Francisco Erivaldo Vidal Barros

Avaliação da relação entre produção plaquetária e
expressão de proteínas do sistema apoptótico
plaquetário em diferentes graus de plaquetopenia da
Trombocitopenia Imune (PTI)

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências

Programa de Ciências Médicas
Área de Concentração: Distúrbios do Crescimento
Celular, Hemodinâmicos e da Hemostasia

Orientador : Prof. Dr. Élbio D'Amico

São Paulo
2014

Francisco Erivaldo Vidal Barros

Avaliação da relação entre produção plaquetária e
expressão de proteínas do sistema apoptótico
plaquetário em diferentes graus de plaquetopenia da
Trombocitopenia Imune (PTI)

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de
São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências
Médicas

Programa de Ciências Médicas

Área de Concentração: Distúrbios do Crescimento Celular,
Hemodinâmicos e da Hemostasia

Orientador : Prof. Dr. Élbio D'Amico

SÃO PAULO
2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Barros, Francisco Erivaldo Vidal

Avaliação da relação entre produção plaquetária e expressão de proteínas do sistema apoptótico plaquetário em diferentes graus de plaquetopenia da Trombocitopenia Imune (PTI) / Francisco Erivaldo Vidal Barros. -- São Paulo, 2014. Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Ciências Médicas. Área de concentração: Distúrbios do Crescimento Celular, Hemodinâmicos e da Hemostasia.

Orientador: Élbio Antonio D'Amico.

Descritores: 1.Plaquetas 2.Ativação plaquetária 3.Micropartículas derivadas de células 4.Apoptose 5.Proteína X associada a bcl-2 6.Púrpura trombocitopênica idiopática

USP/FM/DBD-423/14

BARROS, Francisco Erivaldo Vidal. **Avaliação da relação entre produção plaquetária e expressão de proteínas do sistema apoptótico plaquetário em diferentes graus de plaquetopenia da Trombocitopenia Imune (PTI).** Tese apresentada à Faculdade de Medicina da universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas.

Aprovada em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

À Glória, “...não és sequer a razão do meu viver / pois que tu és já
toda minha vida...”

Minha família, alicerce para a formação, e suporte para a vida.

Dona Socorro, minha mãe amada; Dr. Erivaldo, meu pai figura
emblemática; Esther e Erival, minhas irmãs de eterno carinho e
amor; João José, meu irmão, para sempre ao meu lado.

Agradecimentos

A Deus, pela saúde, pela tranquilidade, pela família, pelos amigos, pelos bons momentos, por tudo.

Ao Prof. Dr. Élbio D'Amico, pela orientação, pela confiança, pelos ensinamentos, por me permitir presenciar sua dedicação e excelência à Hemostasia. Admiração e respeito eternos.

À Tânia, minha amiga, minha chefe, por incontáveis ensinamentos, pela sua participação constante e decisiva em todo este caminho, por me confidenciar e até mesmo compartilhar o seu amor sincero e dedicado à Hemostasia, pela seu impressionante entusiasmo ao trabalho bem feito, ao estudar, ao transmitir. Não há como expressar em palavras. Apreço e admiração que se renovam.

À Dra. Paula Villaça, pelos valiosos ensinamentos, por seu compartilhar seu conhecimento, pela compreensão, por sempre ser receptiva e atenciosa.

À Valéria, pela sua grande e sincera amizade, pelos ótimos momentos, por tudo que me ajudou neste trajeto.

À Diana, pela sua grande participação neste trabalho com pertinentes e proveitosas colocações, além de seus ensinamentos e amizade. Grande admiração.

Ao Victor Debbas, um colaborador que se tornou grande amigo, por todas as suas contribuições essenciais, por sua dedicação e disposição a ajudar.

À Dra. Juliana Pereira, pela disponibilização do Laboratório de Imunofenotipagem para realização das análises em citometria de fluxo, e pelos infindáveis ensinamentos. Muita admiração e respeito.

Ao Prof. Dr. Francisco Laurindo, por disponibilizar seu laboratório para a realização dos *Western Blotting*.

À Audrey, por ter sido tão atenciosa e demonstrar imenso apreço em um momento difícil. Muito competente e estudiosa. Grande profissional. Um grande coração.

À Nijane, Regina, Valcélia, pelos bons momentos de amizade, descontração e tranquilidade que foram muito importante nesta caminhada.

“O homem aprendeu a falar para esconder aquilo que pensa”

Os Miseráveis – Victor Hugo

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha,

Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	15
2.1. MEGACARIOCITOPOIESE	15
2.2. FISILOGIA PLAQUETÁRIA.....	22
2.3. PLAQUETA E APOPTOSE	30
2.4. PLAQUETOPENIA	37
2.5. PÚRPURA TROMBOCITOPÊNICA IMUNE OU IDIOPÁTICA (PTI)	40
3. OBJETIVO	48
3.1. Objetivos Específicos	48
4. CASUÍSTICA.....	49
5. METODOLOGIA.....	51
5.1. Contagem manual de plaquetas	51
5.2. Quantificação de plaquetas reticuladas com Tiazol <i>Orange</i> (TO), plaquetas ativadas e micropartículas derivadas de plaquetas e micropartículas derivadas de outras células por citometria de fluxo.....	51
5.3. Avaliação das proteínas Bcl-x _L e Bax plaquetária por Western Blotting.....	53
6. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	57
7. RESULTADOS	58
7.1. Quantificação de plaquetas reticuladas com Tiazol <i>Orange</i> (TO) por citometria de fluxo	60
7.2. Quantificação de micropartículas derivadas de plaquetas e micropartículas derivadas de outras células por citometria de fluxo	63
7.3. Determinação de ativação plaquetária por citometria de fluxo	65
7.4. Avaliação das proteínas Bcl-x _L e Bax plaquetárias por Western Blotting	66
8. DISCUSSÃO	68
9. CONSIDERAÇÕES FINAIS	77
10. ANEXO	79
11. REFERÊNCIAS	82

Resumo

Barros FEV. *Avaliação da relação entre produção plaquetária e expressão de proteínas do sistema apoptótico plaquetário em diferentes graus de plaquetopenia da Trombocitopenia Imune (PTI)* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014.

A Trombocitopenia imune (PTI) é uma doença imuno mediada adquirida de adultos e crianças caracterizada por plaquetopenia transitória ou persistente, onde o grau de plaquetopenia aumenta o risco de sangramento. Geralmente, os pacientes apresentam manifestações clínicas apenas em plaquetopenias abaixo de $50 \times 10^3/\text{mm}^3$, e contagem de plaquetas entre 100 e $150 \times 10^3/\text{mm}^3$, se estável por mais de 6 meses, necessariamente não indica uma condição patológica. Tem sido sugerido diferentes processos fisiopatológicos relacionados às plaquetas de acordo com a intensidade da plaquetopenia, e que alterações na megacariocitopoiese e diminuição da sobrevivência plaquetária são eventos determinantes na PTI. Contagem de plaquetas reticuladas em citometria de fluxo é um teste muito útil para avaliação da plaquetopenia, pois reflete a atividade megacariocitopoiética, destruição das plaquetas e a própria contagem de plaquetas. Tanto as plaquetas quanto os megacariócitos apresentam a via intrínseca da apoptose. A atividade dos principais mediadores da apoptose intrínseca, como Bax e Bak, é regulada por proteínas anti-apoptóticas da família Bcl-2, tais como Bcl- x_L . Um balanço entre Bcl- x_L e Bax regula a sobrevivência plaquetária. Pacientes de PTI apresentam aumento da ativação plaquetária e da formação de micropartículas derivadas de plaquetas (MPP). Nosso objetivo foi avaliar a relação entre produção e apoptose plaquetária, e associá-la com a ativação plaquetária e a formação de MPP nos diferentes graus de intensidade da PTI. Os pacientes recrutados foram diagnosticados para trombocitopenia imune (PTI) primária, “idiopática”, não esplenectomizados, acompanhados regularmente no ambulatório de Doenças Hemorrágicas e Trombóticas, do Serviço de Hematologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, e foram divididos em grupos de acordo com contagem de plaquetas: $<50 \times 10^3/\text{mm}^3$ (n=7); entre $50-100 \times 10^3/\text{mm}^3$ (n=7); $>100 \times 10^3/\text{mm}^3$ (n=7). Como grupo controle, foram avaliados 10 doadores de sangue da Fundação Pró-Sangue Hemocentro de São Paulo. A produção plaquetária foi estabelecida através da contagem de plaquetas reticuladas por citometria de fluxo com laranja de tiazol. Também por citometria de fluxo avaliamos a ativação plaquetária pela expressão de P-selectina (CD62P), e a formação de MPP através de beads de $1\mu\text{m}$ e dupla positividade para CD41a (GPIIb/IIIa) e CD31 (molécula de adesão PECAM-1). A apoptose foi avaliada pela relação entre as expressões das proteínas anti apoptóticas, Bcl- x_L , e pró apoptóticas, Bax, (Bcl- x_L /Bax) em *Western Blotting*. Evidenciamos que na PTI há um aumento do número de plaquetas reticuladas, predomínio de Bax em relação à Bcl- x_L , uma maior ativação plaquetária e formação de MPP, mas em níveis variados dependentes do grau de plaquetopenia instalado. Sugerimos que o nível de predomínio do sistema pró apoptose sobre o anti apoptótico estabelece a intensidade da plaquetopenia na PTI. E que os eventos ativação plaquetária e formação de MPP são regulados pelo balanço entre Bcl- x_L /Bax.

Descritores: Plaquetas; Ativação Plaquetária; Micropartículas; Apoptose; Bax

Abstract

Barros FEV. *Assessment of ratio between platelet production and apoptosis in Immune Thrombocytopenia (ITP) at different degrees of thrombocytopenia* [Thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2014.

Immune thrombocytopenic (ITP) is an immune-mediated acquired disease of adults and children characterized by transient or persistent decrease of the platelet count and, depending upon the degree of thrombocytopenia, increased risk of bleeding. ITP usually presents with clinical manifestations only in platelet counts below $50 \times 10^3/\text{mm}^3$, and counts between 100 and $150 \times 10^3/\text{mm}^3$ if they have been stable for more than 6 months do not necessarily indicate a pathologic condition. It has been suggested the existence of different pathophysiological processes involving platelets according to the severity of thrombocytopenia, and that alterations in the megakaryopoiesis and reduced platelet lifespan play a key role in ITP. The flow cytometric analysis of reticulated platelets is useful for evaluating thrombocytopenia that reflect the activity megakaryopoiesis, platelets destruction, platelet count, and age. Platelets and megakaryocytes contain intrinsic pathway of apoptosis. The activity of key mediators of intrinsic apoptosis, Bak and Bax, is tightly controlled by anti-apoptotic Bcl-2 family members, of which Bcl-x_L, which have been shown to coordinately regulate platelet survival. ITP patients have a larger amount of activated platelets that express P-selectin as well as an increase of platelets-derived microparticles (PMP). We suggest a relationship between platelet production and Bcl-x_L and Bax expression in ITP patients from different degrees of thrombocytopenia, that has relate with platelet activation and PMP. Our aim was assessment of ratio between platelets production and apoptosis, and it associate with platelets activation and PMP in different thrombocytopenia degree in ITP. Patients were considered eligible for the study if they were on regular follow-up at the clinic of haemorrhagic and thrombotic diseases of the Hematology Service of Clinics Hospital of University of São Paulo Medicine School diagnosed with primary immune thrombocytopenia, "idiopathic". Patients were divided into groups according to levels of thrombocytopenia: platelets count between 100 and $150 \times 10^3/\text{mm}^3$ ($>100 \times 10^3/\text{mm}^3$); between 50 and $100 \times 10^3/\text{mm}^3$ ($50-100 \times 10^3/\text{mm}^3$); and below $50 \times 10^3/\text{mm}^3$ ($<50 \times 10^3/\text{mm}^3$). Healthy volunteers were blood donors in the *Pró-Sangue* Foundation of Blood Center of São Paulo, with platelets count between 150 and $450 \times 10^3/\text{mm}^3$. Platelets production was through reticulated platelets count by flow cytometry with thiazole orange. Also by flow cytometry evaluated platelet activation through expression of P-selectin, and PMP by beads of $1 \mu\text{m}$ and double positive for CD41a, and CD31. Apoptosis was evaluated by the relationship between anti apoptotic proteins Bcl-X_L, and pro apoptotic, Bax (Bcl-X_L / Bax) in Western blotting. We show that there higher reticulated platelets in ITP as well as Bax predominantly in relation to Bcl-x_L, increased platelet activation and PMP, but at varying levels depending on the degree of thrombocytopenia. We suggest that the level of dominance of pro apoptotic system on the anti-apoptotic establishes the intensity of thrombocytopenia in ITP, and that platelet activation and formation of MPP events are regulated by the balance between Bcl-x_L / Bax.

Descriptors: Platelets; Platelets Activation; Microparticles; Apoptosis; Bax

1. INTRODUÇÃO

O sistema hemostático possibilita ao organismo impedir o extravasamento sanguíneo em lesões do endotélio vascular, remover coágulos após o restabelecimento da integridade do vaso, e manter o fluxo sanguíneo normal (Vertsteeg *et al.*, 2013).

Quando a parede vascular é lesada, o sistema hemostático deve ser localizado, rápido e altamente regulado. Sangramento ou propensão à trombose pode ocorrer quando elementos específicos da hemostasia estão ausentes ou disfuncionais (Leung, 2014).

Após a ruptura da parede do vaso, ou em locais de endotélio ativado ou danificado, rápidas e complexas interações ocorrem entre células endoteliais, componentes da matriz extracelular, plaquetas e proteínas do sistema da coagulação, constituindo duas fases do sistema hemostático, a hemostasia primária e a hemostasia secundária (Vertsteeg *et al.*, 2013).

As plaquetas desempenham um papel importante no sistema hemostático, principalmente, ao aderir ao vaso sanguíneo lesado, agregando com outras plaquetas, promovendo a formação do tampão plaquetário, facilitando e localizando a geração de trombina, que reforçará o tampão plaquetário, através da conversão de fibrinogênio em filamentos de fibrina (Parise *et al.*, 2001; Kroll; Afshar-Kharghan, 2012; Huang; Chang, 2012).

Plaquetopenia ou trombocitopenia é definida como a redução do número de plaquetas para valores abaixo de 150 milhões/mm³, sendo a causa mais comum de sangramento. A plaquetopenia pode ser proveniente da diminuição de produção (diminuição da megacariocitopoiese), aumento da retirada de plaquetas da circulação (consumo ou apoptose) e sequestro plaquetário anormal no baço. Contudo, em muitos casos, mais de um mecanismo pode estar relacionado (George; Rizvi, 2001; Levine *et al.*, 2004; Swerdlow, *et al.*, 2008).

A Púrpura Trombocitopênica Imune (PTI), também conhecida como Púrpura Trombocitopênica Idiopática (PTI) ou Trombocitopenia Imune (PTI), é uma doença imune adquirida, que pode ocorrer em adultos e crianças, caracterizada pela isolada redução transitória ou persistente do número de plaquetas circulantes que, dependendo do grau de plaquetopenia, aumenta o risco de sangramento (Rodeghiero *et al.*, 2009).

De acordo com a literatura, a relação entre a diminuição da sobrevivência das plaquetas e a trombocitopenia é controversa. A diferença observada pode ser devido aos diferentes graus de plaquetopenia encontrados nos estudos, de grave a moderado (Levine, 2004).

É muito importante avaliar se a plaquetopenia resulta de destruição acelerada e maior retirada de plaquetas da circulação ou de deficiência da megacariocitopoiese (Koike *et al.*, 1998). Historicamente têm-se associado e,

recentemente, evidenciado uma relação entre maior destruição plaquetária e menor atividade megacariocitopoiética em pacientes da PTI (Gernsheimer, 2009).

Nos últimos anos novos testes laboratoriais têm permitido avaliar a megacariocitopoiese quantificando, no sangue periférico, o número de plaquetas jovens ou reticuladas, que apresentam maior quantidade de ácidos nucléicos em relação às maduras. Alguns autores descrevem o teste, como avaliação da cinética plaquetária. (Abe *et al.*, 2005; Jiménez *et al.*, 2006; Kajihara *et al.*, 2007; Kile, 2009; Hoffmann, 2014).

Pacientes com PTI apresentam uma maior quantidade de plaquetas ativadas, que expressam a glicoproteína P-selectina (CD62P⁺), assim como uma maior formação de micropartículas derivadas de plaquetas (MPP), que também expressam marcadores de ativação plaquetária, como o CD62P. Estas plaquetas ativadas e as MPP apresentam maior atividade pró-coagulante. Isto pode explicar situações em que, entre diferentes pacientes com o mesmo nível de plaquetopenia, se observa menor grau de sangramento naqueles que apresentam maior ativação plaquetária e maior formação MPP (Ahn; Horstman, 2002; Gernsheimer, 2008; Tantawy *et al.*, 2010).

As plaquetas e seus precursores, os megacariócitos, apresentam as vias funcionais associadas aos mecanismos de apoptose, envolvidos nos eventos necessários para a formação e liberação das plaquetas assim como na regulação da sobrevivência destas células, através do mecanismo apoptótico

intrínseco. Tanto as plaquetas quanto os megacariócitos de pacientes com PTI apresentam sinais de morte celular aumentada ou aberrante (von Gunten; Wehrli; Simon, 2013).

A via intrínseca do mecanismo apoptótico é mediada pela interação das proteínas da família Bcl-2, que apresentam três subgrupos: as proteínas pró-sobrevida (Bcl-2, Bcl-x_L, Bcl-w, Mcl-1 e A1/Bfl-1), as proteínas pró-apoptose celular (Bak, Bax e Bok) e as proteínas pró-apoptose celular com domínio BH3 (Bad, Bim, Bid, Bik, Noxa, Puma, Bmf e Hrk/DP5) (White; Kile, 2010).

Quando as proteínas pró-apoptóticas, Bak e Bax prevalecem sobre as proteínas pró-sobrevida, ocorre a indução de lesão mitocondrial, ativação da caspase, exteriorização da fosfatidilserina e geração de micropartículas (Cookson *et al.*, 2010; Gyulkhandanyan *et al.*, 2012; Josefsson *et al.*, 2012).

A avaliação das proteínas Bcl-x_L, pró-sobrevida, e Bak, pró-apoptótica, podem fornecer informações importante a respeito da destruição plaquetária na PTI, como a morte celular prematura (Mason *et al.*, 2007; Qi; Hardwick, 2007; Gyulkhandanyan *et al.*, 2012; Josefsson *et al.*, 2012).

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. MEGACARIOCITOPOIESE

A megacariocitopoiese, ou trombocitopoiese, é o processo que conduz à produção de plaquetas (White, 1993; Kaushansky, 1998; Wendling, 1999; Kuter, 2001; Deutsch; Tomer, 2006; Chang *et al.*, 2007; Wen; Goldenson; Crispino, 2011; Malara; Balduini, 2012; Machlus; Thon; Italiano Jr, 2014).

Este processo envolve o comprometimento de células tronco hematopoiéticas para progenitores megacariocitóides, a proliferação e diferenciação de progenitores megacariocitóides, a poliploidização de precursores megacariocitóides e a maturação de megacariócitos (Kuter, 2001; Deutsch; Tomer, 2006; Chang *et al.*, 2007; Geddis, 2010; Malara; Balduini, 2012; Machlus; Thon; Italiano Jr, 2014), culminando com endoreduplicação de DNA, maturação e expansão do citoplasma e liberação de fragmentos citoplasmáticos, as plaquetas circulantes (Deutsch; Tomer, 2006; Wen; Goldenson; Crispino, 2011; Machlus; Thon; Italiano Jr, 2014).

As células tronco hematopoiéticas, e demais progenitores hematopoiéticos, apresentam receptores para diversas citocinas e fatores de crescimento, que proporcionam o comprometimento e a diferenciação destas células nas diversas linhagens hematológicas. Seletivamente estas células perdem os demais receptores de comprometimento para uma determinada série sanguínea (Bociek; Armitage, 1996; Yu; Cantor, 2012).

Os megacariócitos são células mielóides pouco frequentes na medula óssea (correspondem a menos de 1% das células nucleadas medulares), que dão origem às plaquetas circulantes através do comprometimento de células tronco hematopoiéticas pluripotentes (*Hematopoietic Stem Cell*, HSC). As HSC, frente à ação de determinados fatores de crescimento, se diferenciam, primeiramente, em progenitores mielóides multipotentes, as denominadas unidades formadoras de colônias granulóide, eritróide, megacariocitóide e monocitóide (CFU-GEMegM) (Figura 1) (Kuter, 2001; Kaushansky, 2005; Patel *et al.*, 2005; Deutsch; Tomer, 2006; ; Geddis, 2010; Wen; Goldenson; Crispino, 2011; Malara; Balduini, 2012; Yu; Cantor, 2012).

As linhagens megacariocitóide e eritróide são originadas a partir de dois progenitores comuns eritróide-megacariocitóide, a unidade formadora de colônias eritróide-megacariocitóide (*colony forming units*, CFU-EMeg) e as células progenitoras eritróide-megacariocitóide de intensa atividade mitótica (*bursting forming units*, BFU-EMeg), que provêm de um comprometimento dos progenitores mielóides grânulo-eritróide-megacarióide-monocitóide, CFU-GEMegM (Figura 1). A diferenciação e a maturação destes progenitores comprometem estas células para os precursores da linhagem megacariocítica reconhecidos morfológicamente, os megacariócitos (Kaushansky, 2005; Nutt *et al.*, 2005; Patel *et al.*, 2005; Deutsch; Tomer, 2006; Kuter, 2007; Geddis, 2010; Wen; Goldenson; Crispino, 2011; Malara; Balduini, 2012; Machlus; Thon; Italiano Jr, 2014).

Figura 1. Esquema simplificado que representa a Hematopoiese de uma maneira geral. A célula tronco hematopoiética (*Hematopoietic Stem Cell*, HSC) através de processos de diferenciação, proliferação e maturação dá origem a todas as células sanguíneas: plaqueta, eritrócitos, monócitos, segmentado neutrófilo, segmentado eosinófilo, segmentado basófilo e linfócitos (B, T e NK). Progenitor GMMegE (Grânulo-Monocítico-Megacariocítico-Eritróide); Progenitor GM (Grânulo-Monocítico); Progenitor MegE (Megacariocítico-Eritróide); CFU-MegE (*colony forming units*- Megacariocítico-Eritróide); BFU-MegE (*bursting forming units*-Megacariocítico-Eritróide).

A megacariocitopoiese e por fim produção de plaquetas, ocorrem dentro de um complexo microambiente medular, onde citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento, bem como as interações célula-célula e célula-matriz extracelular, desempenham um importante papel (Avecilla *et al.*, 2004; Malara; Balduini, 2012; Machlus; Thon; Italiano Jr, 2014) na regulação da proliferação, diferenciação, maturação e liberação de plaquetas (Kaushansky, 2003; Malara; Balduini, 2012; Yu; Cantor, 2012; Machlus; Thon; Italiano Jr, 2014).

Este processo tem duração de aproximadamente 8 a 9 dias, com capacidade de produção, em indivíduos saudáveis, podendo ser aumentada em cerca de 10 vezes de acordo com a necessidade (Kaushansky, 2005; Grozovsky; Hoffmeister; Falet, 2010; Yu; Cantor, 2012; Cine; Cuker; Semple, 2014).

Estima-se que em indivíduos adultos saudáveis, cada megacariócito produza cerca de dez mil plaquetas, e que um total de 10^{11} plaquetas seja liberado na circulação diariamente, sendo que 70% permanecem no sangue periférico e 30% são seqüestrados pelo baço. Assim que lançadas na circulação as plaquetas apresentam grande quantidade de RNA, diferentemente das plaquetas maduras, com pouco ou nenhum RNA. Essas plaquetas jovens são denominadas de plaquetas reticuladas e permitem uma avaliação da atividade megacariocitopoiética, principalmente, em situações de plaquetopenias (Abe *et al.*, 2005; Jiménez *et al.*, 2006; Kajihara *et al.*, 2007; Harrison; Goodall, 2008; Parco; Vascotto, 2012; Silva; Golim; Takahira, 2012; Hoffmann, 2014).

O período médio de permanência na circulação é em torno de 10 dias, quando então são removidas por células retículo endoteliais do baço e do fígado (Shapiro, 2000; Parise *et al.*, 2001; Calverley; Maness *et al.*, 2004; Grozovsky; Hoffmeister; Falet, 2010; Cine; Cuker; Semple, 2014).

O fator humoral trombopoetina (TPO) é um regulador primário de maturação e diferenciação de megacariócitos e produção de plaquetas. Estimula um receptor específico, o Mpl (sintetizado a partir do gene Mpl, *Myeloproliferative leukemia virus proto-oncogene*), presente em plaquetas, megacariócitos, precursores megacariocíticos-eritróides e em células tronco hematopoiéticas CD34⁺, estimulando a transcrição gênica e respostas biológicas através de vias de sinalização tirosina quinase (Figura 2) (de Graaf; Metcalf, 2011; Yu; Cantor, 2012; Machlus; Thon; Italiano Jr, 2014).

Ao promover uma alteração na conformação deste receptor, a TPO inicia uma sequência de transdução de sinais, com ação pleiotrópica de outros fatores, como interleucina-3 (IL-3), interleucina-6 (IL-6), interleucina-11 (IL-11) e *stem cell* factor (SCF), que intensificam estes efeitos (Figura 2) (Kaushansky, 2005; Kuter, 2007; de Graaf; Metcalf, 2011; Yu; Cantor, 2012; Machlus; Thon; Italiano Jr, 2014).

A TPO, descoberta juntamente com seu receptor Mpl em 1994 (Kaushansky, 2003), promove múltiplas etapas de endomitoses, com formação de núcleos multilobulados com conteúdo de DNA variando de tetraplóide (4N) a 128N. Além disso, há significativa maturação do sistema de membrana interna, grânulos e organelas, e alteração do citoesqueleto, estimulando o prolongamento de extensões citoplasmáticas para dentro de sinusóides medulares como proplaquetas, para então estas extensões citoplasmáticas sofrerem fragmentação liberando as plaquetas na circulação (Patel *et al.*, 2005; Geddis, 2010; de Graaf; Metcalf, 2011; Machlus; Thon; Italiano Jr, 2014).

Figura 2. Via de sinalização da trombopoietina (TPO). Em células não estimuladas (A), o receptor Mpl (amarelo) apresenta-se como monômeros, e as moléculas de sinalização, JAK2 (*Janus kinase 2*, Janus quinase 2) e STATs (*Signal Transducer and Activator of Transcription*, Sinal transdutor e ativador de transcrição), estão inativas. Após ligação da TPO (B), o receptor Mpl dimeriza. Esta mudança de conformação resulta na fosforilação de JAK2, o que leva à fosforilação de Mpl e ativação das vias de sinalização a jusante, incluindo STATs, a via da MAPK (*Mitogen-activated protein kinases*, Proteínas quinases ativadas por mitógeno) e PI3K (*phosphatidylinositol 3-kinases*, Fosfatidilinositol 3 quinase), JAK2 pode fosforilar STAT3 e STAT5 em resposta a sinalização de TPO, o que resulta na dimerização e a sua translocação para o núcleo. Há a transcrição gênica é iniciada e a integração destas vias conduzindo às respostas biológicas ao efeito da TPO. STATs também induz a transcrição de proteínas SOCS (*suppressor of cytokine signaling*, Supressor de citocinas de sinalização), que geralmente não são expressas, resultando em retroalimentação negativa e regulação negativa da ativação de JAK2 e Mpl (de Graaf; Metcalf, 2011).

Após a projeção das extensões citoplasmáticas e formação de proplaquetas, ocorre a liberação destes fragmentos, caracterizando-se a formação de plaquetas. Neste processo, a demarcação de membrana do megacariócito e a expressão das glicoproteínas (GP) IIb/IIIa e Ib, receptores de fibrinogênio e do fator de von Willebrand, respectivamente, ocorrem devido à estimulação de TPO (Figura 3), (Kaushansky, 1999; Geddis, 2010; de Graaf; Metcalf, 2011; Machlus; Thon; Italiano Jr, 2014).

Alguns estudos têm demonstrado que, as vias intrínseca e extrínseca de apoptose, em megacariócitos maduros, induzem a produção de plaquetas. E a inibição de uma destas vias pode inibir a formação de proplaquetas e, consequentemente, de plaquetas (Machlus; Thon; Italiano Jr, 2014).

Figura 3. Os níveis de trombopoietina (TPO) são regulados pela população plaquetária circulante. O fígado produz a TPO constitutivamente. Após a ligação aos receptores Mpl sobre as plaquetas, a TPO é internalizada e removida da circulação. Uma pequena proporção da TPO total é produzida por células do estroma da medula óssea e a produção de mRNA da TPO é sensível a fatores produzidos pelas plaquetas, tais como o FP4, e ao próprio número de plaquetas. TPO, em seguida, estimula as células tronco hematopoiéticas quiescentes e a megacariocitopoiese na medula óssea. No caso de trombocitose, grande parte da TPO é removida da circulação, o que resulta em baixos níveis de TPO, enquanto que durante a trombocitopenia, pouco da TPO é retirada da circulação, o que resulta em níveis elevados de TPO. A massa plaquetária regula a megacariocitopoiese através deste sistema de retroalimentação, que também permite uma estreita relação entre células tronco hematopoiéticas e número de plaquetas. (de Graaf; Metcalf, 2011).

2.2. FISILOGIA PLAQUETÁRIA

A plaqueta é uma célula anucleada originada da fragmentação de projeções citoplasmáticas de megacariócitos na medula óssea. Esta célula apresenta um formato discóide com tamanho de 3,6µm por 0,7µm, o que facilita sua circulação próxima à parede do vaso, onde desempenha um papel central no sistema hemostático. Entretanto, as plaquetas também participam de respostas imunológicas, na modulação de processos inflamatórios, no reparo de lesões bem como em metástases envolvendo o sistema hematológico (Jurk; Kehrel, 2005).

Após a lesão na parede do vaso sanguíneo, componentes subendoteliais são expostos e proporcionam a adesão e, subsequente, ativação plaquetária. Em seguida há secreção do conteúdo de seus grânulos e a agregação plaquetária, que são essenciais para a formação de um tampão hemostático que limita a perda de sangue e estimula o reparo da lesão (Zhang *et al.*, 2007).

As plaquetas apresentam em sua morfologia três zonas distintas: a) zona periférica: constituída por membrana plaquetária, camada de glicocálix e citoesqueleto de actina; que pode conter fatores de coagulação I, II, V, VIII, XI e XII, fator de Von Willebrand, trombospondina, colágeno, tromboxano A₂, prostaciclina entre outros; esta zona é responsável pela adesão e agregação plaquetária; b) zona sol-gel: é responsável pela contração e suporte para o sistema de microtúbulos; contêm o sistema canalicular aberto e o sistema

tubular denso; c) zona de organelas: é constituída por mitocôndrias, corpos densos, lisossomos, grânulos α , grânulos densos e grânulos de glicogênio (Cimmino; Golino, 2013).

A membrana plasmática das plaquetas consiste predominantemente de fosfolípides (aproximadamente 70%), colesterol e glicolipídios. Os principais fosfolípides são fosfatidilcolina (PC), esfingomielina (SphM), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilserina (PS) e fosfatidilinositol (PI). Estes estão localizados assimetricamente na membrana. Enzimas são distribuídas de uma maneira específica na membrana plaquetária, como adenilato-ciclase, ou mesmo nas membranas tubulares densas como fosfolipase A2, ciclo-oxigenase (CO) e tromboxano-sintase. A ativação plaquetária está associada exposição na porção externa da membrana de fosfolípidos aniônicos, fenômeno chamado de *flip-flop*, como por exemplo exposição de PS, que proporciona uma superfície catalítica para os processos pró-coagulantes, permitindo a geração de trombina no sitio da lesão (Jurk; Kehrel, 2005).

As plaquetas quando jovens, recém lançadas na circulação, apresentam altas concentrações de ribossomos e RNA, que facilitam a produção de proteínas necessárias para exercer as suas funções (Patel *et al.*, 2005; Richardson *et al.*, 2005; Hartwig, 2006; Harrison; Goodall, 2008; Parco; Vascotto, 2012; Silva; Golim; Takahira, 2012).

O conteúdo dos grânulos densos é composto por moléculas não protéicas como ADP, serotonina e cálcio. Já os grânulos α , que correspondem a aproximadamente 10% do volume plaquetário, são constituído por moléculas com diferentes propriedades, como fatores de coagulação (fibrinogênio, V, FvW, e XI), moléculas de adesão (fibronectina, P-selectina), fatores angiogênicos (angiogenina e fator de crescimento do endotélio vascular), fatores antiangiogênicos (angiostatina, fator 4 plaquetário – PF4), fatores de crescimento (fator de crescimento derivado de plaquetas), proteases, fatores de necrose (fator de necrose tumoral α e β - TNF α e TNF β) e citocinas. Enquanto que os lisossomos contêm hidrolases utilizadas na eliminação de agregados plaquetários circulantes (Cimmino; Golino, 2013).

As plaquetas circulam normalmente sem aderir ao endotélio vascular íntegro. Quando ocorre dano vascular, o subendotélio é exposto e as plaquetas inicialmente aderem ao colágeno presente no subendotélio, formando um tampão hemostático. Essa interação com o subendotélio é mediada pelo fator de von Willebrand (FvW), através do receptor plaquetário glicoproteína (GP) Ib-IX-V, expresso apenas em plaquetas e megacariócitos, em condições de alta força de cisalhamento. Em um segundo momento, após ligação FvW-GPIb-IX-V, a plaqueta pode interagir diretamente com a matrix subendotelial através dos receptores plaquetários de colágeno, GPIa-IIa ou integrina $\alpha_2\beta_1$, e GPVI. Em condições de reduzidas força de cisalhamento a ligação inicial ao colágeno pode ser realizada por GPIa-IIa e GPVI (Shapiro, 2000; Jurk; Kehrel, 2005; Patel *et al.*, 2005; Hartwig, 2006; Smyth, 2009; Scharf, 2012; Huang; Chang, 2012; Cimmino; Golino, 2013).

GPIV, um receptor tipo não integrina, também pode proporcionar a interação plaqueta-colágeno, bem como atuar como receptor para trombospondina, uma glicoproteína expressa em plaquetas e outras células. Outras integrinas que contribuem para a adesão plaquetária são GPIc-IIa, receptor de fibronectina, receptor de laminina e um receptor de vitronectina que se liga a muitos ligantes da GPIIb-IIIa. Com a adesão, a ativação plaquetária é estimulada tanto por eventos mecânicos quanto químicos (Cimmino; Golino, 2013).

A ligação com o colágeno provoca uma rápida fosforilação do receptor Fc associado à GPVI através da família tirosina quinase Src. Esta fosforilação leva à ativação de fosfolipase C2 (PLC2). PLC2 converte fosfatidilinositol (PI) - 4,5 difosfato (P2) (PIP2) em inositol 1,4,5-trifosfato (IP3 ou 1,4,5-IP3) e diacilglicerol (DAG). IP3 abre os canais de íons cálcio (Ca^{2+}) no sistema tubular denso plaquetário. O aumento da concentração Ca^{2+} promove ativação plaquetária, com alteração da forma celular, formação de tromboxano A2 (TXA2) e secreção do conteúdo dos grânulos α e densos. A secreção de ADP e TXA2 irá ativar outras plaquetas próximas ao local da lesão (Parise *et al.*, 2001; Calverley; Maness *et al.*, 2004 Smyth, 2009; Scharf, 2012; Huang; Chang, 2012; Diamond *et al.*, 2013).

As plaquetas ativadas passam a interagir entre si, a interação plaqueta-plaqueta, promovendo agregação plaquetária, através da ligação entre os receptores GPIIb-IIIa (integrina $\alpha_{2b}\beta_3$) com o fibrinogênio como ligantes entres estes receptores. As plaquetas não ativadas possuem esta integrina na forma

não ativa, portanto incapaz de se ligar a fibrinogênio, FvW, trombospondina, fibronectina e vitronectina. A ligação entre FvW e GPIb-IX-V no momento da adesão plaquetária, em condições de alta força de cisalhamento, promove uma alteração conformacional na molécula de GPIIb/IIIa, que adquire uma forma ativa, capaz de se ligar aos seus ligantes (Shapiro, 2000; Jurk; Kehrel, 2005; Patel *et al.*, 2005; Hartwig, 2006; Smyth, 2009; Scharf, 2012; Huang; Chang, 2012).

Com a ativação, as plaquetas secretam o conteúdo dos grânulos densos (ADP, serotonina e cálcio) e dos grânulos α (fibronectina, fatores V e XI, fator 4 plaquetário – PF4 e proteína S), muitos deles com atividade pró coagulante, e expõem fosfolípidos em sua membrana, corroborando e intensificando a geração de trombina. Algumas moléculas expressas na membrana plaquetária, como GPIb e GPIIb/IIIa, participam da adesão e da agregação plaquetária, e na formação do tampão hemostático. Também nos grânulos α , há a glicoproteína P-selectina, que na ativação plaquetária é transportada e expressa na membrana, possibilitando a interação das plaquetas com monócitos e células endoteliais, assim como com outras plaquetas via GPIb (Parise *et al.*, 2001; Calverley; Maness *et al.*, 2004; Smyth, 2009; Scharf, 2012).

Esses eventos ocorrem sem alteração da bioquímica celular que possa sugerir dano plaquetário (Shapiro, 2000; Baker; Brassar, 2011; Heemskerk; Mattheij; Cosemans, 2012).

A presença do conteúdo granular no tampão plaquetário e seu contato direto com as plaquetas circulantes possibilitam alteração da membrana celular, promovendo uma superfície ótima, rica em fosfolipídios aniônicos, especialmente fosfatidilserina, onde se desenvolvem os mecanismos de coagulação (Figura 4) (Shapiro, 2000; Baker; Brassar, 2011; Heemskerk; Mattheij; Cosemans, 2012).

Com a lesão do endotélio ocorre a exposição do fator tissular, e subsequente ligação com o fator VIIa, para iniciar o mecanismo de coagulação. Os fatores IX e X circulantes são convertidos pelo complexo Fator VIIa-Fator tissular para enzimas ativas IXa e Xa, respectivamente, que por retroação amplificam o sistema. Fosfolipídios de carga negativa presentes na membrana plaquetária, expostos após ativação das plaquetas, têm um potencial para reunir vários fatores de coagulação e complexos enzima-cofator na superfície plaquetária (Dahlbäck, 2005; Baker; Brassar, 2011; Monagle; Massicotte, 2011).

fibrinopeptídeos A e B das moléculas do fibrinogênio, com formação dos monômeros de fibrina, que se polimerizam formando a rede de fibrina (Monroe; Hoffman; Roberts, 2007; Monagle; Massicotte, 2011; Baker; Brassar, 2011; Heemskerk; Mattheij; Cosemans, 2012).

A membrana plaquetária é fosfolipoprotéica, sendo que os fosfolipídios são importantes em várias funções da plaqueta, principalmente por servir de substrato para produção de tromboxano A₂, um importante produto na ativação plaquetária e potente agonista plaquetário (Shapiro, 2000; Kamath *et al.*, 2001).

Com a ativação plaquetária, ocorre secreção dos conteúdos de grânulos densos e de grânulos α , onde um dos constituintes do grânulo α é expresso na membrana da plaqueta, a glicoproteína de membrana conhecida como proteína de membrana dependente de ativação plaquetária ou P-Selectina, que é rapidamente transportada à membrana com a ativação (Johnson-Tidey *et al.*, 1994; Jain; Harris; Ware, 2010).

Diversas alterações morfológicas associadas com ativação plaquetária se assemelham às características de apoptose de células nucleadas, como externalização de fosfatidilserina, redução do tamanho celular e formação de micropartículas (Patel *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2007).

Processos iguais a apoptose têm sido observados na biogênese e senescência plaquetária, como formação de micropartículas na membrana, condensação de membrana, fragmentação de DNA, redução do tamanho

celular e formação de corpos apoptóticos, e, como consequência, cada megacariócito forma mais de 10.000 plaquetas, que em aproximadamente 10 dias atingem a senescência, perdem habilidade funcional e são removidos da circulação (Stuart *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2007).

O mecanismo preciso de senescência plaquetária ainda continua incerto. Entretanto, têm sido observado senescência com diminuição do potencial de membrana mitocondrial e perda de assimetria de membrana, eventos também observados na apoptose (Pereira *et al.*, 1999; 2002).

Algumas evidências sugerem que a sobrevivência plaquetária é regulada pelo balanço antagônico entre a proteína pró-apoptótica Bax que induz produção plaquetária (Dale; Friesen, 2006), e a super-expressão da proteína anti-apoptótica Bcl-x_L que impede a fragmentação de megacariócitos. (Kaluzhny *et al.*, 2002). Com a degradação de Bcl-x_L e predomínio de Bak, as plaquetas seguem para morte celular e são removidas da circulação (Mason *et al.*, 2007).

2.3. PLAQUETA E APOPTOSE

A apoptose de células nucleadas é desencadeada por duas principais vias: a) uma via extrínseca à célula, que se inicia por interação de ligantes, como os representantes da superfamília do fator de necrose tumoral (TNF), com os chamados receptores de “morte”, como os representantes da superfamília de receptores de TNF; e b) outra via intrínseca à célula, que se

inicia por alterações na integridade mitocondrial, também chamada via de apoptose mitocôndria-dependente (Kile, 2009; Leytin, 2012; White *et al.*, 2012; Kile, 2014).

Embora a via extrínseca da apoptose em plaquetas ainda não esteja bem definida, alguns receptores de “morte”, assim como seus ligantes, já foram identificados tanto nas plaquetas quanto em megacariócitos, tais como receptores FAS, DR4 e DR5 (*death receptor 4 e 5*), e ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*, TRAIL-R1 e -R2) (Leytin, 2012; White *et al.*, 2012).

Já os mecanismos da via de apoptose mitocôndria-dependente já estão bem documentados em plaquetas. Foram evidenciados vários eventos como despolarização da membrana mitocondrial com alteração no seu potencial de membrana ($\Delta\Psi_m$) (Figura 5), liberação de proteínas apoptogênicas, como o citocromo *c*, o fator indutor de apoptose (AIF) e o ativador de proteases cisteínas aspartato específicas (*cysteine-aspartic specific proteases*, caspases), DIABLO (SMAC, *second mitochondria-derived activator of caspases*) do espaço inter membrana mitocondrial para o citoplasma. Além disso, foram descritos a formação de poros de permeabilidade mitocondrial (*mitochondrial permeability transition pore*, MPTP), ativação de caspases, clivagem de proteínas do citoesqueleto plaquetário, exposição em membrana de fosfatidilserina, formação de micropartículas derivadas de plaquetas (Figura 5) e controle de proteínas pró- e anti-apoptóticas da família Bcl-2 (Kile, 2009;

Gyulkhandanyan *et al.*, 2012; Leytin, 2012; Winkler *et al.*, 2012; White *et al.*, 2012; Kile, 2014).

Alguns mecanismos que desencadeiam a via de apoptose mitocôndria-dependente nas plaquetas já foram estabelecidos, como por intensa força de cisalhamento (Gyulkhandanyan *et al.*, 2012) ou por ação estímulos químicos, entres eles a trombina (Leytin *et al.*, 2006; Lopez *et al.*, 2008; Gyulkhandanyan *et al.*, 2012).

Figura 5. Estímulos químicos e força de cisalhamento induzindo apoptose plaquetária e remoção de plaquetas da circulação. Diferentes estímulos químicos, incluindo trombina, e aumento patológico da força de cisalhamento podem desencadear diferentes eventos apoptóticos que incluem despolarização da membrana mitocondrial interna ($\Delta\Psi_m$), formação de poro de permeabilidade mitocondrial (*mitochondrial permeability transition pore*, MPTP), expressão, ativação e translocação na mitocôndria de proteínas pró-apoptóticas da família Bcl-2, tais como Bak e Bax, liberação do citocromo c da mitocôndria para o citoplasma, ativação de caspases, clivagem de proteínas do citoesqueleto plaquetário, exposição de fosfatidilserina (PS) na membrana plasmática plaquetária, redução do tamanho plaquetário e formação de micropartículas derivadas de plaquetas (MPs), que resultam em remoção da circulação de plaquetas em apoptose. Adaptado de Gyulkhandanyan *et al.*, 2012.

A família de proteínas Bcl-2 é o principal regulador da via de apoptose dependente de mitocôndrias em células nucleadas, sendo constituída por membros com atividade anti-apoptótica (Bcl-x_L, Bcl-2, Bcl-w, A1, Mcl-1) e pró-apoptótica (Bak, Bax, Bid, Bim, Bad, Bik, Bmf, Noxas, Puma). Diversos estudos têm demonstrado que proteínas da família Bcl-2, como Bcl-x_L e Bcl-2 (anti-apoptóticas), Bak e Bax (pró-apoptóticas), são expressas em plaquetas (Bertino *et al.*, 2003; Kile, 2009; Gyulhandanyan *et al.*, 2012; Leytin, 2012; White *et al.*, 2012; Kile, 2014),

Estas proteínas da família Bcl-2 nas plaquetas podem ser ativadas através de agonistas, tanto ativadores da apoptose, como a trombina (Leytin *et al.*, 2006; Lopez *et al.*, 2008), quanto inibidores da apoptose, como o ADP, que através do receptor P2Y₁₂ (Figura 6) recruta Bcl-x_L para bloquear Bax e Bak (Zhang *et al.*, 2012).

Figura 6. Possível regulação da apoptose plaquetária pela ativação de P2Y₁₂. ADP liga-se ao receptor P2Y₁₂ e inibe apoptose plaquetária ao ativar a via IP3K/Akt: ativação de P2Y₁₂ leva à fosforilação de Akt e Bad. Sob a fosforilação de Akt, Bad é sequestrado no citoplasma pela proteína adaptadora 14-3-3, que previne a associação de Bad com Bcl-x_L. Como consequência, Bcl-x_L livre forma heterodímeros com proteínas Bak, prevenindo a dimerização de Bak na mitocôndria, assim antagonizando sua atividade pró-apoptótica. Em uma via indireta, Bcl-x_L inativa Bax por inibir sua translocação dentro da mitocôndria. Adaptado de Zhang *et al.*, 2012.

Alguns estímulos externos, como trombina (Leytin *et al.*, 2006; Lopez *et al.*, 2008), ionóforos do cálcio, anticorpos anti-plaquetas, assim como intensa força de cisalhamento (Leytin *et al.*, 2004) podem desencadear diversos eventos apoptóticos nas plaquetas, como a expressão, ativação e translocação na mitocôndria das proteínas pró-apoptose Bak e Bax, levando à permeabilização da membrana mitocondrial, liberação de citocromo C, que promovem a ativação de caspase-9 e, consequentemente, ativação da cascata

de caspases, com ativação de caspase-3, -6 e -7, que são responsáveis pela clivagem de proteínas intracelulares que levam à apoptose plaquetária (Leytin *et al.*, 2006; Lopez *et al.*, 2008; MacKenzie; Clark, 2012).

O preciso mecanismo de senescência e remoção plaquetária da circulação ainda não está bem elucidado. Entretanto, tem sido observado em senescência eventos também observados na apoptose, mas que não ocorrem na ativação plaquetária, como diminuição do potencial de membrana interna mitocondrial, perda de assimetria de membrana plaquetária (Pereira *et al.*, 1999; 2002; Gyulkhandanyan *et al.*, 2012), ativação de caspase-3, translocação de Bax e liberação de citocromo c (Gyulkhandanyan *et al.*, 2012). Desta mesma forma, o aumento da atividade apoptótica e da remoção plaquetária da circulação têm sido associados à trombocitopenia imune (Winkler *et al.*, 2012; Gyulkhandanyan *et al.*, 2012).

Como foi comentado anteriormente quando as plaquetas são ativadas ocorre exposição de fosfatidilserina (PS) na membrana, o mesmo ocorre quando estão em apoptose (Figura 5). Entretanto, a exposição de PS na ativação é dependente da mobilização do cálcio citoplasmático enquanto que na apoptose, a exposição do fosfolípide é dependente apenas de caspase. Isto sugere a existência de duas vias distintas de exposição de PS plaquetária, por apoptose e por ativação plaquetária dependente de cálcio (Kile, 2014).

Na apoptose plaquetária é consolidado o balanço antagônico entre Bcl- x_L e Bax, Bak (Figura 7). Com a degradação de Bcl- x_L , e predomínio de Bax, Bak, as plaquetas seguem para morte celular e são retiradas da circulação (Mason *et al.*, 2007; Kile, 2009; Leytin, 2012; Gyulkhandanyan *et al.*, 2012; ; Josefsson *et al.*, 2011; Lopez *et al.*, 2013; Kile, 2014).

Figura 7. A fragmentação de citoplasma de megacariócitos origina plaquetas diretamente na circulação sanguínea. Evidências sugerem que Bcl- x_L inibem a atividade pró apoptose de Bak e Bax, promovendo sobrevivência plaquetaria, assim como impedem a fragmentação de citoplasma de megacariócitos. Bax e Bak promovem produção de plaquetas. Adaptado de Qi; Hardwick, 2007.

2.4. PLAQUETOPENIA

Plaquetopenia é definida como contagem plaquetária em sangue periférico inferior a 150×10^3 plaquetas/mm³, sendo a causa mais comum de sangramentos anormais. Contudo, valores entre 100 e 150×10^3 plaquetas/mm³ não indicam necessariamente doença caso estas contagem estiverem estabilizadas por mais de 6 meses, fazendo com que seja mais indicado utilizar o limite de 100×10^3 plaquetas/mm³ para indicar condição patológica (Stasis, 2012).

Devido às plaquetas desempenharem um papel essencial no restabelecimento da integridade da parede do vaso, a plaquetopenia está associada a um defeito da hemostasia primária (Stasis, 2012).

Contagens de plaquetas superiores a 50×10^3 plaquetas/mm³, normalmente não geram problemas clínicos, exceto em casos de disfunção plaquetária coexistente com a plaquetopenia, fazendo com que estas plaquetopenias sejam evidenciadas apenas em um hemograma de rotina. Os sangramentos espontâneos clinicamente significativos não costumam ocorrer até que a contagem de plaquetas seja inferior a 10 ou a 20×10^3 /mm³ (Stasis, 2012; Izak; Bussel, 2014).

Diversos exames laboratoriais usualmente não indicam apenas a presença de plaquetopenia, mas são úteis para estabelecer o seu mecanismo. A plaquetopenia pode ser devido a fatores que podem atuar em conjunto ou isoladamente como: artefatos laboratoriais, hemodiluição, produção plaquetária deficiente, destruição acelerada de plaquetas e distribuição ou seqüestro anormal das plaquetas pelo baço. (Kamath *et al.*, 2001; George ; Rizvi, 2001; Stasis, 2012; Izak; Bussel, 2014).

Os artefatos laboratoriais pode-se incluir além do consumo das plaquetas *in vitro* devido à ativação da coagulação e das plaquetas durante a coleta do sangue, a pseudotrombocitopenia. A suspeita surge quando o indivíduo apresenta o número de plaquetas abaixo da normalidade, pontualmente, sem apresentar história clínica consistente de sangramento. O quelante de cálcio, EDTA quando em contato com as plaquetas promove mudanças conformacionais de membrana, dessas células, levando a formação de aglutinados plaquetários que são facilmente visíveis por microscopia óptica. É importante salientar que a presença de plaquetas gigantes e o satelitismo também podem levar a pseudoplaquetopenia (Kamath *et al.*, 2001; George ; Rizvi, 2001; Izak; Bussel, 2014).

Outro fator de plaquetopenia é hemodiluição que pode ocorrer em pacientes que sofreram uma hemorragia maciça e receberam colóides, cristalóides e hemoderivados pobres em plaquetas. Ao passo que sequestro plaquetário no baço é visto em esplenomegalia congestiva, devido a hipertensão portal e caracteriza-se pela redistribuição de plaquetas nas frações

circulante e retidas no baço (Kamath *et al.*, 2001; George ; Rizvi, 2001; Stasis *et. al.*, 2008; Stasis, 2012; Izak; Bussel, 2014).

A diminuição de produção de plaquetas é decorrente da redução da megacariopoese podendo ocorrer em síndromes de insuficiência da medula óssea, como na anemia aplástica, síndromes mielodisplásicas e trombocitopenia induzida por quimioterapia. Além disso, processos de ocupação da medula óssea, como linfomas, leucemias, metástases e granulomas medulares podem reduzir a produção das plaquetas. Já o aumento da destruição plaquetária é visto em condições tais como na coagulação intravascular disseminada e as microangiopatias trombóticas (Stasis, 2012; Izak; Bussel, 2014).

Em diversos casos de trombocitopenia, tais como na PTI e infecção pelo vírus da hepatite C, vários mecanismos associados podem contribuir para o desenvolvimento de trombocitopenia (Stasis, 2012; Abadi; Yarchovsky-Dolberg; Ellis, 2014).

A compreensão da cinética de produção e retirada da circulação das plaquetas tem gerado informações importantes a respeito do mecanismo responsável pelo desenvolvimento da plaquetopenia. Ao mesmo tempo surgem novas ferramentas laboratoriais que possibilitam o diagnóstico diferencial mais completo, capazes de detectar anormalidades relativamente raras e diminuindo a possibilidade de diagnósticos equivocados de trombocitopenia imune (Levine, 2004).

As plaquetopenias podem ser de origem hereditária ou adquirida. As hereditárias incluem anemia de Fanconi, anomalia de May-Hegglin, síndrome de Alport e síndrome de Wiskott-Aldrich. Já as adquiridas podem ser decorrentes de infecção viral, bacteriana ou parasitária, bem como deficiências nutricionais e ingestão de álcool e de certas drogas (George; Rizvi, 2001).

Em trombocitopenias, frequentemente associa-se menor atividade megacariocitopoiética. Esta deficiente produção plaquetária pode resultar da redução da população de células-tronco ou do compartimento megacariocítico, como na aplasia de medula ou por efeito secundário de drogas mielossupressoras ou radiação. A destruição plaquetária acelerada é a causa mais comum de trombocitopenia, e pode resultar de defeitos intracorpúsculares, comum em formas hereditárias, e anormalidades extracorpúsculares, causadas por processos imunológicos (trombocitopenia autoimune ou aloimune) e não imunológicos (George; Rizvi, 2001; Levine, 2004; Brace, 2007; Stasis, 2012; Abadi; Yarchovsky-Dolberg; Ellis, 2014; Izak; Bussel, 2014).

2.5. PÚRPURA TROMBOCITOPÊNICA IMUNE OU IDIOPÁTICA (PTI)

A PTI é uma doença auto-imune decorrente da destruição plaquetária acelerada associada a alteração da produção plaquetária, muitas vezes causada por anticorpos antiplaquetários. Esta condição é observada em várias doenças, como lúpus eritematoso sistêmico ou infecção por HIV, mas pode

também ocorrer sem identificação de doença de base ou causa, quando é denominada primária ou idiopática, enfatizando a causa desconhecida da doença (Kuwana *et al.*, 2006).

Na reunião do Consenso Internacional realizada em Vicenza, Itália, em 2007, a PTI teve sua terminologia e seus critérios diagnósticos revistos, sendo padronizada a retirada do termo púrpura, pois na maioria dos casos esta sintomatologia esta ausente. Também foi decidido evitar o termo idiopática, preferindo-se Imune para enfatizar o caráter imunológico do mecanismo da doença. Outra decisão foi a escolha do termo "primário", ao invés de idiopática, para indicar a ausência de qualquer iniciador óbvio e ou subjacente causa. Portanto, Trombocitopenia Imune substitui os termos utilizados até então (Rodighero *et al.*, 2009; Provan *et al.*, 2010; Anoop, 2012; Stasis, 2012). Entretanto, a sigla PTI (no inglês ITP), largamente difundida, consagrada e recorrente em pesquisas sobre o assunto, foi preservada, sendo agora proposta para representar *immune thrombocytopenia* (trombocitopenia imunológica) (Rodighero *et al.*, 2009; Provan *et al.*, 2010; Anoop, 2012; Stasis, 2012).

Além da terminologia, ficou ainda estabelecido que o valor da contagem plaquetária a ser empregado para diagnóstico da Trombocitopenia Imune seria inferior a $100 \times 10^3/\text{mm}^3$. Isto se baseou em duas evidências: a) estudo de coorte prospectivo mostrando a probabilidade de 6,9% (intervalo de confiança de 95%, 4% a 12%) para que indivíduos saudáveis com contagem de plaquetas entre 100 e $150 \times 10^3/\text{mm}^3$ desenvolvam plaquetopenia grave num

período de 10 anos e b) em algumas localidades, contagens de plaquetas entre 100 e $150 \times 10^3/\text{mm}^3$ são encontradas em indivíduos normais (Brain, 1996; Stasi *et al.*, 2006; Adibi *et al.*, 2007; Provan *et al.*, 2010; Anoop, 2012; Stasis, 2012).

Alguns estudos apontam uma incidência de PTI de cerca de 1 a 3 casos por 100.000 adultos, e que um quinto a um terço desses indivíduos seriam assintomáticos, sendo diagnosticados em achados incidentais de trombocitopenia. A PTI frequentemente é uma doença crônica em adultos, fazendo com que a sua prevalência, de aproximadamente 12 por 100.000 adultos, exceda a sua incidência. Há um entendimento de que a PTI tenha predominância em adultos jovens do sexo feminino, que sua incidência aumenta com a idade, com a maior probabilidade de desenvolvimento da doença em indivíduos acima de 75 anos, e que a partir dos 70 anos de idade, a predominância recaia sobre o sexo masculino (George; Arnold, 2014).

A PTI caracteriza-se como uma trombocitopenia isolada, sem anemia e leucopenia, e que não se encontre associação clinicamente aparente com condições ou outras causas de trombocitopenia. Nenhum critério de diagnóstico existe atualmente, sendo seu diagnóstico é estabelecido apenas após a exclusão de outras causas de trombocitopenia e não serem identificadas condições que possam ser responsáveis por uma PTI secundária (Thota, 2014).

Alterações morfológicas de plaquetas, como plaquetas gigantes e ausência de grânulos, não são características da PTI. Estas morfologias anormais de plaquetas devem levar à suspeita de um transtorno de plaquetas herdado. Também não se caracteriza PTI por alterações morfológicas nas séries leucocitária e eritróide ou parâmetros de coagulação anormais. Qualquer uma desses achados em associação com trombocitopenia deve levar avaliação urgente para outras condições (George; Arnold, 2014).

A intensidade da plaquetopenia na PTI normalmente estabelece a necessidade de tratamento. Casos de hemorragias, usualmente estão diretamente relacionados à intensidade da plaquetopenia, ou mesmo devido à presença de comorbidades. Sangramento cutâneo grave, epistaxe prolongado, sangramento gengival, hematúria ostensiva ou menorragia, e hemorragia intracraniana ou outra hemorragia interna podem desenvolver-se em plaquetopenias inferiores a $10 \times 10^3/\text{mm}^3$. Pacientes com contagem de plaquetas abaixo de $20 \times 10^3/\text{mm}^3$ geralmente apresentam petéquias ou púrpura. E quando a contagem está acima de 50×10^3 plaquetas/ mm^3 , os pacientes geralmente são assintomáticos e ficam sob observação (Abadi; Yarchovsky-Dolberg; Ellis, 2014).

Aproximadamente 60% dos pacientes de PTI apresentam destruição de plaquetas relacionada à produção de anticorpos contra GPIIb-IIIa, o receptor de fibrinogênio; contra a GPIb-IX, o receptor do fator de Von Willebrand; e a GPIa-IIa, receptor do colágeno. Nestes casos, estas plaquetas são fagocitadas por macrófagos no baço e no fígado, e posteriormente há apresentação de

peptídeos antigênicos a partir de componentes de plaquetas proteolisadas por macrófagos ou células dendríticas. Isto pode conduzir ao recrutamento e ativação de células T, que por sua vez interagem e estimulam as células B a produzir novos anticorpos contra os peptídeos derivados das plaquetas (McCrae, 2011).

Apesar da contínua detecção de anticorpos anti-plaquetários, a PTI pode entrar remissão, sugerindo mecanismos independentes de anticorpos como responsáveis pela trombocitopenia em alguns indivíduos (Kistanguri; McCrae, 2014).

Os conceitos que cercam os mecanismos de trombocitopenia na PTI mudaram a partir da visão tradicional do aumento da destruição plaquetária mediada por auto-anticorpos para mecanismos mais complexos. Nestes, os efeitos são mediados por linfócitos T, com impacto na megacariocitopoiese, tanto no comprometimento da maturação de megacariócitos quanto na destruição plaquetária. Na produção de auto-anticorpos anti-plaquetas haveria a participação de macrófagos e linfócitos B, bem como participação de fatores genéticos ou relacionados a infecções (Provan *et al.*, 2010) (Figura 8).

Pacientes com PTI apresentam uma maior população de plaquetas que expressam P-selectina (CD62P+), glicoproteína marcadora de ativação, assim como um aumento de micropartículas derivadas de plaquetas (MPP), também relacionadas à ativação plaquetária. Tanto as plaquetas ativadas quanto as MPP apresentam maior atividade pró-coagulante. Alguns autores mostraram que pacientes trombocitopênicos com aumento de plaquetas ativadas e de

MPP apresentam menor grau de sangramento quando comparados a indivíduos com a mesma contagem de plaquetas, mas com baixos níveis de ativação plaquetária e de MPP (Ahn; Horstman, 2002; Gernsheimer, 2008; Tantawy *et al.*, 2010).

Recentemente, têm-se destacado reduzida atividade megacariocitopoiética e menor sobrevivência de megacariócitos como componentes importantes na patogênese da PTI. Estudos sobre esta patologia mostram megacariócitos com anormalidades indicativas de apoptose, assim como presença anticorpos contra estes precursores resultando em supressão da maturação de megacariócitos, morte celular e, conseqüente, reduzida produção de plaquetas (Abadi; Yarchovsky-Dolberg; Ellis, 2014).

Tanto as plaquetas quanto os megacariócitos apresentam vias funcionais associadas a mecanismos de apoptose envolvidos nos eventos necessários para a formação e liberação das plaquetas, e regulação da sobrevida destas células, por mecanismo apoptótico intrínseco (Josefsson *et al.*, 2012; von Gunten; Wehrli; Simon, 2013). As plaquetas e megacariócitos de pacientes com PTI têm apresentado sinais de morte celular aberrante (von Gunten; Wehrli; Simon, 2013).

Figura 8. Mecanismo imunológico com participação principal de linfócitos T citotóxico (L_o Tc) na destruição de plaquetas e possível impacto na maturação de megacariócitos e produção de plaquetas; macrófagos APC (*antigen presenting cell*, célula apresentadora de antígenos) fagocitando plaquetas e apresentando antígenos a linfócitos T auxiliares (L_o Th) por interferentes de fatores genéticos ou infecções; inibição de linfócitos T regulatórios (L_o Treg); linfócitos Th apresentando antígenos a linfócitos B (L_o B) que produzem de auto-anticorpos contra plaquetas com comprometimento na maturação de megacariócitos e na produção de plaquetas. Adaptado de Stasi *et al.*, 2008.

A inibição de Bcl-x_L induz a apoptose e, conseqüentemente, a redução da sobrevivência plaquetária na circulação. Por outro lado a proteína inibe a ativação plaquetária por diminuição da sinalização via cálcio. Recentemente foi mostrado que as plaquetas recém lançadas na circulação, as plaquetas reticuladas, são menos suscetíveis a apoptose (Vogler *et al.*, 2012). Dessa maneira, informações sobre a destruição plaquetária podem ser obtidas pela avaliação de moléculas Bcl-x_L, pró-sobrevivência, e Bak, pró-apoptótica, elucidando a existência de morte celular plaquetária prematura na PTI (Mason *et al.*, 2007; Qi; Hardwick, 2007; Gyulkhandanyan *et al.*, 2012; Josefsson *et al.*, 2012). Porém, os mecanismos que levam a diferentes graus de intensidade de plaquetopenia e manifestações clínicas ainda não estão totalmente elucidados.

Até o momento a literatura não apresentou evidências quanto à associação entre a atividade megacariocitopoietica, na PTI e a destruição plaquetária nos diferentes graus de plaquetopenia instalados, nem tão pouco a relação dessa associação com o estado de ativação das plaquetas e formação de micropartículas.

Com o intuito de distinguir ou evidenciar associação de impacto na atividade megacariocitopoietica e na destruição plaquetária com o grau de plaquetopenia instalado, assim como relacionar estes dados com o estado de ativação das plaquetas e com a formação de micropartículas, faz com que este estudo tenha por objetivo tentar estabelecer uma relação entre produção e apoptose plaquetária nos diferentes níveis de plaquetopenia na PTI.

3. OBJETIVO

Avaliar o balanço entre produção e apoptose de plaquetas na trombocitopenia imune (PTI) de diferentes graus de intensidade de plaquetopenia.

3.1. Objetivos Específicos

- Avaliar a atividade megacariocitopoiética de pacientes com PTI através da quantificação de plaquetas reticuladas por citometria de fluxo;
- Avaliar a formação de micropartículas derivadas de plaquetas e derivadas de outras células nos pacientes com PTI;
- Avaliar a ativação plaquetária em pacientes com PTI por citometria de fluxo, utilizando anti-CD62P (anti-P-selectina);
- Avaliar a expressão das proteínas plaquetárias Bcl-x_L, anti apoptótica, e Bax, pró apoptótica, por *Western Blotting* em pacientes com PTI;
- Relacionar os resultados obtidos para os diferentes graus de plaquetopenias dos pacientes com PTI.

4. CASUÍSTICA

O presente estudo avaliou, após o consentimento livre e esclarecido, 21 pacientes com diagnóstico de trombocitopenia imune (PTI) primária, “idiopática”, não esplenectomizados. Todos os pacientes eram acompanhados regularmente no ambulatório de Doenças Hemorrágicas e Trombóticas, do Serviço de Hematologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Como grupo controle, foram avaliados 10 doadores de sangue da Fundação Pró-Sangue Hemocentro de São Paulo.

O estudo foi dividido em dois grupos (pacientes e controle), sendo que o grupo de pacientes foi subdividido de acordo com a contagem de plaquetas.

- Grupo Pacientes com PTI (GP), formado por homens e mulheres com idade igual ou superior a 18 anos e contagem de plaquetas abaixo de $150 \times 10^3/\text{mm}^3$ subdivididos em:

- a)** com contagem de plaquetas entre 100 e $149 \times 10^3/\text{mm}^3$ ($>100 \times 10^3/\text{mm}^3$)*;
- b)** com contagem de plaquetas entre 50 e $100 \times 10^3/\text{mm}^3$ ($50-100 \times 10^3/\text{mm}^3$);
- c)** com contagem de plaquetas abaixo de $50 \times 10^3/\text{mm}^3$ ($<50 \times 10^3/\text{mm}^3$).

*os pacientes do grupo $>100 \times 10^3/\text{mm}^3$ tiveram diagnóstico prévio de PTI, e sob tratamento com Prednisona alcançaram esta contagem de plaquetas. Entretanto, no momento do estudo o tratamento medicamentoso já havia sido suspenso.

- **Grupo Controle (GC):** formado por homens e mulheres com idade igual ou superior a 18 anos, com contagem de plaquetas entre 150 e $450 \times 10^3/\text{mm}^3$.

5. METODOLOGIA

As amostras de sangue dos pacientes foram obtidas por punção de veia periférica do membro superior. Foi utilizado um tubo a vácuo contendo o anticoagulante EDTA, para a contagem manual de plaquetas, quantificação de plaquetas reticuladas, ativação plaquetária e micropartículas derivadas de plaquetas e de outras células, por citometria de fluxo. Para a avaliação das proteínas Bcl-x_L e Bax, foram colhidos três tubos a vácuo contendo o anticoagulante citrato de sódio 0,109mol/L na proporção de 1 parte de anticoagulante para 9 partes de sangue.

5.1. Contagem manual de plaquetas

A contagem manual de plaquetas foi realizada em câmara de Neubauer modificada segundo o método de Rees-Ecker (Ryan, 2001; Perkins, 2004).

5.2. Quantificação de plaquetas reticuladas com Tiazol *Orange* (TO), plaquetas ativadas e micropartículas derivadas de plaquetas e micropartículas derivadas de outras células por citometria de fluxo

A partir do tubo de sangue colhido com EDTA, foram retirados 20µL e adicionados em um tubo de polietileno apropriado para citometria de fluxo. Nesse mesmo tubo foram adicionados, 4µL de anticorpo anti-GPIIbIIIa (CD41a, BD), marcado com fluorocromo APC (*Allophycocyanin*); 4µL de anticorpo anti-P-selectina (CD62P, BD), marcado com fluorocromo PE (*Phycoerythrin*); 4µL de anticorpo anti-PECAM-1 (*platelet endothelial cell adhesion molecule-1*;

CD31, BD), marcado com fluorocromo Cy5-PE (*Phycoerythrin*-Cy5); e 1mL de solução de trabalho de Tiazol *Orange* (TO) contendo 4,999mL tampão fosfato salina (NaCl 0,85%; fosfato bibásico de sódio 0,013M); 0,1% de Azida Sódica; 0,1% de soro fetal bovino, pH 7,2 e 1µL de uma solução estoque de TO (SIGMA; 0,1mg/mL em metanol, Vetec), concentração final de TO de 20 ng/mL.

Para o controle da reação foram utilizados anticorpos isotipos de cada um dos anticorpos monoclonais com seus respectivos fluorocromos utilizados acrescido de 2,5µL de solução de RNAase (20ng/mL, SIGMA). A reação foi incubada por 30 minutos em temperatura ambiente, protegida da luz. As fluorescências foram medidas no citômetro de fluxo FACScan (BD, San Jose, CA) usando excitação de 488nm com íon laser de argônio. Os dados obtidos foram analisados sobre as populações escolhidas que expressavam CD41a utilizando o programa *Cell Quest*.

As micropartículas foram adquiridas e analisadas em regiões demarcadas utilizando-se *beads* de 1µm de diâmetro (polipropileno de calibração - BD BioScience) em gráfico de *forward scatter* (FSC) por *side scatter* (SSC) em escala linear. O eventos adquiridos na região demarcada (<1µm) e positivos para o anti-CD31, foram discriminados como micropartículas derivadas de plaquetas (CD31+/CD41+) ou derivadas de outras células (CD31+/CD41-). Os resultados foram expressos em número total de micropartículas derivadas de plaquetas por milímetro cúbico de sangue total, sendo sempre adquiridas um milhão de eventos >1µm CD41+.

5.3. Avaliação das proteínas Bcl-x_L e Bax plaquetária por Western Blotting

Inicialmente as plaquetas foram separadas do sangue total por gradiente de densidade, segundo método de Bagamery et al., 2005 modificado utilizando o reagente OPTiPrep (60% peso/volume solução de iodixanol em água destilada, densidade 1,32g/mL – SIGMA) diluído em solução B (20mL de tampão HEPES 100mM, 50mL NaCl 0,85%; 1mL EGTA 100mM). A solução de uso do OPTiPrep foi 5 volumes de OptiPrep para 22 volumes de Solução B.

A um tubo de polipropileno de 15 mL (Falcon, BD) contendo 5mL da solução de uso do OptiPrep foram adicionados, delicadamente, 5mL de sangue citratado com o auxílio de pipeta de transferência plástica, evitando-se a mistura das duas fases. Em seguida o tubo foi centrifugado a 1350 rotações por minuto (rpm) por 15 minutos em temperatura ambiente.

As plaquetas foram retiradas da fase entre o plasma e o gradiente e transferidas para outro tubo de 15 mL onde foi adicionado o mesmo volume do tampão de lavagem de plaquetas pH 6,4 (citrato de sódio 10 mM, NaCl 150mM, EGTA 1mM, dextrose 1%). Após homogeneização, as plaquetas ressuspensas foram transferidas para tubos cônicos de 1 mL (tipo eppendorf) e centrifugadas por 30 segundos a 10.000rpm em temperatura ambiente.

Após o descarte do sobrenadante, o botão plaquetário foi ressuspenso delicadamente em aproximadamente 200µL com mesmo tampão de lavagem. Esse processo de lavagem foi repetido duas vezes nas mesmas condições anteriores.

O próximo passo foi a ressuspensão do botão plaquetário com aproximadamente 300µL com tampão de lise (SIGMA) pH 7,4 contendo os inibidores de proteases PMSF 1mM (*phenylmethanesulfonyl fluoride*, – SIGMA); NaPyr 10mM (Pirofosfato de sódio – SIGMA); NaF 50mM (Fluoreto de sódio – SIGMA); Na₃VO₄ 2mM (Ortovanadato de Sódio – SIGMA); *Clastolactacystin-β-lactone* 1µM em DMSO (Calbiochem); coquetel de inibidores de proteases (SIGMA) ressuspenso em 5 mL de água destilada e diluído 1:100 em tampão de lise.

As plaquetas em tampão de lise foram agitadas com o auxílio de agitador tipo vórtex (AP56, PHOENIX) para o despreendimento e lise total do *pellet* plaquetário, em banho de gelo por 30 minutos e imediatamente centrifugadas a 12.000 rpm por 10 minutos a 4°C.

O sobrenadante, contendo o extrato foi congelado em nitrogênio líquido e mantido a 80°C negativos até a determinação da concentração das proteínas totais segundo método de Bradford, 1976.

O sobrenadante do lisado plaquetário foi ajustado para 30µg de proteínas em tampão de amostra (Tris-HCl pH6,8 50mM; 2-Mercaptoetanol 5%; SDS 2%; Bromofenol 0,05%; Glicerol 10%) e submetido a eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% a 25 mA em temperatura ambiente em um litro do tampão de corrida (glicina 188g; Tris-Base 30,2g; SDS 10g; H₂O qsp. 1 litro, pH 8,3). Após a separação, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (45µm) em sistema semi-seco (papel de filtro embebido em Tampão de transferência (Tris-Base 48mM; Glicina 39mM; SDS 0,037%; Metanol 20%, pH 8,3) a 50 mA durante uma hora em temperatura ambiente. O controle da transferência total das proteínas foi realizado com o corante Ponceau (ácido acético 5%, SIGMA; Ponceau S 0,1%, SIGMA; solução aquosa).

Após a retirada do excesso de Ponceau com água destilada, a membrana foi incubada por duas horas a temperatura ambiente no tampão Tris-Salino-Tween (TBS-T) (Tris 150mM; NaCl 0,85%; Tris-Base 20mM; 0,1% Tween 20) e 5% de leite desnatado para o bloqueio de epítomos inespecíficos. Após esse tempo a membrana foi novamente lavada com TBS-T e incubada *overnight* a 4°C com o anticorpo primário anti-Bcl-x_L (BD Pharmigen) na diluição de 1:1000 ou com anticorpo anti-Bax (Sigma) diluído 1:1000 em TBS-T.

No dia seguinte a membrana foi lavada três vezes de 15 minutos com o tampão TBS-T e incubada por uma hora, em temperatura ambiente com o anticorpo secundário anti-*mouse* – HPR (Calbiochem) diluído 1:2000 em TBS-T, seguida de uma nova lavagem com o tampão TBS-T.

A presença das proteínas Bcl-x_L e Bax presentes na membrana foi revelada por reação de quimioluminescência com o reagente ECL (*Enhanced Chemiluminescence*, GE Life Sciences) e com exposição aproximadamente de dez segundos a filme radiográfico. Os filmes foram escaneados e a leitura densitométrica foi realizada com o auxílio do *software* Scion Image (Scion Corporation).

6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram submetidos ao teste *one-way* ANOVA seguido de análise de comparações múltiplas de Tukey, sendo considerados estatisticamente significantes quando $p \leq 0,05$.

7. RESULTADOS

Durante o período do estudo, 32 pacientes plaquetopênicos consentiram livre e esclarecidamente para o uso de suas amostras sanguíneas na realização do projeto de pesquisa. Entretanto, em virtude de obtenção de posteriores informações como uso de determinados medicamentos, associação de outras patologias à plaquetopenia ou realização de esplenectomia, os subgrupos plaquetopênicos da pesquisa foram constituídos por 07 pacientes de PTI cada. O grupo controle foi composto por 10 indivíduos saudáveis. As médias das idades dos indivíduos que compõem estes grupos estão representadas na Tabela 1. A Tabela 2 apresenta as médias dos resultados para os parâmetros plaquetas reticuladas; micropartículas derivadas de plaquetas (PMP); micropartículas derivadas de outras células (CMP); plaquetas ativadas; relação entre Bcl-xL/Bax obtidos para cada grupo analisado.

Idade/Grupos	Controle	<50x10 ³	50-100x10 ³	>100x10 ³
Idade	29,7 (25,4 a 35,0)	42,4 (33,2 a 51,6)	39,3 (28,9 a 49,7)	42,8 (35,1 a 61,3)

Tabela 1. Idade dos indivíduos de cada grupo da pesquisa. Os resultados foram expressos em médias $\pm$ intervalo de confiança de 95%.

Parâmetros/Grupos	Controle	<50x10 ³	50-100x10 ³	>100x10 ³
-------------------	----------	---------------------	------------------------	----------------------

Plaquetas reticuladas (%)	3,97 ± 0,847	13,65 ± 1,437 ^a	15,05 ± 1,221 ^a	44,83 ± 5,231 ^{a,b}
PMP (10 ³ /mm ³)	214,8 ± 29,51	369,0 ± 130,2	669,9 ± 91,11 ^{a,c}	1437 ± 83,87 ^{a,b}
CMP (10 ³ /mm ³)	83,20 ± 8,849	442,4 ± 182,1	708,1 ± 150,3 ^a	484,7 ± 120,3 ^a
Plaquetas Ativadas (%)	34,97 ± 2,325	79,69 ± 5,817 ^{a,d}	62,75 ± 5,978 ^a	66,94 ± 8,329 ^a
Bcl-xL/Bax	1,319 ± 0,043	1,002 ± 0,059 ^a	0,876 ± 0,086 ^a	0,711 ± 0,056 ^{a,b}

Tabela 2. Os resultados foram expressos em médias ± SEM para os parâmetros plaquetas reticuladas; micropartícula derivadas de plaquetas (PMP); micropartículas derivadas de outras células (CMP); plaquetas ativadas; relação entre Bcl-xL/Bax. ^a $\rho \leq 0.05$ grupo controle comparado com os outros grupos; ^b $\rho \leq 0.05$ grupo pacientes com PTI $>100 \times 10^3/\text{mm}^3$ comparado com os outros grupos plaquetopênicos; ^c $\rho \leq 0.05$ grupo pacientes com PTI $50-100 \times 10^3/\text{mm}^3$ comparado com o grupo $<50 \times 10^3/\text{mm}^3$; ^d $\rho \leq 0.05$ grupo pacientes com PTI $<50 \times 10^3/\text{mm}^3$ comparado com os outros grupos plaquetopênicos (one-way ANOVA; Tukey).

Figura 9. Gráfico de idade dos indivíduos participantes do estudo. Médias ± SEM das Idades dos grupos controle, pacientes com PTI com menos de $50 \times 10^3/\text{mm}^3$ ($<50 \times 10^3$), pacientes com PTI com 50 a $100 \times 10^3/\text{mm}^3$ ($50-100 \times 10^3$), pacientes com PTI com mais que 100×10^3 plaquetas $/\text{mm}^3$ ($>100 \times 10^3$).

7.1. Quantificação de plaquetas reticuladas com Tiazol *Orange* (TO) por citometria de fluxo

O grupo controle apresentou média $3,97\% \pm 0,8477$ (erro médio padrão, SEM), enquanto que o grupo de pacientes com contagem de plaquetas abaixo de $50 \times 10^3/\text{mm}^3$ ($<50 \times 10^3/\text{mm}^3$) apresentou $13,65\% \pm 1,437$ de plaquetas reticuladas (Figura 10). O grupo de pacientes com número de plaquetas entre 50 a $100 \times 10^3/\text{mm}^3$ ($50-100 \times 10^3/\text{mm}^3$) teve $15,05\% \pm 1,221$ e o grupo dos pacientes plaquetopênicos com mais de $100 \times 10^3/\text{mm}^3$ ($>100 \times 10^3/\text{mm}^3$) apresentou $44,8\% \pm 5,231$ de plaquetas reticuladas. Todos os subgrupos plaquetopênicos apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle. O grupo $>100 \times 10^3/\text{mm}^3$ apresentou diferença estatística significativa em relação aos demais grupos plaquetopênicos (Tabela 2; Figura 11).

Figura 10. Gráficos representativos da quantificação das plaquetas reticuladas dos grupos controle, $<50 \times 10^3/\text{mm}^3$; $50\text{-}100 \times 10^3/\text{mm}^3$; $>100 \times 10^3/\text{mm}^3$ por citometria de fluxo. Seleção da população CD41a+ em gráfico de CD41a por complexidade (SSC, *Side Scatter*). População CD41a+ em gráfico de tamanho (FSC, *forward scatter*) por SSC. Marcação com tiazol orange (TO, 20ng) com RNase em tubo controle. Marcação com tiazol orange (TO, 20ng) em tubo de amostra.

Figura 11. Gráfico da contagem de Plaquetas Reticuladas citometria de fluxo dos indivíduos participantes do estudo. Médias $\pm$ SEM das contagens de Plaquetas Reticuladas (%) dos grupos controle, pacientes com PTI com menos de $50 \times 10^3/\text{mm}^3$ (<50x10³), pacientes com PTI com 50 a $100 \times 10^3/\text{mm}^3$ (50-100x10³), pacientes com PTI com mais que $100 \times 10^3/\text{mm}^3$ (>100x10³). * $\rho \leq 0,05$ em relação ao grupo controle; ** $\rho \leq 0,05$ para todos os demais grupos.

Figura 12. Gráficos representativos da quantificação de micropartículas derivadas de plaquetas dos grupos controle, $<50 \times 10^3/\text{mm}^3$; $50-100 \times 10^3/\text{mm}^3$; $>100 \times 10^3/\text{mm}^3$ por citometria de fluxo. Seleção da população com aproximadamente $1\mu\text{m}$ de diâmetro (*microbeads*) em gráfico de tamanho (FSC, *forward scatter*) por complexidade (SSC, *Side Scatter*). População CD41a+/CD31+ em gráfico CD41a por CD31.

7.2. Quantificação de micropartículas derivadas de plaquetas e micropartículas derivadas de outras células por citometria de fluxo

A quantificação de micropartículas derivadas de plaquetas (PMP; Figura 12) mostrou que o grupo controle apresentou média de $214,8 \text{ mil/mm}^3 \pm 29,51$ (erro médio padrão, SEM), enquanto que o grupo $<50 \times 10^3/\text{mm}^3$ média de PMP $369,0 \text{ mil/mm}^3 \pm 130,2$; o grupo $50\text{-}100 \times 10^3/\text{mm}^3$ apresentou $669,9 \text{ mil/mm}^3 \pm 91,1$, e o grupo $>100 \times 10^3/\text{mm}^3$ média $1437 \text{ mil/mm}^3 \pm 83,87$ de PMP. Apenas os subgrupo $50\text{-}100 \times 10^3/\text{mm}^3$ e $>100 \times 10^3/\text{mm}^3$ apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle. O grupo $>100 \times 10^3/\text{mm}^3$ apresentou diferença estatisticamente significativa em relação aos demais grupos plaquetopênicos (Tabela 2; Figura 13).

Figura 13. Gráfico de contagem de Micropartículas Derivadas de Plaquetas (PMP) citometria de fluxo dos indivíduos participantes do estudo. Médias $\pm$ SEM da contagem de PMP ($\times 10^3/\text{mm}^3$) dos grupos: controle; pacientes com PTI com contagem de plaquetas menor que $50 \times 10^3/\text{mm}^3$ ($<50 \times 10^3$); pacientes com PTI com contagem de plaquetas entre $50\text{-}100 \times 10^3/\text{mm}^3$ ($50\text{-}100 \times 10^3$); pacientes com PTI com contagem de plaquetas maior que $100 \times 10^3/\text{mm}^3$ ($>100 \times 10^3$). * $p \leq 0,05$ em relação ao grupo controle; ** $p \leq 0,05$ para todos os demais grupos.

Já com relação à quantificação de micropartículas derivadas das demais células (hemácias, monócitos, células endoteliais; CMP), o grupo controle apresentou $83,20 \times 10^3/\text{mm}^3 \pm 8,85$ (erro médio padrão, SEM), enquanto que o grupo $<50 \times 10^3/\text{mm}^3$, $442,4 \times 10^3/\text{mm}^3 \pm 182,1$, o grupo $50-100 \times 10^3/\text{mm}^3$ mostrou $708,1 \times 10^3/\text{mm}^3 \pm 150,3$, e o grupo $>100 \times 10^3/\text{mm}^3$ mostrou $484,7 \times 10^3/\text{mm}^3 \pm 120,3$. Do mesmo modo que na quantificação de PMP, apenas os grupos $50-100 \times 10^3/\text{mm}^3$ e $>100 \times 10^3/\text{mm}^3$ apresentaram diferença estatisticamente significativa para CMP em relação ao grupo controle. Não se observou diferença estatisticamente significativa entre os três grupos plaquetopênicos (Tabela 2; Figura 14).

Figura 14. Gráfico de contagem de Micropartículas Derivadas de Outras Células (CMP) citometria de fluxo dos indivíduos participantes do estudo. Médias $\pm$ SEM da contagem de CMP ($\times 10^3/\text{mm}^3$) dos grupos: controle; pacientes com PTI com contagem de plaquetas menor que $<50 \times 10^3/\text{mm}^3$ ($<50 \times 10^3$); pacientes com PTI com contagem de plaquetas entre $50-100 \times 10^3/\text{mm}^3$ ($50-100 \times 10^3$); pacientes com PTI com contagem de plaquetas maior que $>100 \times 10^3/\text{mm}^3$ ($>100 \times 10^3$). * $p \leq 0,05$.

7.3. Determinação de ativação plaquetária por citometria de fluxo

O grupo controle apresentou $34,97\% \pm 2,32$ (erro médio padrão, SEM), de ativação plaquetária (Figura 15), enquanto que o grupo $<50 \times 10^3/\text{mm}^3$ mostrou $79,69\% \pm 5,82$; o grupo $50-100 \times 10^3/\text{mm}^3$ $62,75\% \pm 5,99$; e grupo $>100 \times 10^3/\text{mm}^3$ $66,94\% \pm 8,33$. Todos os grupos plaquetopênicos apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle. Não se observou diferença estatisticamente significativa entre os três grupos plaquetopênicos (Tabela 2; Figura 16).

Figura 15. Gráficos representativos da quantificação de plaquetas ativadas dos grupos controle, $<50 \times 10^3/\text{mm}^3$; $50-100 \times 10^3/\text{mm}^3$; $>100 \times 10^3/\text{mm}^3$ por citometria de fluxo. Seleção da população CD41a+ em gráfico de CD41a por complexidade (SSC, *Side Scatter*). População CD41a+/CD62P+ em gráfico CD41a por CD62P.

Figura 16. Gráfico de contagem de Plaquetas Ativadas por citometria de fluxo dos indivíduos participantes do estudo. Médias $\pm$ SEM da contagem de Plaquetas Ativadas (%) dos grupos: controle; pacientes com PTI com contagem de plaquetas menor que $<50 \times 10^3/\text{mm}^3$ ($<50 \times 10^3$); pacientes com PTI com contagem de plaquetas entre $50-100 \times 10^3/\text{mm}^3$ ($50-100 \times 10^3$); pacientes com PTI com contagem de plaquetas maior que $>100 \times 10^3/\text{mm}^3$ ($>100 \times 10^3$). * $p \leq 0,05$.

7.4. Avaliação das proteínas Bcl-x_L e Bax plaquetárias por Western Blotting

Na avaliação das proteínas plaquetárias anti-apoptótica Bcl-x_L (Figura 16) e pró-apoptótica Bax (Figura 17), através da relação Bcl-x_L/Bax (anti-apoptótica/ pró-apoptótica) evidenciou-se que o grupo controle apresentou relação média $1,319 \pm 0,043$ (erro médio padrão, SEM), enquanto que os resultados dos grupos trombocitopênicos foram: $<50 \times 10^3/\text{mm}^3$ $1,002 \pm 0,059$; $50-100 \times 10^3/\text{mm}^3$ $0,876 \pm 0,086$; e $>100 \times 10^3/\text{mm}^3$ $0,711 \pm 0,057$. Todos os grupos de pacientes plaquetopênicos apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle. O grupo $>100 \times 10^3/\text{mm}^3$ apresentou diferença estatisticamente significativa em relação aos demais grupos plaquetopênicos (Tabela 2; Figura 18).

Figura 17. Imagens representativas das análises em *Western Blotting* do lisado plaquetário dos grupos controle; $>100 \times 10^3/\text{mm}^3$ ($>100 \times 10^3$); $50-100 \times 10^3/\text{mm}^3$ ($50-100 \times 10^3$); $<50 \times 10^3/\text{mm}^3$ ($<50 \times 10^3$) com os anticorpos: anti-Bcl-x_L (26kDa, Bcl-x_L; 22kDa, Bcl-x_S); anti-Bax (21kDa, Bax); e anti- β actina (Actina) como controle da metodologia.

Figura 18. Gráfico da relação Bcl-x_L/Bax por *Western Blotting* dos indivíduos participantes do estudo. Médias $\pm$ SEM da relação Bcl-x_L/Bax dos grupos: controle; pacientes com PTI com contagem de plaquetas menor que $<50 \times 10^3/\text{mm}^3$ ($<50 \times 10^3$); pacientes com PTI com contagem de plaquetas entre $50-100 \times 10^3/\text{mm}^3$ ($50-100 \times 10^3$); pacientes com PTI com contagem de plaquetas maior que $>100 \times 10^3/\text{mm}^3$ ($>100 \times 10^3$). * $p \leq 0,05$ em relação ao grupo controle; ** $p \leq 0,05$ para todos os demais grupos.

8. DISCUSSÃO

A plaquetopenia é considerada como a causa mais comum de sangramentos anormais. Embora seja definida como contagem de plaquetas abaixo de 150×10^3 plaquetas/mm³, a plaquetopenia da PTI quando não associada à comorbidade ou outras alterações, geralmente não cursa com manifestações clínicas em contagens acima de 50×10^3 plaquetas/mm³, havendo necessidade de intervenção terapêutica em contagens de plaquetas abaixo de 30×10^3 /mm³ (Stasi, 2012; Izak; Bussel, 2014).

Por outro lado, as plaquetopenias acima de 100×10^3 plaquetas/mm³ estabilizadas por mais de seis meses, na ausência de anemia ou leucopenia, podem não indicar um estado patológico (Stasi, 2012; Izak; Bussel, 2014).

Na PTI, as manifestações clínicas são mais frequentes nas plaquetopenias mais intensas (abaixo de 30×10^3 plaquetas/mm³), enquanto que nas moderadas ou mesmo nas plaquetopenias mais próximas ao limite inferior de normalidade, geralmente estas manifestações não são observadas (Abadi; Yarchovsky-Dolberg; Ellis, 2014).. Tem sido sugerido a existência de diferentes processos fisiopatológicos envolvendo as plaquetas de acordo com a intensidade da plaquetopenia. E junto a isso, são suscitados possíveis mecanismos de alterações na megacariocitopoiese e maior destruição plaquetária como determinantes na fisiopatologia da PTI (Koike *et al.*, 1998; Gernsheimer, 2009).

Desta forma, tentamos estabelecer uma relação entre o estado de produção plaquetária e a expressão de proteínas do sistema apoptótico nas plaquetas, e associar estes processos com a ativação plaquetária formação de micropartículas derivadas de plaquetas nos três diferentes graus de intensidade de plaquetopenia da PTI.

Abe e colaboradores, 2005, mostraram que na PTI a produção de plaquetas é aumentada, mas com maior sequestro de plaquetas no baço. Os pacientes geralmente têm um número aumentado de megacariócitos na medula óssea, liberando para a circulação um maior número de plaquetas reticuladas (Abe *et. al.*, 2005).

As plaquetas reticuladas ou imaturas podem ser quantificadas por testes não invasivos em pacientes com plaquetopenia de várias condições clínicas, por citometria de fluxo. Ao contrário dos testes clássicos de investigação de medula óssea com risco de sangramento (Hoffmann, 2014).

Antes de avaliarmos as plaquetas reticuladas nos diferentes grupos de PTI, realizamos a contagem de plaquetas reticuladas do grupo controle, composto por 10 indivíduos saudáveis e com contagem de plaquetas entre 150 e $450 \times 10^3/\text{mm}^3$, sendo encontradas 3,97% de plaquetas reticuladas, com intervalo de confiança de 95%, variando de 2,05% a 5,89%. Estes achados foram semelhantes aos encontrados por Hoffmann *et. al.*, 2013, que estabeleceram valores de referência para plaquetas reticuladas de 0,4% a 6,0%, em um estudo com 8089 indivíduos.

Kuwana *et. al.*, 2008, ressaltam a importância da quantificação das plaquetas reticuladas como um possível critério diagnóstico para a PTI, associando-a com outros critérios, pois além de mensurar a atividade megacariocitopoiética, pode avaliar indiretamente o grau de destruição plaquetária quando estabelecida a relação entre estes dois processos.

De acordo com os resultados obtidos no presente estudo foi detectada maior atividade megacariocitopoiética nos três grupos de pacientes com PTI, confirmando a maior porcentagem de plaquetas reticuladas como um dos critérios diagnósticos para PTI.

Um dado interessante observado foi que o grupo em que a contagem de plaquetas foi acima de $100 \times 10^3/\text{mm}^3$ apresentou um número aumentado ($44,83\% \pm 5,231$) de plaquetas reticuladas em relação aos dois outros grupos.

Segundo Hoffmann *et. al.*, 2013, o número de plaquetas reticuladas aumenta significativamente com a idade e está relacionado ao número de plaquetas do sangue periférico. Analisando os dados obtidos, o mesmo foi encontrado no grupo com plaquetas acima de $100 \times 10^3/\text{mm}^3$, sendo que a maioria dos pacientes apresentava mais idade que os nos demais grupos, assim como o número de plaquetas no sangue periférico (Tabela 2).

No grupo de pacientes estudados, os dados mostraram maior produção de plaquetas, mas com plaquetopenia persistente, sugere maior destruição

plaquetária. Assim sendo, a relação entre estes dois processos parece ser determinante na intensidade da plaquetopenia existente.

Analisando as proteínas relacionadas à apoptose plaquetária, os três grupos de PTI deste estudo apresentaram predomínio de Bax em relação à Bcl-x_L, caracterizando maior atividade apoptótica das plaquetas, confirmando o que antes foi sugerido de maior destruição plaquetária na PTI. Sendo que o grupo $>100 \times 10^3/\text{mm}^3$ apresentou um maior favorecimento pró-apoptótico, com diferença estatisticamente significativa em relação aos demais grupos de pacientes com PTI.

Ao associarmos estes achado com a maior contagem de plaquetas reticuladas no grupo $>100 \times 10^3/\text{mm}^3$, evidencia-se um predomínio da atividade megacariocitopoiética sobre o mecanismo pró-apoptótico. Contrariamente, no grupo $<50 \times 10^3/\text{mm}^3$ também se observou maior atividade do sistema pró apoptótico, porém com aumento menos intenso das plaquetas reticuladas. Frente a estes resultados, surge o questionamento sobre qual destes processos estabeleceria o grau de plaquetopenia.

Algumas evidências sugerem que o predomínio da proteína pró-apoptótica Bax sobre a proteína anti-apoptótica Bcl-x_L, promova produção plaquetária (Dale; Friese, 2006; Kile, 2009; Josefsson *et al.*, 2011; Lopez *et al.*, 2013), e a super-expressão de Bcl-x_L impede a fragmentação de pseudópodes de megacariócitos, inibindo a formação de plaquetas (Kaluzhny *et al.*, 2002; Kile, 2009; Josefsson *et al.*, 2011; Lopez *et al.*, 2013).

Os resultados do presente estudo mostraram o predomínio do sistema pró-apoptótico, principalmente no grupo plaquetopênico com maior contagem de plaquetas, onde observou-se maior predomínio de Bax em relação à Bcl-x_L e maior atividade megacariocitopoiética. Da mesma forma, nos grupos em que houve menor produção plaquetária, $<50 \times 10^3/\text{mm}^3$ e $50-100 \times 10^3/\text{mm}^3$, em relação ao grupo de pacientes com contagem de plaquetas acima de $100 \times 10^3/\text{mm}^3$, observou-se menor atividade pró-apoptótica e menor aumento da produção plaquetária, sugerindo que a intensidade da plaquetopenia seria dependente da taxa de produção medular.

Isso sugere que a regulação da plaquetogênese é dependente do balanço entre as proteínas Bcl-x_L e Bax, e que o grau de plaquetopenia se deve principalmente à atividade de Bax.

Em relação à ativação plaquetária, observamos nos três diferentes grupos de pacientes com PTI um número aumentado de plaquetas ativadas, sendo que nas plaquetopenias mais intensas, grupo $<50 \times 10^3/\text{mm}^3$, esse valor foi maior.

De acordo com alguns autores, a P-selectina exposta na membrana das plaquetas ativadas, funciona como um receptor para macrófagos, além de também interagir com a Glicoproteína Ligante-1 de P-selectina (*P-selectin glycoprotein ligand 1*, PSGL-1) dos monócitos, fazendo com que ambos eventos promovam maior retirada de plaquetas da circulação (Zapata; Cox; Salvato, 2014). Portanto, quanto maior a expressão de P-selectina, mais

intensa seria a plaquetopenia, devido à maior interação das plaquetas com macrófagos e monócitos mediada por esta glicoproteína.

Outro evento importante observado em plaquetas ativadas é a alta concentração de íons cálcio citoplasmático. A mobilização desses íons dos compartimentos internos, promovida pela ativação, desencadeia vários processos. Dentre eles pode-se salientar a perda da assimetria de membrana plasmática, com exposição de fosfolípides aniônicos, como a fosfatidilserina (PS) conferindo à plaqueta a função pró-coagulante. Esse processo é acompanhado pela formação de micropartículas que expressam os mesmos marcadores plaquetários. Entretanto, a formação de micropartículas e a expressão de fosfolípides aniônicos também podem ocorrer na fisiologia da apoptose plaquetária (Burnouf *et al.*, 2014), porém por mecanismos diferentes (Kile, 2009).

Nos pacientes com PTI do presente estudo foi observada, além da grande expressão de P-selectina plaquetária, grande quantidade de micropartículas derivadas de plaquetas no plasma.

Alguns autores mostraram (Ahn; Horstman, 2002; Gernsheimer, 2008; e Tantawy *et al.*, 2010), que plaquetas ativadas e MPP apresentam maior atividade pró coagulante, e que em diferentes pacientes com o mesmo nível de plaquetopenia, se observa menor grau de sangramento naqueles que apresentam maior ativação plaquetária e maior formação MPP.

De acordo com as observações acima e os resultados obtidos no presente trabalho, sugere-se que o aumento de plaquetas ativadas e de MPP promova um estado compensatório frente à intensa plaquetopenia na PTI, onde sangramentos são mais prováveis, em uma tentativa de suprir a acentuada redução de plaquetas, embora não tenha sido avaliada a função plaquetária por ferramentas específicas.

Ainda neste raciocínio, este estado compensatório de maior ativação plaquetária pode levar à uma maior retirada de plaquetas da circulação, o que manteria o grau da plaquetopenia instalada.

Por outro lado, a formação de MPP foi mais proeminente em contagens de plaquetas mais altas da PTI, grupo $>100 \times 10^3/\text{mm}^3$, provavelmente em virtude do maior predomínio de Bax ser observado neste grupo, uma vez que também há formação de MPP na apoptose plaquetária, mas por mecanismos diferentes dos evidenciados na ativação plaquetária como estabelecido por Burnouf *et. al.*, 2014.

Como já foi comentado, a exposição de fosfatidilserina na membrana e formação de MPP que ocorrem durante a ativação plaquetária são devido ao aumento da concentração de cálcio citoplasmático. Já na apoptose plaquetária estes dois processos também ocorrem, porém são dependentes da ativação de caspases (Kile, 2014).

Segundo Vogler *et. al.*, 2011, o predomínio de Bax em relação à Bcl-x_L promove redução da concentração citoplasmática de cálcio, levando à inibição da ativação plaquetária. Esta relação foi evidenciada nos três grupos estudados no presente trabalho. O grupo em que apresentou maior predomínio de Bax, foi detectada menor ativação plaquetária, indicando realmente haver uma participação inibitória de Bax na fisiologia da ativação plaquetária.

Além disso, sugere-se a associação entre estes dois processos ao grau de plaquetopenia instalada, ou seja, a participação de Bax na regulação da ativação plaquetária e no grau de plaquetopenia. Quanto menor o predomínio de Bax, maior a expressão de P-selectina e, possivelmente maior a interação com macrófagos e monócitos. A maior retirada de plaquetas da circulação, resultando em plaquetopenia mais intensa.

Diante dos resultados obtidos e das informações encontradas em diversos estudos relacionados ao tema, o que até então foi sugerido de relação direta entre contagem de plaquetas e atividade megacariocitopoética, nos parece haver, na verdade, uma regulação intrínseca destes processos, com envolvimento de ativação plaquetária e formação de micropartículas, por parte das proteínas da família Bcl2 do sistema apoptótico expressas nas plaquetas, especificamente Bcl-x_L e Bax.

Desta forma, mostrou-se que na PTI o grau de plaquetopenia com sua eventual possibilidade de sangramentos, pareceu ser dependente das respostas de megacariocitopoiese, de ativação plaquetária e de formação de

micropartículas derivadas de plaquetas. E que todos esses eventos sejam regulados por um balanço antagônico entre as proteínas Bcl-x_L e Bax, que compõem uma das vias do sistema apoptótico mitocôndria-dependente das plaquetas. Além disso, os resultados revelaram que o nível da plaquetopenia instalada na PTI mostrou ser dependente do predomínio de Bax.

9. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- A PTI apresenta maior atividade megacariocitopoiética;
- Pacientes de PTI com contagem plaquetária entre $100-150 \times 10^3/\text{mm}^3$ apresentam maior número de plaquetas reticuladas;
- Plaquetopenias da PTI acima de $50 \times 10^3/\text{mm}^3$ apresentam maior formação de micropartículas derivadas de plaquetas e de micropartículas derivadas de outras células;
- Na PTI há maior ativação plaquetária;
- Plaquetopenias da PTI abaixo de $50 \times 10^3/\text{mm}^3$ apresentam maior número de plaquetas ativadas;
- Há uma relação entre a ativação plaquetária e o grau de plaquetopenia instalada na PTI;
- Há um predomínio do sistema pró apoptótico plaquetário na PTI;
- Pacientes de PTI com contagem plaquetária entre $100-150 \times 10^3/\text{mm}^3$ apresentam maior predomínio pró apoptótico plaquetário;

- Sugere-se que o balanço antagônico entre Bcl-x_L e Bax tenha participação na regulação dos seguintes eventos na PTI:
 - grau de plaquetopenia;
 - atividade megacariocitopoiética;
 - ativação plaquetária;
 - formação de micropartículas derivadas de plaquetas e de micropartículas derivadas de outras células;

- Sugere-se que a intensidade do predomínio de Bax em relação à Bcl-x_L promova os seguintes eventos na PTI:
 - maior atividade megacariocitopoiética;
 - menor ativação plaquetária;
 - maior formação de micropartículas derivadas de plaquetas e de micropartículas derivadas de outras células;

10. ANEXO

ANEXO A

Solução de trabalho de <i>Tiazol Orange</i>	para 5mL	Concentração final
Tiazol <i>Orange</i> (SIGMA) em metanol (0,1mg/mL)	1µL	20ng/mL
solução salina (0,85% de NaCl) tamponada com fosfato 0,013M; 0,1% de Azida Sódica; 0,1% de soro fetal bovino; pH 7,2	4,999mL	–

Solução de RNase	volume para cada análise
RNase (SIGMA) em água destilada (20ng/mL; solução estoque 1mL)	2,5µL

Solução de OPTiPrep (SIGMA)	Concentração final	Densidade
Iodixamol	60% peso/volume (água destilada)	1,32g/mL

Solução B	Concentração	volume para solução final
HEPES (SIGMA)	100mM	20mL
NaCl (SIGMA)	0,85%	50mL
EGTA (SIGMA)	100mM	1mL

Solução de uso do OPTiPrep	Solução de uso do OPTiPrep final
Solução Iodixamol	5 volumes
Solução B	22 volumes

Tampão de lavagem de plaquetas pH 6,4	Concentração final
Citrato de Sódio (SIGMA)	10mM
NaCl (SIGMA)	150mM
EGTA (SIGMA)	1mM
Dextrose (SIGMA)	1%

Tampão de Amostra 25ml	2x	3X	4X	Concentração final
Tris – HCl pH 6.8	0,394 g	0,591 g	0,788 g	50mM
2-Mercaptoetanol	2,5 ml	5,0 ml	7,5 ml	5%
SDS	1,0g	1,5g	2g	2%
Bromofenol	0,025 g	0,030 g	0,040 g	0,05%
Glicerol	5,0 ml	7,5 ml	10,0 ml	10%

Tampão de Corrida 10X (1L)*	pH 8,3
Glicina	188 g
Tris-Base	30,2 g
SDS	10 g

* Aquecer

Tampão de Transferência*	IL	Concentração final
Tris-Base	5,81 g	48mM
Glicina	2,93 g	39mM
SDS	0,37 g	0,037%
Metanol	200 ml	20%

* Manter em geladeira

Ponceau S	Concentração
Ácido Acético	5%
Ponceau S	0,1%

TBS-T pH 7.6	IL	Concentração final
Tris-base	1,21 g	10mM
NaCl	8,76 g	150mM
Tween 20	1 ml	0,1%

Inibidores de Proteases*	Solução Estoque	10mL de tampão de lise	1mL de tampão de lise (volume solução estoque)
PMSF (<i>phenylmethanesulfonyl fluoride</i> , SIGMA)	100mM (0,174g/10 mL etanol)	1mM	100µL
NaPyr (Pirrolidinoditiocarbamato de sódio, SIGMA)	200mM (4,46g/50m L)	10mM	50µL
NaF (Fosfato de sódio, SIGMA)	500mM (1,05g/50m L)	50mM	10µL
NaV ₃ O ₄ (Ortovanadato de Sódio, SIGMA)	200mM	2mM	50µL
Clasto-lactacystin-β-lactone (Calbiochem)	4mM em DMSO	1µM	0,25µL
Coquetel de Inibidores de Protease (SIGMA)	Diluído 1/5 5mL/frasco		10µL

* Deve ser adicionado apenas na hora de uso

Acrilamida:Bis 30%	200ml
Acrilamida	58g
Bis	2g

Tris 1.5M pH8.8	200ml	Concentração final
Tris-base	36,33 g	1,5M

Tris 1.0M pH6.8	50ml	Concentração final
Tris-base	6,1 g	1,0M
Tris-ácido	7,9 g	1,0M

SDS	200ml	Concentração final
SDS	20 g	10%

Persulfato de amônio*	10ml	Concentração final
Persulfato de amônio	1 g	10%

*Fazer alíquotas de 500µl e conservar no freezer.

Solução <i>Stripping</i> pH 6,7*	100mL	250ml
Tris-HCl pH 6.7	0,986g	2,465g
2 Mercaptoetanol	780µl	1,950µl
SDS	2g	5g

*Agitar a membrana à 56°C por 30 min.

11. REFERÊNCIAS

- Abadi U, Yarchovsky-Dolberg O, Ellis MH. Immune thrombocytopenia: recent progress in pathophysiology and treatment. *Clin Appl Thromb Hemost*. 2014 Mar 12.
- Abe Y, Wada H, Sakakura M, Nishioka J, Tomatsu H, Hamaguchi Y, Oguni S, Shiku H, Nobori T. Usefulness of fully automated measurement of reticulated platelets using whole blood. *Clin Appl Thrombosis/Hemostasis*. 2005;11(3):263-270.
- Adibi P, Faghih Imani E, Talaei M, Ghanei M. Population-based platelet reference values for an Iranian population. *Int J Lab Hematol*. 2007;29: 195-199.
- Ahn YS, Horstman LL. Idiopathic thrombocytopenic purpura: pathophysiology and management. *Int J Hematol*. 2002 Aug;76Suppl 2:123-31.
- Anoop P. Immune Thrombocytopenic Purpura: Historical Perspective, Current Status, Recent Advances and Future Directions. *Indian Pediatr*. 2012 Oct;49(10):811-8.
- Avecilla ST, Hattori K, Heissig B, Tejada R, Liao F, Shido K, Jin DK, Dias S, Zhang F, Hartman TE, Hackett NR, Crystal RG, Witte L, Hicklind DJ, Bohlen P, Eaton D, Lyden D, de Savage F, Rafii S. Chemokine-mediated interaction of hematopoietic progenitors with the bone marrow vascular niche is required for thrombopoiesis. *Nat Med*. 2004 Jan;10(1), 64-71. Epub 2003 Dec 21.
- Baker DC, Brassard J. Review of continuing education course on hemostasis. *Toxicol Pathol*. 2011 Jan;39(1):281-8. Epub 2012 Dec 3.
- Bagamery K, Kvell K, Landau R, Graham J. Flow cytometric analysis of CD41-labeled platelets isolated by the rapid, one-step OptiPrep method from human blood. *Cytometry A*. 2005 May;65(1):84-7.
- Beardsley DS. ITP is the 21st century. *Hematology The american society of hematology education program*. 2006; 402-7. Review.
- Bertino AM, Qi XQ, Li J, Xia Y, Kuter DJ. Apoptotic markers are increased in platelets stored at 37 degrees C. *Transfusion* 2003; 43 (7): 857–866.
- Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 1976;72, 248-254.
- Brain BJ. Ethnic and sex differences in the total and differential white cell count and platelet count. *J Clin Pathol*. 1996;49:664-666.

Burnouf T, Goubran HA, Chou M, Devos D, Radosevic M. Platelet microparticles: Detection and assessment of their paradoxical functional roles in disease and regenerative medicine. *Blood Rev.* 2014 Jul;28(4):155-66.

Cimmino G, Golino P. Platelet biology and receptor pathways. *J Cardiovasc Transl Res.* 2013 Jun;6(3):299-309. doi: 10.1007/s12265-012-9445-9. Epub 2013 Jan 10. Review.

Cines DB, Bussel JB, Liebman HA, Luning Prak ET. The ITP syndrome: pathogenic and clinical diversity. *Blood.* 2009;113:6511–21.

Cines DB, Cuker A, Semple JW. Pathogenesis of immune thrombocytopenia. *Presse Med.* 2014 Apr;43(4 Pt 2):e49-59. doi: 10.1016/j.lpm.2014.01.010. Epub 2014 Mar 12. Review.

Chang D, Bluteau N, Debili N, Vainchenker W. From hematopoietic stem cells to platelets. *J Thromb Haemost* 2007 July;5 Suppl1:318-327.

Cookson P, Sutherland J, Turner C, Bashir S, Wiltshire M, Hancock V, Smith K, Cardigan R. Platelet apoptosis and activation in platelet concentrates stored for up to 12 days in plasma or additive solution. *Transfusion Medicine.* 2010;20, 392–402.

Dahlbäck B. Blood coagulation and its regulation by anticoagulant pathways: genetic pathogenesis of bleeding and thrombotic diseases *J Intern Med.* 2005 Mar;257(3):209-23. Review.

Dale GL, Friese P. Bax activators potentiate coated-platelet formation. *J Thromb Haemost.* 2006;4, 2664–2669.

de Graaf CA, Metcalf D. Thrombopoietin and hematopoietic stem cells. *Cell Cycle* 2011 May 15;10(10):1582-1589. Epub 2011 May 15.

Dejana E, Barbieri B, Cerletti C, Livio M, de Gaetano G. Impaired thromboxane production by newly formed platelets after aspirin administration to thrombocytopenic rats. *Br J Haematol.* 1980 Nov;46(3):465-9.

Deutsch VR, Tomer A. Megakaryocyte development and platelet production. *British Journal of Haematology.* 2006 Sep;Volume 134 Issue 5 Page 453-466.

Diamond SL, Purvis J, Chatterjee M, Flamm MH. Systems biology of platelet-vessel wall interactions. *Front Physiol.* 2013 Aug 26;4:229. doi: 10.3389/fphys.2013.00229. eCollection 2013.

Ellis EF, Wright KF, Jones PS, Richardson DW, Ellis CK. Effect of oral aspirin dose on platelet aggregation and vascular prostacyclin (PGI₂) synthesis in humans and rabbits. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1980 Jul-Aug;2(4):387-97.

Geddis, A. E. Megakaryopoiesis. *Semin Hematol.* 2010 jul;47(3): 212-9.

George JN, Arnold DM. Immune thrombocytopenia (ITP) in adults: Clinical manifestations and diagnosis. Disponível em: <http://www.uptodate.com/contents/immune-thrombocytopenia-its-in-adults-clinical-manifestations-and-diagnosis>. Acesso: 10 de Julho de 2014.

George JN, Rizvi MA. Thrombocytopenia. In: Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, Kipps TJ, Seligsohn U. USA, Mc Graw Hill; 2001, p.1495-1539.

Gernsheimer TB. The pathology of ITP revisited: ineffective thrombopoiesis and the emerging role of thrombopoietin receptor agonists in the management of chronic immune thrombocytopenic purpura. *Hematology Am Soc Hematol Educ Progrm*. 2008;219-26.

Gernsheimer T. Chronic idiopathic thrombocytopenic purpura: mechanisms of pathogenesis. *Oncologist*. 2009;14:12–21.

Ghigo D, Treves S, Bussolino F, Libero L, Orzan F, Bazzan M, Pannocchia A, Tamponi G, Bosia A. Platelet arachidonic acid metabolism in patients with cardiovascular disorders. *Biomed Biochim Acta*. 1988;47(10-11):S299-302.

Grozovsky R, Hoffmeister KM, Falet H. Novel clearance mechanisms of platelets. *Curr Opin Hematol*. 2010 Nov;17(6):585-9.

Gyulkhandanyan AV, Mutlu A, Freedman J, Leytin V. Markers of platelet apoptosis: methodology and applications. *J Thromb Thrombolysis* 2012, 33:397-411.

Hartiwig JH. The platelet: form and function. *Semin Hematol*. 2006 Jan;43(1 Suppl 1):S94-100.

Harrison P, Goodball AH. “Message in the platelet”—more than just vestigial mRNA! *Platelets*. 2008 Sep;19(6):395-404.

Heemskerk JW, Mattheij NJ, Cossemans JM. Platelet-based coagulation: different populations, different functions. *J Thromb Haemost*. 2012 Oct 26. Doi: 10.1111/jth. 12045.

Hoffmann JJ. Reticulated platelets: analytical aspects and clinical utility. *Clin Chem Lab Med*. 2014 Aug;52(8):1107-17. doi: 10.1515/cclm-2014-0165.

Hoffmann JJ, van den Broek NM, Curvers J. Reference intervals of reticulated platelets and other platelet parameters and their associations. *Arch Pathol Lab Med*. 2013 Nov;137(11):1635-40. doi: 10.5858/arpa.2012-0624-OA.

Houwerzijl EJ, Blom NR, van der Want JJL, Vellenga E, de Wolf JTM. Megakaryocytic dysfunction in myelodysplastic syndromes and idiopathic thrombocytopenic purpura is in part due to different forms of cell death. *Leukemia*. 2006;20:1937–42.

Izak M, Bussel JB. Management of thrombocytopenia. F1000Prime Rep. 2014 Jun 2;6:45. doi: 10.12703/P6-45. eCollection 2014. Review.

Josefsson EC, James C, Henley KJ, Debrincat MA, Rogers, KL, Dowling MR, White MJ, Kruse EA, Lane RM, Ellis S, Nurden P, Mason KD, O'Reilly LA, Roberts AW, Metcalf D, Huang DC, Kile BT. Megakaryocytes possess a functional intrinsic apoptosis pathway that must be restrained to survive and produce platelets. *Journal of Experimental Medicine*. 2011, 208, 2017–2031.

Josefsson EC, White MJ, Dowling MR, Kile BT. Platelet life span and apoptosis. *Methods Mol Biol* 2012;788:59-71.

Levine RL, Hursting MJ, Drexler A, Lewis BE, Francis JL. Heparin-induced thrombocytopenia in the emergency department. *Ann Emer Med*. 2004 Nov;44(5):511-5.

Leung, LLK. Overview of hemostasis. Disponível em: <http://www.uptodate.com/contents/overview-of-hemostasis>. Acesso: 05 de Julho de 2014.

Leytin V. Apoptosis in the anucleate platelet. *Blood Reviews*. 2012;26:51–63.

Lopez JJ, Palazzo A, Chaabane C, Albarran L, Polidano E, Lebozec K, Dally S, Nurden P, Enouf J, Debili N, Bohe R. Crucial role for endoplasmic reticulum stress during megakaryocyte maturation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2013;33:2750– 2758.

Kajihara M, Okazaki Y, Kato S, Ishii H, Kawakami Y, Ikeda Y, Kuwada M. Evaluation of platelets kinetics in patients with liver cirrhosis: Similarity to idiopathic thrombocytopenic purpura. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 22 (2007), 112-118.

Kamath S, Blann AD, Lip GYH. Platelets activation: assessment and quantification. *European Heart Journal*. 2001;22:1561-1571.

Kaushansky K. Thrombopoietin: from theory to reality. *Thrombs Haemost* 1999;82(2):312-317.

Kaushansky K. Thrombopoietin: a tool for understanding thrombopoiesis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2003;1:1587-1592.

Kaushansky K. The molecular mechanism that control thrombopoiesis. *Journal of Clinical Investigation*. 2005;115:3339-3347.

Koike Y, Yoneyama A, Shirai J, Ishida T, Shoda E, Miyazaki K, Sunaga S, Horie R, Aoki K, Koike K, Ogata I, Tahara T, Kato T, Nakahara K, Kariya T,

Higashihara M. Evaluation of thrombopoiesis in thrombocytopenic disorders by simultaneous measurement of reticulated platelets of whole blood and serum thrombopoietin concentrations. *Thromb Haemst*, 1998; 79: 1106-10.

Kile BT. The role of the intrinsic apoptosis pathway in platelet life and death. *J Thromb Haemost*. 2009 Jul;7 Suppl 1:214-7.

Kile BT. The role of apoptosis in megakaryocytes and platelets. *Br J Haematol*. 2014 Apr;165(2):217-26. doi: 10.1111/bjh.12757. Epub 2014 Jan 28. Review.

Kistanguri G; McCrae KR. Immune thrombocytopenia. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2013 June ; 27(3): 495–520. doi:10.1016/j.hoc.2013.03.001.

Kritz H, Schmid P, Karanikas G, Pirich C, Stamatopoulos Y, Peskar BA, Sinzinger H. Passive smoking increases platelet thromboxane. *Thromb Res* 1996 Feb 1451-60.

Kroll MH, Afshar-Kharghan V. Platelets in pulmonary vascular physiology and pathology. *Pulm Circ*. 2012 Jul-Sep; 2(3): 291-308.

Kuter DJ. Megakaryopoiesis and thrombopoiesis. In: Beutler E, Lichtman MA, Coller B.S, Kipps TJ, Seligsohn U. USA, Mc Graw Hill; 2001, p.9-16.

Kuter DJ. New thrombopoietic growth factors. *Blood*. 2007 June 1;109(11):4607-16.

Kuter DJ, Gernsheimer TB. Thrombopoietin and platelet production in chronic immune thrombocytopenia. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2009;23: 1193–1211.

Kuwana, M.; Kurata, Y.; Fujimura, K.; Fujisawa, K; Wada, H.; Nagasawa, T.; Nomura, S.; Kojima, T.; Yagi, H.; Ikeda, Y. Preliminary laboratory based diagnostic criteria for immune thrombocytopenic purpura: evaluation by multicenter prospective study. *J Thromb Haemost*. 2006 Sep;4(9):1936-43.

Jains S, Harris J, Ware J. Platelets: linking hemostasis and cancer. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010 Dec;30(12):2362-2367.

Jiménez MM, Guedán MJA, Martín LM, Campos JAS, Martínez IR, Vilella CT. Measurement of reticulated platelets by simple flow cytometry: An indirect thrombocytopenic marker. *European Journal of Internal Medicine*. 2006;17: 541-544.

Jurk K, Kehrel BE. Platelets: physiology and biochemistry. *Semin Thromb Hemost*. 2005;31(4):381-92. Review.

Jy, W; Horstman, LL; Arce, M; Ahn, YS. Clinical significance of platelet microparticles in autoimmune thrombocytopenias. *J Lab Clin Med* 1992;19:334–45.

Machlus KR, Thon JN, Italiano JE Jr. Interpreting the developmental dance of the megakaryocyte: a review of the cellular and molecular processes mediating platelet formation. *Br J Haematol*. 2014 Apr;165(2):227-36. doi: 10.1111/bjh.12758. Epub 2014 Feb 6. Review.

MacKenzie SH, Clark AC. Death by caspase dimerization. *Adv Exp Med Biol*. 2012;747:55-73. doi: 10.1007/978-1-4614-3229-6_4. Review.

Mason KD, Carpinelli MR, Fletcher JL, Collinge JE, Hilton AA, Ellis S, Kelly PN, Ekert PG, Metcalf D, Roberts AW, Huang DCS, Kile BT. Programmed anuclear cell death delimits platelets life span. *Cell*. 2007 March 23;128: 1173-1186.

Malara A, Balduini A. Blood platelet production and morphology. *Thromb Res*. 2012 Mar;129(3):241-4. Epub 2012 Jan 5.

McCrae KR. Immune thrombocytopenia: No longer 'idiopathic'. *Cleve Clin J Med*. 2011 Jun;78(6):358-73. doi: 10.3949/ccjm.78gr.10005. Review.

Monagle P, Massicotte P. Developmental haemostasis: secondary haemostasis. *Semin Fetal Neonatal Med*. 2011 Dec;16(6):294-300. Epub 2011 Aug 26.

Nagamatsu Y, Tsujioka Y, Hashimoto M, Giddings JC, Yamamoto Y. The differential effects of aspirin on platelets, leucocytes and vascular endothelium in an *in vivo* model of thrombus formation. *Clinical and Laboratory Haematology*. 1999 February;21(1):33-40.

Nutt SL, Metcalf D, D'Amico D, Polli M, Wu L. Dynamic regulation of PU.1 expression in multipotent hematopoietic progenitors. *Journal of Experimental Medicine*. 2005;201:221-231.

Parco S, Vascotto F. Application of reticulated platelets to transfusion management during autologous stem cells transplantation. *Onco Targets Ther*. 2012;5:1-5. Epub 2012 Jan 26.

Patel SR, Hartwig JH, Italiano Jr JE. The biogenesis of platelets from megakaryocyte proplatelets. *J Clin Invest*. 2005;115(12): 3348–3354.

Pereira J, Palomo I, Ocqueteau M, Soto M, Aranda E, Mezzano D. Platelet aging *in vivo* is associated with loss of membrane phospholipid asymmetry. *Thromb Haemost*. 1999; 82 (4): 1318–1321.

Pereira J, Soto M, Palomo I, Ocqueteau M, Coetzee LM, Astudillo S. Platelet aging *in vivo* is associated with activation of apoptotic pathways: studies in a model of suppressed thrombopoiesis in dogs. *Thromb Haemost*. 2002; 87 (5): 905–909.

Perkins SL. Examination of the blood and bone marrow. In: Greer J, Foerster J, Lukens JN, Rodgers GM, Paraskevas F, Glader B. USA, Lippincott Williams & Wilkins. 2004:3-25.

Provan D, Stasi R, Newland AC, Blanchette VS, Bolton-Maggs P, Bussel JB, Chong BH, Cines DB, Gernsheimer TB, Godeau B, Grainger J, Greer I, Hunt BJ, Imbach PA, Lyons G, McMillan R, Rodeghiero F, Sanz MA, Tarantino M, Watson S, Young J, Kuter DJ. International consensus report on the investigation and management of primary immune thrombocytopenia. *Blood*. 2010 Jan 14;115(2):168-86. doi: 10.1182/blood-2009-06-225565. Epub 2009 Oct 21.

Qi B, Hardwick JM. A Bcl-X_L timer sets platelets life span. *Cell*. 2007 March 23;128:1035-1036.

Reilly M, Fitzgerald GA. Cellular activation by thromboxane A₂ and other eicosanoids. *Eur Heart J*. 1993 Dec;14 Suppl K:88-93.

Richardson JL, Shivdasani RA, Boers C, Hartwig S, Stopka T, Skoultchi AI. Mechanism of oranelle trnasport and capture along proplatelet production. *Blood*. 2003 106, 4066-4075.

Rodeghiero F, Stasi R, Gernsheimer T, Michel M, Provan D, Arnold DM, Bussel JB, Cines DB, Chong BH, Cooper N, Godeau B, Lechner K, Mazzucconi MG, McMillan R, Sanz MA, Imbach P, Blanchette V, K'hne T, Ruggeri M, George JN. Stardardization of terminology, definitions and outcome criteria in immune thrombocytopenic purpura of adults and childrens: report from an international working group. *Blood*. 2009 Mar 12;113(11):2386-93. Epub 2008 Mov 12.

Ryan DH. Examination of the blood. In: Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, Kipps TJ, Selisdohn U. USA, Mc Graw Hill; 2001, p.9-16.

Semple JW, Provan D, Garvey MB. Freedman. Recent progress in understanding the pathogenesis of immune thrombocytopenia. *Curr Opin Hematol*. 2010;17:590–5.

Shapiro AD. Platelets function disorders. *Haemophilia*. 2000;6(Suppl. 1): 120-127.

Silva LF, Golim MA, Takahira RK. Measurement of thrombopoietic activity through the quantification of megakaryocytes in bone marrow cytology and reticulated platelets. *Res Vet Sci*. 2012. Aug;93(1):313-7. Epub 2011 Aug 5.

Smyth SS, McEver RP, Werrich AS, Morrel CN, Hoffman MR, Arepally GM, French PA, Dauerman HL, Becker RC. Platelet Colloquium Participants. Platelet functions beyond hemostasis. *J Thromb Haemost*. 2009 Nov;7(11):1759-66. Epub 2009 Aug 19.

Stasi R. How to approach thrombocytopenia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2012;2012:191-7. doi: 10.1182/asheducation-2012.1.191. Review.

Stasi R, Evangelista ML, Stipa E, Buccisano F, Venditti A, Amadori S. Idiopathic thrombocytopenic purpura: current concepts in pathophysiology and management. *Thromb Haemost*. 2008 Jan;99(1):4-13. doi: 10.1160/TH07-08-0513.

Stasi R, Amadori S, Osborn J, Newland AC, Provan D. Long-term outcome of otherwise healthy individuals with incidentally discovered borderline thrombocytopenia. *PLoS Med*. 2006;3: e24.

Stuart MJ, Murphy S, OSKI FA. A simple nonradioisotope technic for the determination of platelet life-span. *N Engl J Med* 1975; 292 (25): 1310–1313.

Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW. WHO classification of tumors of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon: IARC, 2008.

Tantawy AA, Matter RM, Hamed AA, Shams El Din El Telbany MA. Platelet microparticles in immune thrombocytopenic purpura in pediatrics. *Pediatr Hematol Oncol*. 2012 May; 27(4):283-96.

Thota S, Kistangari G, Daw H, Spiro T. Immune thrombocytopenia in adults: An update. *Cleve Clin J Med*. 2012 Sep;79(9):641-50. doi: 10.3949/ccjm.79a.11027.

Versteeg HH, Heemskerk JWM, Levi M, Reitsma PH. New fundamentals in hemostasis. *Physiol Rev*. 2013 Jan;93(1):327-58.

Vinholt PJ, Hvas AM, Nybo M. An overview of platelet indices and methods for evaluating platelet function in thrombocytopenic patients. *Eur J Haematol*. 2014 May;92(5):367-76. doi: 10.1111/ejh.12262. Epub 2014 Mar 12.

Vogler M, Hamali HA, Sun X, Bampton ETW, Dinsdale D, Snowden RT, Dyer MJS, Gooddall AH, Cohen GM. BCL2/BCL_{xL} inhibition induces apoptosis, disrupts cellular calcium homeostasis, and prevents platelet activation. *Blood*. 2011;117:7145-7154.

von Gunten S, Wehrli M, Simon HU. Cell Death in Immune Thrombocytopenia: Novel Insights and Perspectives. *Semin Hematol*. 2013 50:S109–S115.

Wen Q, Goldenson B, Crispino JD. Normal and malignant megakaryopoiesis. *Expert Rev Mol med*. 2011 Oct 21;13:e32.

White MJ, Kile BT. Apoptotic Processes in Megakaryocytes and Platelets. *Semin Hematol* 2010 47:227–234.

Winkler J, Kroiss S, Rand ML, Azzouzi I, Annie Bang KW, Speer O, Schmugge M. Platelet apoptosis in paediatric immune thrombocytopenia is ameliorated by intravenous immunoglobulin. *Br J Haematol*. 2012 Feb;156(4):508-15. doi: 10.1111/j.1365-2141.2011.08973.x. Epub 2011 Dec 15.

Yu M, Cantor AB. Megakaryopoiesis and thrombopoiesis: an update on cytokines and lineage surface markers. *Methods Mol Biol*. 2012;788:291-303.

Zapata JC, Cox D, Salvato MS. The Role of Platelets in the Pathogenesis of Viral Hemorrhagic Fevers. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014 Jun 12;8(6):e2858. doi: 10.1371/journal.pntd.0002858. eCollection 2014 Jun.

Zhang H, Nimmer PM, Tahir SK, Chen J, Fryer RM, Hahn KR, Iciek LA, Morgan SJ, Nasarre MC, Nelson R. Bcl-2 family proteins are essential for platelet survival. *Cell death differ*. Published online January 5, 2007. 10.1038/sj.cdd.4402081.