPs e 20 μM de H_2O_2 por 6 minutos. Em seguida, elas foram lavadas duas vezes com HBSS pré-aquecido, e um novo HBSS foi acrescentado juntamente com 20 μM de H_2O_2 e 20 μM de luminol. A placa foi lida 10 minutos. Exceto o ensaio com a azida sódica, cada ponto representa a média de dois ensaios diferentes e SD. Resultado representativo de dois ensaios realizados

6.6.3. Alterações morfológicas da cultura de HUVEC

Como os resultados dos ensaios anteriores sugerem que as NMPs aderem às células endoteliais, e a presença da MPO em um meio com cloro e H_2O_2 gera HOCl, fomos investigar se as NMPs induzem alteração na morfologia das HUVEC. Após análise das células incubadas com NMPs, em microscopia de contraste de fase, observamos que a incubação de HUVEC com 0,5 e 1 $\mu\text{g/mL}$ de NMPs não induziu mudanças morfológicas, durante 16 minutos de incubação. Entretanto, no mesmo intervalo de tempo, mas em uma concentração cinco vezes maior de NMPs, cerca de $20\% \pm 3\%$ células sofreram mudanças visíveis, com redução do volume e formação de bolhas em sua superfície (Figura 14). A inclusão de taurina, um “scavenger” de HOCl, ao sistema, reduziu o número de células com estas alterações para $8\% \pm 0,01\%$. Esta redução da lesão celular pode ser observada na Figura 15.

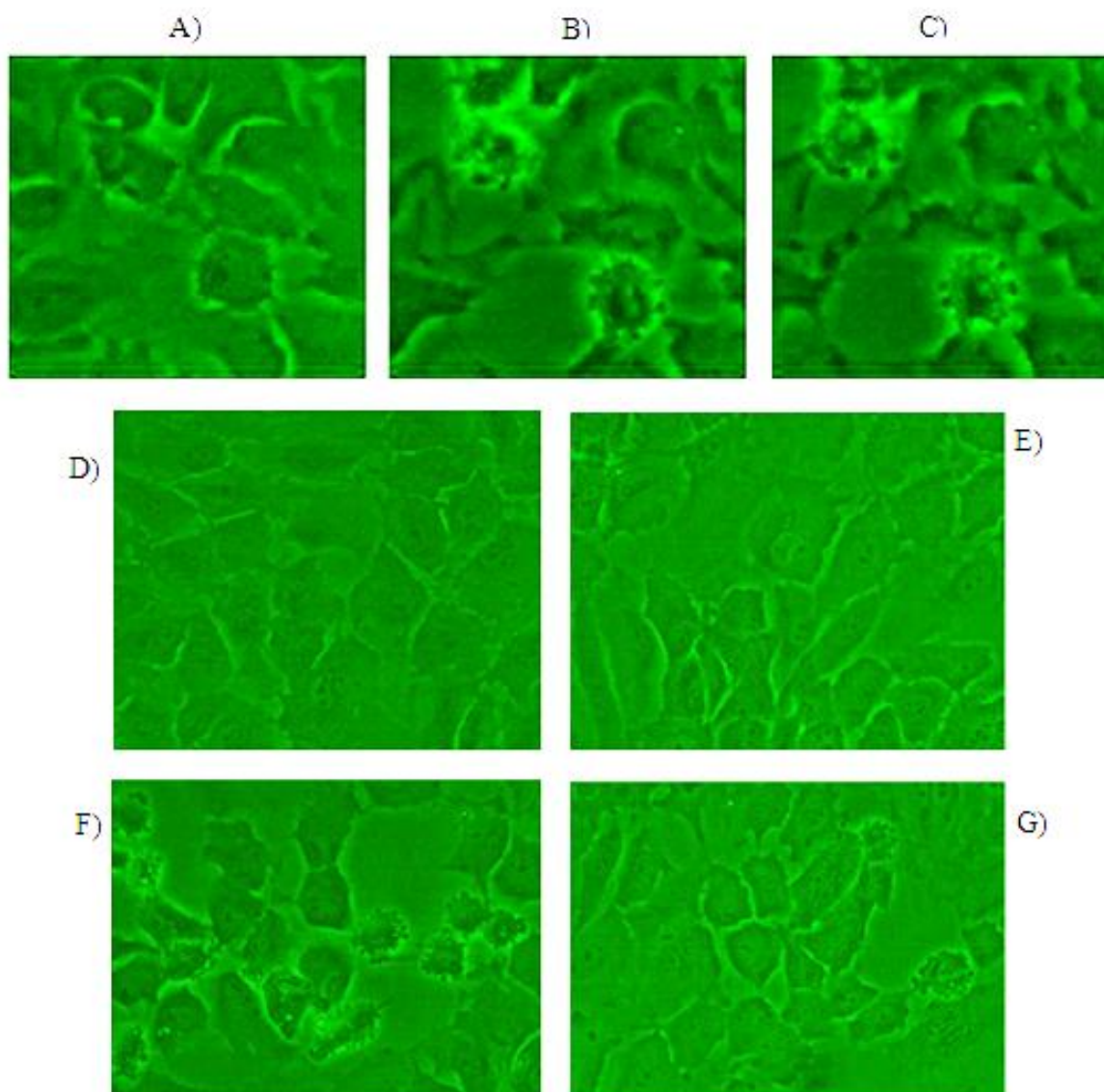


Figura 14: Morfologia de HUVEC avaliadas em microscopia por contraste de fase. As fotos A, B e C correspondem à HUVEC incubada com 5 μ g/mL de NMPs e 20 μ M de H₂O₂ após 2, 8 e 16 minutos, respectivamente; D) Controle (HUVEC pura); E) HUVEC tratada com 20 μ M de H₂O₂; F) HUVEC tratada com 5 μ g/mL de NMPs e 20 μ M de H₂O₂; G) HUVEC tratada com 5 μ g/mL de NMPs, 20 μ M de H₂O₂ e 1 mM de taurina. As fotos D-G foram tiradas após 16 minutos de incubação apenas com HBSS ou HBSS e os diferentes estímulos. Todas as fotos foram tiradas em um aumento de 200x, sendo que as figuras A-C foram aumentadas em zoom para facilitar a visualização das bolhas na superfície. Cada fotografia é representativa de 3 ensaios diferentes (n=2).

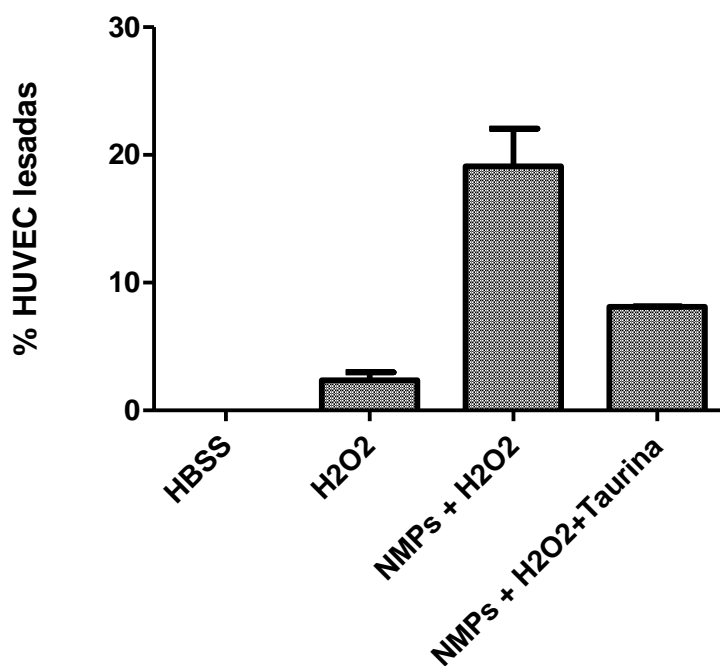


Figura 15: Porcentagem de HUVEC lesadas após incubação com 5 μ g/mL de NMPs, 20 μ M de H₂O₂, na presença ou ausência de 1 mM de taurina. Cada coluna representa a média de três ensaios diferentes e SD.

Foi feita a leitura do sistema anterior, observado em microscópio de contraste de fase, no aparelho de quimioluminescência. A HUVEC incubada com 5 μ g/mL de NMPs, na presença de taurina 1 mM, resultou na redução na contagem de fótons (Figura 16), reforçando a hipótese de que as alterações provocadas na HUVEC pelas NMPs são decorrentes da atividade da MPO.

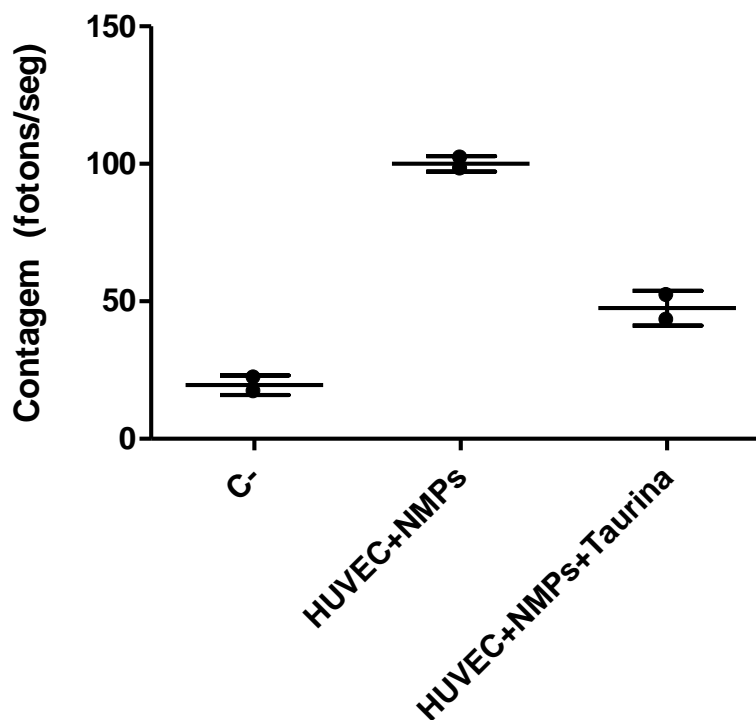


Figura 16: Atividade de MPO das NMPs incubadas com HUVEC. Detecção da atividade de MPO após incubação de HUVEC com 20 μ M de luminol, 5 μ g/mL de NMPs, 20 μ M de H₂O₂, na presença ou ausência de 1 mM de taurina. Cada ponto representa a média de dois ensaios diferentes e SD.

6.6.4 Perda da integridade da membrana plasmática em HUVEC

Como vimos no item 6.6.3, a incubação de HUVEC com NMPs induziu alterações morfológicas nas células. Sendo assim, fomos investigar se estava ocorrendo perda da integridade da membrana plasmática destas células. A integridade da membrana plasmática de HUVEC foi avaliada em microscopia de fluorescência. A cultura foi incubada com 2,5 ou 5 μ g/mL de NMPs e 20 μ M de H₂O₂, por 30 minutos; em seguida, lavada duas vezes com HBSS, e incubada

novamente em meio RPMI completo por 10h, em estufa a 37 °C e 5% de CO₂. Após este período, a cultura foi lavada com HBSS e incubada com a solução de sondas fluorescentes (CFDA e PI) por 10 minutos em estufa a 37 °C e 5% de CO₂. A cultura foi lavada novamente para retirada do excesso das sondas, e incubadas com formaldeído 1,7 mM, por 8 minutos em estufa a 37 °C e 5% de CO₂ (Figura 17). Conforme demonstrado nos resultados, as NMPs induziram perda da integridade da membrana plasmática da HUVEC, na presença do H₂O₂, o que não foi observado na presença de azida, inibidor da MPO. A lesão na membrana sugere fortemente que as NMPs induziram morte celular por necrose, em um mecanismo dependente da atividade da MPO.

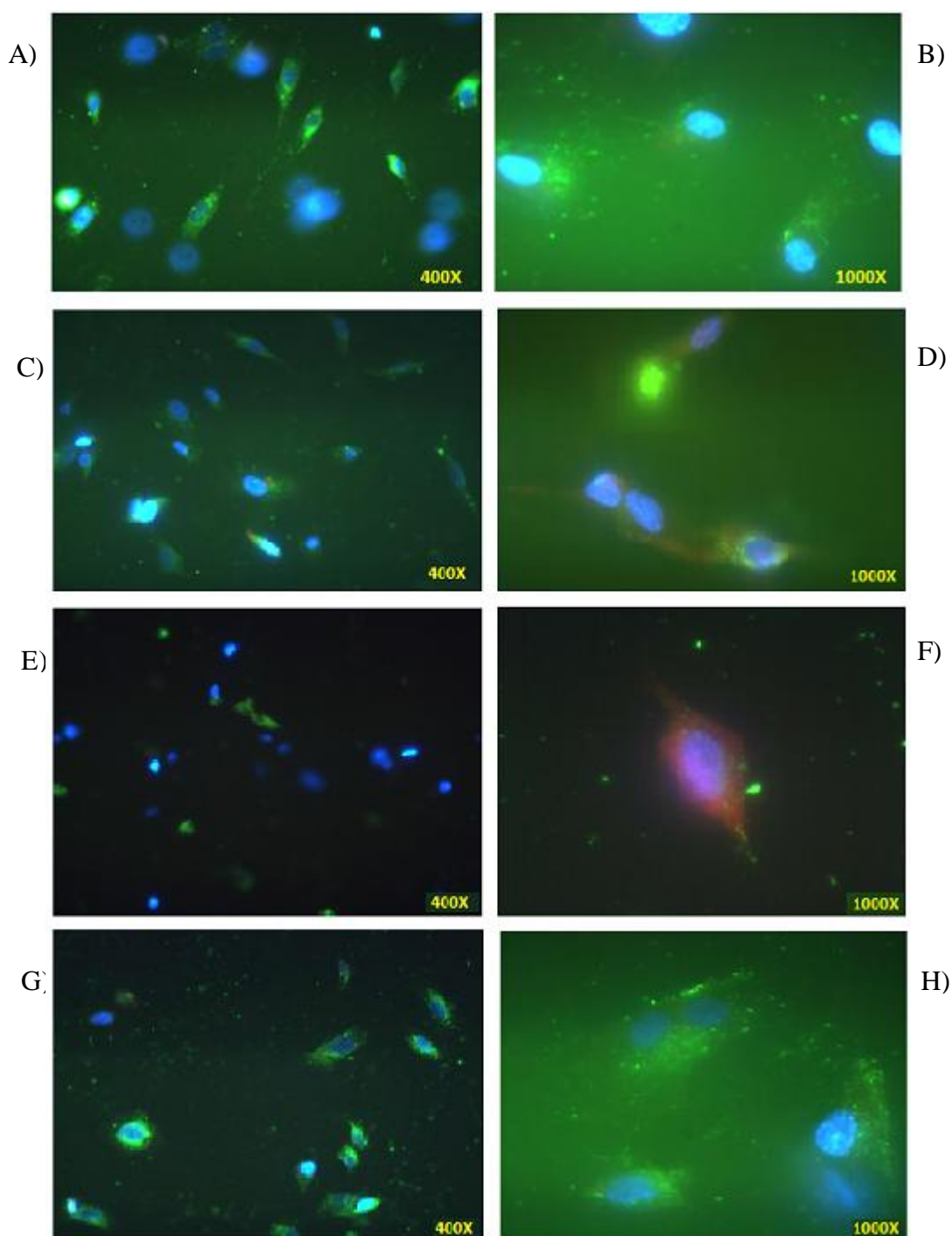


Figura 17: Perda da integridade da membrana plasmática das células HUVEC após incubação com NMPs. A e B são os controles (HUVEC incubada com HBSS); C e D, HUVEC incubada com 2,5 µg/mL de NMPs e 20 µM de H₂O₂; E e F, HUVEC incubada com 5 µg/mL de NMPs e 20 µM de H₂O₂; G e H, HUVEC incubada com 5 µg/mL de NMPs, 20 µM de H₂O₂ e azida sódica 10 µM. DAPI: fluorescência nuclear azul; CFDA: diacetato de carboxifluoresceína (fluorescência verde indicando o citoplasma); PI: iodeto de propídio (fluorescência vermelha indicando lesão da membrana plasmática). Resultado representativo de três ensaios diferentes.

7. DISCUSSÃO

No presente estudo nós investigamos a participação das NMPs, derivadas de PMNs ativados, na lesão das células endoteliais vasculares. Os principais achados deste estudo relacionam-se a muitas propriedades de vesículas liberadas por PMNs já descritas em outros trabalhos, tais como presença de MPO em sua superfície (HESS *et al.*, 1999); expressão de moléculas de adesão e adesão às células endoteliais (GASSER *et al.*, 2003). Entretanto, uma série de propriedades ainda não foi descrita para NMPs, como sua participação no transporte de MPO para as células endoteliais vasculares, expressão do receptor FAS/CD95, e seu potencial em lesar estas células.

MPs são vesículas liberadas durante as fases iniciais de apoptose ou ativação celular (MALLAT *et al.*, 1999; BEYER & PISETSKY, 2010). No presente trabalho, obtivemos as MPs derivadas de PMNs (NMPs) ativados com ionóforo de cálcio A23187. Este é amplamente utilizado para induzir a liberação de MPs *in vitro*, já que o Ca^{2+} intracelular é reconhecido como um segundo mensageiro envolvido na liberação de MPs (HESS *et al.*, 1999; CERRI *et al.*, 2006).

Analizamos as NMPs, em citometria de fluxo, como eventos fluorescentes marcados com PKH26 (tecnologia patenteada cujo princípio consiste na incorporação de moléculas alifáticas de fluorescência vermelha na bicamada lipídica celular), tendo a região da *gate* de NMPs definida por calibradores com 1 μ m de diâmetro (Figura 1). Esta estratégia para a identificação de MPs em citometria de fluxo foi padronizada pelo grupo (MEIRELLES, 2009) a fim de diferenciar as MPs dos ruídos (“background” eletrônico) normalmente presentes na visualização dos eventos, durante aquisição no FACSorter. A dificuldade em

se analisar as MPs por citometria é decorrente do fato destes instrumentos convencionais serem projetados para analisar células que são 10 a 1000 vezes maiores que as MPs (ARDOIN *et al.*, 2007). Assim, as NMP foram consideradas como eventos fluorescentes em uma região determinada com o auxílio de calibradores.

As preparações de NMPs foram avaliadas quanto à sua qualidade e pureza, por microscopia eletrônica de contraste negativo (Figura 2A) e microscopia eletrônica de varredura (Figura 2B). Demonstramos que as amostras de NMPs obtidas não apresentaram contaminação com debris celulares, e as estruturas observadas apresentaram as mesmas características previamente descritas: estruturas arredondadas, de tamanhos variados (BEYER & PISETSKY, 2010).

Utilizando microscopia de varredura (MEV) e transmissão (MET), nós demonstramos que NMPs são vesículas derivadas de membrana plasmática e apresentam tamanho heterogêneo, de acordo com a literatura (ZWAAL & SCHROIT, 1997). Observamos, em nossas amostras, duas faixas mais eletrodensas circundando uma região menos eletrodensa, o que reforça a eficiência da nossa obtenção: vesículas arredondadas, oriundas da bicamada lipídica (Figuras 3A e 3B), com diâmetro menor do que 1 μm (Figura 4).

Na obtenção de MPs, é importante distinguí-las de corpos apoptóticos. Estes são liberados ao final do processo apoptótico, enquanto as MPs são liberadas nas fases iniciais (BEYER & PISETSKY, 2010). Das amostras de NMPs analisadas, descartamos a presença de corpos apoptóticos, pois, na análise por MET, não detectamos organelas (preservadas ou parcialmente degradadas), em

seu interior, característica comum em corpos apoptóticos (KERR & HARMON, 1978 *Apud* ALBANESE *et al.*, 1998).

Nosso protocolo de obtenção de NMPs não afetou a integridade das mesmas (Figura 5), pois a perda da integridade da membrana levaria à redução ou perda da fluorescência para o meio circundante, como observado em células lesadas (HARRISON & VICKERS, 1990). Nossos achados reforçam outros trabalhos que NMPs são vesículas íntegras que carregam, em seu interior, componentes citoplasmáticos (ZWAAL & SCHROIT, 1997).

Uma das mais fascinantes características já descritas das NMPs é sua associação com proteínas específicas de membrana tais como MPO (HESS *et al.*, 1999; GASSER *et al.*, 2003). Em nosso estudo, confirmamos esta associação diretamente, por citometria de fluxo (Figura 6), e, indiretamente, pela atividade da MPO detectada por quimioluminescência (Figura 7). Em nosso ensaio, ao ser acrescentado azida sódica, inibidor de peroxidases (KLEBANOFF, 1970), a atividade enzimática foi inibida, atingindo valores basais. De maneira semelhante, a contagem de fótons/segundo do sistema foi reduzida ao ser acrescentado taurina, um “scavenger” de HOCl (DALLEGRI *et al.*, 1990). Estes achados reforçam os trabalhos de Gasser e colaboradores (2003), de que a MPO apresenta-se cataliticamente ativa associada às NMPs.

Demonstramos que PMNs ativados com ionóforo de cálcio A23187 liberam NMPs associadas à MPO, enquanto que outros estudos demonstraram a mesma associação em NMPs derivadas de PMNs ativados com fMLP (HESS *et al.*, 1999). Portanto, embora o tipo de estímulo afete o fenótipo das MPs

(BERNIMOULING *et al.*, 2009), a associação da MPO às NMPs depende do estímulo utilizado.

A MPO é a única enzima humana capaz de gerar HOCl em meio contendo cloreto e H₂O₂ (HANSSOM *et al.*, 2006). Neste estudo, demonstramos por quimioluminescência, que em meio contendo o sistema MPO-H₂O₂-Cl⁻, a quantidade de fótons/segundo detectada foi cerca de 20x maior do que em meio ausente de cloro (Figura 7C). Este resultado indica que o produto da MPO, detectado na quimioluminescência, foi o HOCl. A atividade residual da MPO detectada neste ensaio é justificada pela presença de cloreto no HBSS utilizado na ressuspensão das NMPs. Em ambos os casos, a contagem de fótons foi reduzida a valores basais após adição de azida sódica ao sistema, reforçando que a atividade detectada foi decorrente da MPO.

A liberação de vesículas contendo moléculas de superfície celular pode fornecer mecanismos de comunicação entre as células (HUGEL *et al.*, 2005). Um dos parâmetros para determinar os efeitos fisiológicos das MPs é a avaliação de sua composição protéica que pode variar a depender de sua origem e do estímulo utilizado na sua formação (DISTLER *et al.*, 2005).

Neste contexto, conseguimos identificar a expressão de CD66b e CD62L (L-selectina) na superfície das NMPs, demonstrando que as NMPs apresentam um potencial de aderir às células endoteliais e migrar para o espaço subendotelial. A L-selectina está envolvida no tráfego de neutrófilos para as células endoteliais ativadas (SHIGETA *et al.*, 2008), e extravasamento destes para o espaço subendotelial (HICKEY *et al.*, 2000). Gasser e colaboradores (2003) demonstraram que NMPs apresentam CD62L e aderem às células endoteliais. O CD66b é uma molécula de adesão expressa especificamente em

granulócitos ativados, e importante para adesão neutrofílica ao endotélio (NAIR & ZINGDE, 2001). A presença de CD66b, juntamente com a CD62L, reforça as propriedades adesivas das NMPs ao endotélio.

Muitos trabalhos vêm demonstrando que NMPs expressam integrinas tais como CD11a, CD11b, CD18 (PLUSKOTA *et al.*, 2008; GASSER *et al.*, 2003). Fizemos marcações com anticorpos para CD11a (Integrina α L) e CD49d (Integrina α 4), e surpreendentemente não detectamos a expressão de integrinas nas NMPs analisadas (Figura 8A). Possivelmente, o estímulo utilizado para promover a vesiculação não induziu a expressão de integrinas, pois MPs geradas de PMNs ativados com fMLP expressam CD11a (GASSER *et al.*, 2003), e como discutido anteriormente, o tipo de estímulo pode ser fator determinante para definir o fenótipo de MPs. Entretanto, este achado levanta a possibilidade de outros estudos estarem sub-estimando características fenotípicas não apenas de NMPs mas de MPs de diversas origens, chamando a atenção para o problema de se escolher um único marcador para caracterizar as MPs.

Detectamos a coexpressão, na superfície de NMPs, de MPO e CD45, uma molécula tipicamente expressa em leucócitos (Figura 9). Observamos que cerca de 50% de NMPs que expressaram MPO apresentaram CD45 em sua superfície. Este achado demonstra que CD45, embora seja uma molécula comum entre os leucócitos, não necessariamente estará expresso em todas as MPs derivadas destas células, não sendo, portanto, um bom marcador para definir a população destas MPs.

A expressão de CD66b sobre a superfície das NMPs é muito utilizada para defini-las como vesículas derivadas de PMNs ativados (GASSER *et al.*, 2003; GASSER & SCHIFFERLI, 2005; LEROYER *et al.*, 2007). Em nosso estudo, cerca

de 30% delas expressaram este marcador em sua superfície, demonstrando que esta marcação não retrata a população de NMPs presente. Entretanto, nossas marcações refletem que a utilização do anticorpo para MPO é uma boa estratégia para definir a população de MPs que apresentem MPO em sua superfície como NMPs (HESS *et al.*, 1999) e MPs de monócitos (MEIRELLES, 2009).

Sabe-se que as células liberam MPs após ativação celular ou apoptose (MALLAT *et al.*, 1999). No presente trabalho, o estímulo utilizado para ativar os PMNs foi o ionóforo de cálcio A23187 (Gasser *et al.*, 2003), embora o mesmo possa induzir apoptose em leucócitos (NING & MURPHY, 1993). Resolvemos, então, investigar se havia NMPs derivadas de PMNs apoptóticos, após a exposição ao A23187.

Surpreendentemente, identificamos a expressão do receptor FAS (CD95) na superfície de NMPs (Figura 10). Embora Albanese e colaboradores (1998) tenham demonstrado a presença deste receptor em MPs derivadas de células de adenocarcinoma humano apoptóticas, este é o primeiro estudo que demonstra a expressão de CD95 em NMPs.

É necessário avaliar a presença deste receptor em MPs, pois alguns trabalhos (KNIPPING *et al.*, 1995) utilizam técnicas de obtenção de FAS solúvel semelhantes aos de obtenção de MPs circulantes. Este fato, aliado à descoberta de que MPs podem expressar este receptor, sugere que o FAS solúvel encontrado no soro humano (CHEN *et al.*, 2007) pode, em parte, estar associado às MPs circulantes, podendo, na realidade, estar superestimando a quantidade real de FAS solúvel.

A maioria dos receptores solúveis comumente retém a atividade de ligação ao ligante e compete, portanto, pelo ligante, inibindo a função do receptor.

Estudos recentes têm demonstrado que FAS solúvel fisiologicamente limita a apoptose induzida pela associação entre o receptor FAS e o ligante FAS (HUGHES & CRISPE, 1995; ALBANESE *et al.*, 1998), possivelmente compatível com NMPs circulantes expressando este receptor.

Entretanto, outros estudos demonstram que níveis elevados de FAS solúvel ocorreram paralelamente ao aumento de apoptose de linfócitos em paciente com lúpus eritematoso sistêmico (SILVESTRIS *et al.*, 2002). Como encontramos a expressão de CD95 e moléculas de adesão em NMPs, estas poderiam aderir a outras células, tais como as células endoteliais, induzindo a apoptose nas mesmas. Este achado reforça a necessidade de se investigar a participação destas e de outras MPs na apoptose.

PMNs ativados com ionóforos de cálcio liberam NMPs (HESS *et al.*, 1999), sendo que muitas delas expressam FS em sua superfície (ZWAAL & SCHROIT, 1997), resultante da perda da assimetria da membrana celular. Investigamos a associação de FS nas NMPs pela ligação à anexina V. Como esta ligação só é possível na presença do cálcio, nossas observações de que 20% das nossas NMPs ligaram-se à anexina V sugere fortemente que elas expressam fosfatidilserina em sua superfície (Figura 11), como encontrado em outros trabalhos (GASSER *et al.*, 2003). Este achado confere a este grupo de MPs propriedades pró-coagulantes (MESRI & ALTIERI, 1999).

Entretanto, a expressão da FS na superfície externa das MPs não é um fenômeno que sempre ocorre (BERNIMOULIN *et al.*, 2009). Estudos com células endoteliais sugerem que uma grande quantidade de MPs liberadas de células ativadas ou apoptóticas não se ligam a quantidades mensuráveis de anexina V (proteína com capacidade de se ligar fortemente aos fosfolípidios de carga

negativa, como a FS, na superfície celular na presença de íons cálcio), indicando que a expressão de FS sobre elas está muito baixa ou ausente (AHN *et al.*, 2004; PILZER *et al.*, 2005). Portanto, nossos resultados enfatizam que a expressão de FS não é a forma ideal para quantificar MPs.

Em acordo com outros trabalhos (GASSER *et al.*, 2003), as NMPs aderiram às células endoteliais (Figura 12); entretanto, só observamos a adesão em meio contendo H₂O₂. Não detectamos integrinas nas amostras obtidas de NMPs, e a adesão por L-selectina ocorre essencialmente sobre endotélio previamente ativado (LEY *et al.*, 1993), sugerindo que a adesão das NMPs às células endoteliais foi dependente da sua ativação prévia em meio contendo o sistema cloreto-H₂O₂-MPO.

A adesão nas NMPs às células endoteliais pode ser uma explicação para a origem de MPO no ambiente aterosclerótico, já que durante a transformação de monócitos circulantes para macrófagos teciduais, ocorre a perda da capacidade destes produzirem MPO (NAKAGAWARA *et al.*, 1961). Alguns estudos, entretanto, demonstram que alguns subgrupos de macrófagos retêm MPO em lesões ateroscleróticas (DAUGHERTY *et al.*, 1994), o que poderia ser justificado pela endocitose de partículas com MPO (KLEBANOFF, 2005). Além disso, a maioria das MPs encontradas em placas ateroscleróticas são derivadas de leucócitos (LEROYER *et al.*, 2007), e 3-clorotirosina, um produto derivado de reações mediadas pela MPO, encontra-se continuamente presente nestas lesões (HAZEN & HEINECKE, 1997). Estes achados sugerem que MPs associadas à MPO podem estar envolvidas não apenas na inflamação local como no desenvolvimento destas lesões.

Observamos que as NMPs direcionaram MPO para a superfície das células endoteliais *in vitro* (Figura 13). Nosso resultado está de acordo com os achados de Eiserich e colaboradores (2002), cujo trabalho demonstrou a presença de MPO na superfície de células endoteliais e na matriz sub-endotelial. Eles observaram que não havia neutrófilos aderentes, sugerindo que a MPO pode ter sido liberada localmente, seguida de transcitose. A MPO liberada poderia estar associada às MPs, o que favoreceria a adesão e migração para o espaço sub-endotelial, e amplificação da resposta inflamatória local.

O presente estudo, com PMNs ativados em meio contendo H_2O_2 e cloreto, fornece evidências para a toxicidade de HOCl em células endoteliais vasculares. A inibição da toxicidade utilizando azida sódica (KLEBANOFF, 1970) como inibidor da MPO, e taurina (DALLEGRI *et al.*, 1990), como “scavenger” de HOCl, implicou fortemente esta espécie reativa como mediador das reações de toxicidade observadas nas células endoteliais.

Demonstramos que as NMPs, em altas concentrações (5 $\mu\text{g/mL}$), induziram lesão de células endoteliais vasculares humanas em um curto período de tempo (30 minutos). Alguns trabalhos vêm mostrando que baixas concentrações de HOCl induzem apoptose, enquanto concentrações elevadas induzem necrose (VISSERS *et al.*, 1999; SUGIYAMA *et al.*, 2004).

Observamos alterações morfológicas crescentes das células endoteliais, após 2, 8 e 16 minutos de incubação com NMPs (Figuras 14, 15 e 16), com redução do volume celular e bolhas na superfície. Estas alterações foram reduzidas ao ser acrescentado, ao sistema, taurina, sugerindo o papel lesivo do HOCl às células endoteliais. O mesmo foi observado no trabalho de Vissers e colaboradores (1999), ao incubarem células endoteliais humanas com HOCl

purificado. Além de alterações na morfologia celular, observamos perda de integridade da membrana plasmática (Figura 17) após incubação por 30 minutos com NMPs, o que não foi observado na presença de azida sódica. Estes achados sugerem fortemente que as NMPs induziram morte celular por necrose, em um mecanismo dependente do sistema MPO-H₂O₂-cloreto. Entretanto, embora não tenham sido observados, efeitos apoptóticos sobre a HUVEC não podem ser descartados.

Este é um trabalho original, uma vez que não há estudos prévios mostrando que células endoteliais vasculares humanas, expostas a NMPs, resultam neste espectro de resultados. Nossos achados apresentam implicações fisiopatológicas para as células endoteliais. Estas células são intimamente envolvidas no recrutamento de leucócitos e, em condições inflamatórias, são continuamente expostas a neutrófilos e monócitos estimulados e, portanto, à micropartículas associadas à MPO. A proposta de que NMPs podem induzir necrose de células endoteliais, e possivelmente de outras células circundantes, no processo aterosclerótico, decorrente da ação do HOCl, pode ser um mecanismo alternativo de iniciação da aterosclerose ou desestabilização da placa ateromatosa.

8. CONCLUSÕES

- A MPO encontra-se cataliticamente ativa sobre as NMPs;
- NMPs expressam CD95;
- NMPs aderem às células endoteliais;
- NMPs atuam como carreadoras de MPO para a superfície endotelial;
- NMPs induzem alterações morfológicas e perda da integridade da membrana plasmática de células endoteliais vasculares, em um mecanismo dependente do sistema MPO-H₂O₂-Cl⁻

9. REFERENCIAS

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.

AHN, Y. S.; JY, W.; JIMENEZ, J.J. & HORSTMAN, L. L. (2004). More on: cellular microparticles: what are they bad or good for? **J Thromb Haemost**, 2(7):1215-16.

ALBANESE, J.; METERISSIAN, S.; KONTOGIANNEA, M.; DUBREUIL, C.; HAND, A.; SORBA, S. & DAINIAK, N. (1998). Biologically active fas antigen and its cognate ligand are expressed on plasma membrane-derived extracellular vesicles. **Blood**;91(10):3862-74.

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.

ASSREUY, I.; CUNHA, F.; EPPERLEIN, M.; NORONHA-DUTRA, A.; LIEW, F. & MONCADA, S. (1994) Production of nitric oxide and superoxide by activated macrophages and killing of *L. Major*. **Eur J Immunol**, 24:672-6.

BECKER, R. C. (2001). Anticoagulation and the heart. **J Thromb Thrombolysis**, 12(1):41–52.

BERLINER, J. A. & HEINECKE, J. W. (1996) The role of oxidized lipoproteins in atherosclerosis. **Free Radic Biol Med**, 20:707–28.

BERNAL-MIZRACHI, L.; JY, W.; JIMENEZ, J. J.; PASTOR, J.; MAURO, L. M.; HORSTMAN, L. L.; DE MARCHENA, E. & AHN, Y. S. (2003). High levels of circulating endothelial microparticles in patients with acute coronary syndromes. **Am Heart J**, 145: 962–70.

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.

BEYER, C. & PISETSKY, D. S. (2010). The role of microparticles in the pathogenesis of rheumatic diseases. **Nat Rev Rheumatol**, 6(1):21-9

BOULANGER, C. M.; AMABILE, N. & TEDGUI, A. (2006). Circulating microparticles: a potential prognostic marker for atherosclerotic vascular disease. **Hypertension**, 48(2):180-6.

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**, 286:1910–1915.

CHEN, D. Y.; LAN, J. L.; LIN, F. J. & HSIEH, T. Y. (2007). Elevated levels of soluble Fas (APO-1, CD95), soluble Fas ligand, and matrix metalloproteinase-3 in sera from patients with active untreated adult onset Still's disease. **Clin Rheumatol**, 26(3):393-400.

DALLEGRI, F.; OTTONELLO, L.; BALLESTRERO, A.; BOGLIOLO, F.; FERRANDO, F. & PATRONE, F. (1990). Cytoprotection against neutrophil derived hypochlorous acid: a potential mechanism for the therapeutic action of 5-aminosalicylic acid in ulcerative colitis. **Gut**,31(2):184-6.

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):437-44.

DELOUGHERY, T. G. & GOODNIGHT, S. H.(1993). The hypercoagulable states: diagnosis and management. **Semin Vasc Surg**,6(1):66-74.

De MEYER, G. R.; De CLEEN, D. M.; COOPER, S.; KNAAPEN, M. W.; JANS, D. M.; MARTINET, W.; HERMAN, A. G.; BULT, H. & KOCKX, M. M. (2002). Platelet phagocytosis and processing of beta-amyloid precursor protein as a mechanism of macrophage activation in atherosclerosis. **Circ Res**, 90(11):1197-204.

DIAMANT, M.; NIEUWLAND, R.; PABLO, R. F.; STURK, A.; SMIT, J. W. & RADDER, J. K. (2002). Elevated numbers of tissue-factor exposing microparticles correlate with components of the metabolic syndrome in uncomplicated type 2 diabetes mellitus. **Circulation**, 106: 2442–7.

DISTLER, J. H.; HUBER, L. C.; GAY, S.; DISTLER, O. & PISETSKY, D. S. (2006). Microparticles as mediators of cellular cross-talk in inflammatory disease. **Autoimmunity**, 39:683-90.

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), 2391-4.

ENJETI, A. K.; LINCZ, L. F. & SELDON, M. (2007). Detection and Measurement of Microparticles: An Evolving Research Tool for Vascular Biology. **Semin Thromb Hemost**, 33(8):771-9.

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

GALIS, Z. S.; SUKHOVA, G. K.; LARK, M. W. & LIBBY P. (1994). Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. **J Clin Invest**, 94:2493–2503

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):243-57.

GASSER, O. & SCHIFFERLI, J. A. (2005). Microparticles released by human neutrophils adhere to erythrocytes in the presence of complement. **Exp Cell Res**;307(2):381-7. (TIRAR ESTA REFERENCIA CASO NÃO SEJA USADA)

GALLE, J.; SCHNEIDER, R.; HEINLOTH, A.; WANNER, C.; GALLE, P. R.; CONZELMANN, E.; DIMMELER, S. & HEERMEIER, K. (1999). Lp(a) and LDL induce apoptosis in human endothelial cells and in rabbit aorta: role of oxidative stress. **Kidney Int.**;55(4):1450-61.

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

HARRISON, R. & VICKERS, S. E. (1990). Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **J Reprod Fertil**. 88(1):343-52.

HAZEN, S. L. & HEINECKE, J. W. (1997). 3-Chlorotyrosine, a specific marker of myeloperoxidase-catalyzed oxidation, is markedly elevated in low density lipoprotein isolated from human atherosclerotic intima. **J Clin Invest**,99(9):2075-81.

HAZEN, S. L.; HSU, F. F.; MUELLER, D. M.; CROWLEY, J, R. & HEINECKE, J. W. (1996). Human neutrophils employ chlorine gas as an oxidant during phagocytosis. **J Clin Invest**. 15;98(6):1283-9.

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.

HICKEY, M. J.; FORSTER, M.; MITCHELL, D.; KAUR, J.; DE CAIGNY, C. & KUBES, P. (2000). L-selectin facilitates emigration and extravascular locomotion of leukocytes during acute inflammatory responses in vivo. **J Immunol**; 165(12):7164-70.

HUGEL, B.; MARTÍNEZ, M. C.; KUNZELMANN, C.; FREYSSINET, J. M. (2005). Membrane microparticles: two sides on the coin. **Physiology**, 20, 22–27.

HUGHES, D. P. & CRISPE, N. I. (1995). A naturally occurring soluble isoform of murine fas generated by alternative splicing. **J Exp Med**,182:1395.

JACOBI, J.; SELA, S.; COHEN, H. I.; CHEZAR, J. & KRISTAL, B. (2006). Priming of polymorphonuclear leukocytes: a culprit in the initiation of endothelial cell injury. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**. 290(5):H2051-8.

JEFFE, E. A. ; NACHMAN, R. L. ; BECKER, C. G. & MINICK, C. R. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. **J Clin Invest**, v. 52, n. 11, p. 2745-56, 1973.

JIMENEZ, J. J.; JY, W.; MAURO, L. M.; HORSTMAN, L. L.; SODERLAND, C. & AHN, Y. S. (2003). Endothelial microparticles released in thrombotic thrombocytopenic purpura express von Willebrand factor and markers of endothelial activation. **Br J Haematol**, 123(5):896-902.

KNIPPING, E.; DEBATIN, K. M.; STRICKER, K.; HEILIG, B.; EDER, A. & KRAMMER, P. H. (1995). Identification of soluble APO-1 in supernatants of human B- and T-cell lines and increased serum levels in B- and T-cell leukemias. **Blood**,85(6):1562-9.

KLEBANOFF, S. J.; KINSELLA, M. G. & WIGHT, T. N. (1993). Degradation of endothelial cell matrix heparan sulfate proteoglycan by elastase and the myeloperoxidase-H₂O₂-chloride system. **Am J Pathol**, 143:907–917.

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

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

KERR, J. F. R. & HARMON, B. V. (1978). Definition and incidence of apoptosis: A historical perspective, in Tomei LD, Cope FO (eds): Apoptosis: The Molecular Basis of Cell Death. **Cold Spring Harbor**, p. 7

KREATSOULAS, C. & ANAND, S. S. (2010). The impact of social determinants on cardiovascular disease. **Can J Cardiol**, 26 Suppl C:8C-13C.

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), 772-7.

LEY, K.; TEDDER, T. F. & KANSAS, G. S. (1993). L-selectin can mediate leukocyte rolling in untreated mesenteric venules in vivo independent of E- or P-selectin. **Blood**, 82(5):1632-8.

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

MALLAT, Z.; BENAMER, H.; HUGEL, B.; BENESSIANO, J. STEG, P. G.; FREYSSINET, J. M. & TEDGUI, A. (2000). Elevated levels of shed membrane microparticles with procoagulant potential in the peripheral circulating blood of patients with acute coronary syndromes. **Circulation**, 101:841-3.

MALLAT, Z.; HUGEL, B.; OHAN, J.; LESÈCHE, 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):348-53

MARTIN, S.; TESSE, A.; HUGEL, B.; MARTÍNEZ, M. C.; MOREL, O.; FREYSSINET, J. M. & ANDRIANTSITOHAINA R. (2004). Shed membrane particles from T lymphocytes impair endothelial function and regulate endothelial protein expression. **Circulation**, 109:1653–1659.

MESRI M. & ALTIERI DC. (1998). Endothelial cell activation by leukocyte microparticles. **J Immunol**, 161, 4382–4387.

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), 23111-8.

MEIRELLES, T. Micropartículas derivadas de monócitos como potenciais direcionadoras de mieloperoxidase para superfície endotelial. 73 f. **Dissertação de Mestrado**, Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz/Fiocruz, Salvador, 2009.

NAIR, K. S. & ZINGDE, S. M. (2001). Adhesion of neutrophils to fibronectin: role of the cd66 antigens. **Cell Immunol**; 208(2):96-106.

NICHOLS, B. A. & BAINTON, D. F. (1973) Differentiation of human monocytes in bone marrow and blood. Sequential formation of two granule populations. **Laboratory Investigation**, 29: 27-40.

NING, Z. Q. & MURPHY, J. J. (1993). Calcium ionophore-induced apoptosis of human B cells is preceded by the induced expression of early response genes. **Eur J Immunol**, 23(12):3369-72.

PEPPIN, G. J. & WEISS, S. J. (1986). Activation of the endogenous metalloproteinase, gelatinase, by triggered human neutrophils. **Proc Natl Acad Sci**, 83:4322–4326

PILZER, D.; GASSER, O.; MOSKOVICH, O.; SCHIFFERLI, J. A. & FISHELSON Z. Emission of membrane vesicles: roles in complement resistance, immunity and cancer. **Springer Semim Immun**, v. 27, n. 3, p. 375-87, 2005.

PLUSKOTA, E.; WOODY, N. M.; SZPAK, D.; BALLANTYNE, C. M.; SOLOVIEV, D. A.; SIMON, D. I. & PLOW, E. F. (2008). Expression, activation, and function of integrin alphaMbeta2 (Mac-1) on neutrophil-derived microparticles. **Blood**,112(6):2327-35.

PODREZ, E. A.; FEBBRAIO, M.; SHEIBANI, N.; SCHMITT, D.; SILVERSTEIN, R.; HAJJAR, D. P.; COHEN, P. A.; FRAZIER, W. A.; HOFF, H. F. & HAZEN, S. L. (2000). The macrophage scavenger receptor CD36 is the major receptor for LDL recognition following modification by monocyte-generated reactive nitrogen species. **J Clin Invest**, 105:1095–108.

PRESTON, R. A.; JY, W.; JIMENEZ, J. J.; MAURO, L. M.; HORSTMAN, L. L.; VALLE, M.; AIME, G. & AHN, Y. S. (2003). Effects of severe hypertension on endothelial and platelet microparticles. **Hypertension**, 41: 211–7.

ROSS, R. (1999). Atherosclerosis--an inflammatory disease. **N Engl J Med**, 340(2), 115-26.

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.

SHABANI, F.; MCNEIL, J. & TIPPETT, L. (1998). The oxidative inactivation of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) by hypochlorous acid (HOCl) is suppressed by anti-rheumatic drugs. **Free Radic Res**,28:115–23.

SHIGETA, A.; MATSUMOTO, M.; TEDDER, T. F.; LOWE, J. B.; MIYASAKA, M. & HIRATA, T. (2008). An L-selectin ligand distinct from P-selectin glycoprotein ligand-1 is expressed on endothelial cells and promotes neutrophil rolling in inflammation. **Blood**;112(13):4915-23.

SILVESTRIS, F.; WILLIAMS, R. C.; CALVANI, N.; GRINELLO, D.; TUCCI, M.; CAFFORIO, P. & DAMMACCO, F. (2002). Serum elevations of soluble Fas (CD95/ Apo-1) concur in deregulating T cell apoptosis during active lupus disease. **Clin Exp Med**, 2(1):13–27.

SKUBITZ, K. M.; CAMPBELL, K. D. & SKUBITZ, A. P. (1996). CD66a, CD66b, CD66c, and CD66d each independently stimulate neutrophils. **J Leukoc Biol**;60(1):106-17.

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

SUGIYAMA, S.; OKADA, Y.; SUKHOVA, G. K.; VIRMANI, R.; HEINECKE, J. W. & LIBBY P. (2001). Macrophage myeloperoxidase regulation by granulocyte macrophage colony-stimulating factor in human atherosclerosis and implications in acute coronary syndromes. **Am J Pathol**. 158(3):879-91

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. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, 24:1309–14.

TRICOT, O.; MALLAT, Z.; HEYME, C.; BELMIN, J.; LESÈCHE, G. & TEDGUI A. (2000). Relation between endothelial cell apoptosis and blood flow direction in human atherosclerotic plaques. **Circulation**, 101(21):2450-3.

UEMURA, S.; MATSUSHITA, H.; LI, W.; GLASSFORD, A. J.; ASAGAMI, T.; LEE, K. H.; HARRISON, D. G. & TSAO, P. S. (2001). Diabetes mellitus enhances vascular matrix metalloproteinase activity: role of oxidative stress. **Circ Res**, 88(12):1291-8.

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

VISSERS, M. C. M. & THOMAS, C. (1997). Hypochlorous acid disrupts the adhesive properties of subendothelial matrix. **Free Radic Biol Med**, 23:401–411.

WOLF P. (1967). The nature and significance of platelet products in human plasma. **Br J Haematol**, 13:269-88.

ZWAAL, R. F. & SCHROIT, A. J. (1997). Pathophysiologic implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells. **Blood**, 89(4):1121-3