

**BIBLIOTECA DIGITAL DE TESES E DISSERTAÇÕES
UNESP**

RESSALVA

Alertamos para ausência de algumas figuras, não
incluídas pelo autor no arquivo original.

Elisabete Maria Garcia Franco

**ULTRA-ESTRUTURA E FUNÇÃO
PLAQUETÁRIA EM INDIVÍDUOS NORMAIS E
PACIENTES COM ATEROSCLEROSE
OBLITERANTE PERIFÉRICA**

*Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Patologia, Área de
Concentração: Patologia, para obtenção
de título de Mestre.*

Orientadora: Prof^a Dr^a ELISA APARECIDA GREGÓRIO

**Faculdade de Medicina de Botucatu
UNESP**

2001

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: SULAMITA SELMA CLEMENTE COLNAGO

Franco, Elisabete Maria Garcia

Ultra-estrutura e função plaquetária em indivíduos normais e pacientes com aterosclerose obliterante periférica / Elisabete Maria Garcia Franco – 2001.

Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2001.

Orientador: Elisa Aparecida Gregório

1.Plaquetas (sangue)

CDD 611.0185

Palavras-chave: Plaquetas; Ativação plaquetária; Aterosclerose obliterante periférica; Claudicação intermitente; Ultra-estrutura; Fator idade; Morfometria plaquetária

AGRADECIMENTOS

Dedico este trabalho...

Aos meus pais: Pedro e Helena, exemplos de dedicação e respeito, responsáveis por minha formação.

Ao meu marido José Raphael, pelo carinho e apoio, em todos os momentos.

Aos meus filhos: Andréa e Henrique, especiais e imprescindíveis na minha vida.

À toda a minha família, pelo incentivo constante.

À Profª Drª Elisa A. Gregório

Pela competência e profissionalismo na orientação deste trabalho, sempre de forma confiante e segura.

Pelo incentivo e exigência inerentes à figura do orientador, e que contribuem para o nosso crescimento.

Pela paciência e carinho com que sempre me recebeu.

Ao Prof. Dr. Francisco H. A. Maffei

Pela valiosa colaboração com seu conhecimento relativo à doença estudada.

Pelos conselhos oportunos sempre transmitindo sabedoria e tranquilidade.

Pelo incentivo e otimismo na co-orientação desta dissertação.

Aos voluntários e pacientes, cuja valiosa colaboração foi imprescindível para a realização deste trabalho.

À todos, que direta ou indiretamente, colaboraram para a realização deste trabalho:

À Profª Drª Luci Mattar, bióloga do Departamento de Cirurgia e Ortopedia da Faculdade de Medicina de Botucatu-Unesp, pela colaboração na correção desta dissertação e na análise das fotografias à MEV. Pelo apoio e amizade.

Ao Prof. Dr. Eder Trezza, médico responsável pela Unidade de Registros Gráficos do Departamento de Cardiologia da Faculdade de Medicina de Botucatu- Unesp, pela realização dos eletrocardiogramas e consultas cardiológicas dos voluntários sadios e pacientes .

À Profª Drª Mariângela Gianini, médica do Ambulatório de Claudicação do Departamento de Cirurgia e Ortopedia da Faculdade de Medicina de Botucatu- Unesp, responsável pela realização das medidas de pressões e pulsos periféricos dos voluntários sadios e pacientes.

À Profª Drª Lídia M. de Carvalho, do Departamento de Bioestatística do Instituto de Biociências de Botucatu- Unesp, pela realização da análise estatística desta pesquisa.

Ao Prof. Dr. Paulo E. A Machado, diretor da Faculdade de Medicina de Botucatu- Unesp, por aceitar minha transferência para esta Instituição e, com isto, possibilitar meu ingresso neste Curso de Pós-graduação.

À Profª Drª Elenice Defunne, diretora da Divisão Hemocentro da Faculdade de Medicina de Botucatu- Unesp, pelo incentivo e apoio na realização desta dissertação.

Aos funcionários do Centro de Microscopia Eletrônica, do Instituto de Biociências de Botucatu-Unesp, pelo processamento do material para análise à microscopia eletrônica de transmissão e de varredura. Pela amizade e cordialidade.

Aos funcionários da Biblioteca do Campus de Botucatu- UNESP, pelo auxílio na revisão, referências bibliográficas e confecção da ficha catalográfica.

À todos os funcionários da Divisão Hemocentro da Faculdade de Medicina de Botucatu- Unesp, pelo apoio e amizade no relacionamento.

Aos funcionários do Laboratório de Hematologia, pela realização das contagens das plaquetas deste estudo.

Aos funcionários do Laboratório de Hemostasia, pela colaboração na dosagem de fibrinogênio, e pela agradável convivência.

À Ângela A. Dorini, técnica do Laboratório de Sorologia, pelo auxílio na confecção dos gráficos utilizados nesta pesquisa.

Ao Prof. Dr. João Lauro V. de Camargo, responsável pelo Laboratório Toxican do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu- Unesp, pela gentileza na utilização do analisador de imagens, e ao Marco Aurélio da Silva, funcionário deste laboratório, pelo auxílio na realização da morfometria plaquetária.

À Maria Salete Sartori, bióloga do Setor de Bioquímica do Laboratório de Patologia Clínica, do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu- Unesp, responsável pelas dosagens bioquímicas séricas realizadas nesta pesquisa.

À Maria de Lourdes R. Pereira, professora responsável pela correção do Português, e à **Heloiza Toledo**, professora responsável pela correção do resumo em Inglês deste trabalho.

Ao Eduardo Borgatto, funcionário do Departamento de Cirurgia e Ortopedia da Faculdade de Medicina de Botucatu- UNESP, pelo auxílio no processamento da imagem da plaqueta no scanner.

Aos funcionários da seção de Pós-graduação, da Faculdade de Medicina de Botucatu- UNESP, pelo trabalho competente desempenhado.

Ao Curso de Pós-graduação em Patologia, da Faculdade de Medicina de Botucatu- UNESP, pela confiança depositada.

SUMÁRIO

	Pág.
INTRODUÇÃO.....	12
OBJETIVOS.....	28
MATERIAL E MÉTODO.....	30
1. Casuística.....	31
1.1. Critérios de Exclusão de Voluntários.....	31
1.2. Critérios de Exclusão de Voluntários Pacientes.....	31
2. Método.....	32
2.1. Controle Clínico dos Voluntários.....	32
2.2. Coleta e Processamento do Material.....	33
2.2.1. Agregação Plaquetária Espontânea.....	33
2.2.2. Dosagem de Fibrinogênio Plasmático.....	34
2.2.3. Análise Morfológica Ultra-estrutural.....	35
2.2.3.1. Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	35
2.2.3.2. Microscopia Eletrônica de Varredura	36
2.3. Análise Morfométrica Ultra-estrutural.....	37
2.4. Análises Bioquímicas Séricas.....	39
2.5. Análise Estatística.....	39
RESULTADOS.....	40
1 Avaliação Clínica.....	41
1.1. Tabagismo.....	41
1.2. Pressões nas Artérias Periféricas.....	41
1.3. Intensidade de Pulsos Periféricos.....	42
2. Avaliação Laboratorial.....	43
2.1. Dosagens Bioquímicas Séricas.....	43
2.2. Dosagem de Fibrinogênio Plasmático.....	44

2.3. Avaliação da Função Plaquetária.....	45
3. Avaliação Ultra-estrutural Morfológica e Morfométrica das Plaquetas.....	45
3.1. `A Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	45
3.1.1. Análise Morfológica.....	45
3.1.2. Análise Morfométrica.....	47
3.2. `A Microscopia Eletrônica de Varredura.....	47
3.2.1. Análise Morfológica.....	47
3.2.2. Análise Quantitativa.....	48
DOCUMENTAÇÃO FOTOGRÁFICA.....	50
DISCUSSÃO.....	65
CONCLUSÕES.....	73
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75
RESUMO.....	85
ABSTRACT.....	87
APÊNDICE.....	89

Abreviaturas do texto

mg: micrograma
bTG: tromboglobulina beta
AA: ácido araquidônico
ABP: proteína ligada à actina
ADP: difosfato de adenosina
AMPc: monofosfato cíclico de adenosina
AOP: aterosclerose obliterante periférica
APE: agregação plaquetária espontânea
ATP: trifosfato de adenosina
cm: centímetro
DG: diacilglicerol
FP3: fator plaquetário 3
FP4: fator plaquetário 4
FvW: fator de Von Willebrand
g: grama
GAOP: grupo de pacientes com AOP
GC1: grupo controle 1 (idade abaixo de 50 anos)
GC2: grupo controle 2 (idade acima de 50 anos)
GMP: proteína de membrana de grânulo
GP: glicoproteína
h: hora
HDL: lipoproteína de alta densidade
IP3: trifosfato de inositol
kd: quilodalton
LDL: lipoproteína de baixa densidade
MET: microscopia eletrônica de transmissão
MEV: microscopia eletrônica de varredura
mg: miligrama
mid: membro inferior direito
mie: membro inferior esquerdo
min: minuto
ml: mililitro
mm³: milímetro cúbico
ng: nanograma
nm: nanômetro
NO: óxido nítrico
PAF: fator ativador de plaqueta
PDGF: fator de crescimento derivado de plaqueta
PIP₂: difosfato de fosfatidilinositol
PKC: proteinoquinase C
PPP: plasma pobre em plaquetas
PRP: plasma rico em plaquetas
rpm: rotação por minuto
SCA: sistema canalicular aberto
seg: segundo
STD: sistema tubular denso
ta: tibial anterior
TGFb: fator transformador de crescimento beta
tp: tibial posterior
TSP: trombospondina
TXA₂: tromboxane A₂

INTRODUÇÃO

As plaquetas circulantes são fragmentos citoplasmáticos derivados de megacariócitos da medula óssea. Sob condições fisiológicas, as plaquetas participam na hemostasia primária, através da formação do tampão hemostático na parede do vaso lesado (Weiss 1980).

A ativação plaquetária é considerada de suma importância na patogênese da doença trombótica e também no início das lesões ateroscleróticas (Weiss 1980, Fitzgerald *et al* 1986, Trip *et al* 1990, Kristensen 1992, Reverter *et al* 1994). Acredita-se que o início da formação do trombo arterial seja a ruptura ou a ulceração do endotélio ou de uma placa aterosclerótica, seguida de adesão e agregação plaquetária no sítio da lesão, levando à formação do trombo plaquetário, com conseqüente ativação do sistema de coagulação (Davies & Thomas 1984, Davies *et al* 1986, Ouriel *et al* 1991).

O início do processo trombótico está relacionado à interação plaqueta-parede arterial, onde a adesão e o espraçamento plaquetários desencadeiam uma série de reações bioquímicas e alterações ultra-estruturais, mecanismos estes ainda não totalmente esclarecidos (Ouriel *et al* 1991). Alguns autores (Ouriel *et al* 1991, Wu 1996) atribuem ao fluxo transmembrânico de cálcio para o citoplasma plaquetário, ocasionando a liberação de várias substâncias entre as quais difosfato de adenosina (ADP) e produtos instáveis formados a partir do ácido araquidônico (AA), como tromboxane A_2 (TXA₂), que levam à agregação de mais plaquetas sobre as já aderidas para amplificar a formação do trombo. A adesão e a agregação das plaquetas dependem das condições de fluxo sanguíneo no local (Ouriel *et al* 1991, Ruggeri 1993, Wu 1996).

Na aterogênese, o endotélio arterial é cronicamente danificado por acúmulo de lípides séricos, alterações do fluxo sanguíneo, adesão de monócitos e plaquetas ao local da lesão. A liberação de fatores de crescimento e citocinas leva à migração e proliferação de células musculares lisas. Com o tempo, este processo resulta na

formação da placa ateromatosa (Lastória & Maffei 1995).

As substâncias liberadas pelas plaquetas também induzem vaso constrição e são importantes na angiogênese e no reparo vascular (Lastória & Maffei 1995, Wu 1996).

Embora dados experimentais proporcionem evidências convincentes de que as plaquetas desempenham importante papel na aterosclerose, a associação da hiper-reatividade plaquetária com aterosclerose subclínica permanece incerta (Wu 1996).

Vários estudos reportaram a hiper-reatividade plaquetária em doenças isquêmicas cardíacas (Wu & Hoak 1976, Falk 1983, Davies & Thomas 1984, Davies *et al* 1986), cerebrovasculares (Hoogendijk *et al* 1979, Falk 1985) e vasculares periféricas (Wreeken & Aken 1971). A agregação espontânea das plaquetas mostrou ser marcador biológico de mortalidade e eventos coronarianos em pacientes sobreviventes de infarto do miocárdio recente (Trip *et al* 1990).

A hiper-reatividade plaquetária foi estudada pela agregação plaquetária estimulada por ADP, epinefrina, colágeno e AA (Johnson *et al* 1975, Chao *et al* 1982, Vericel *et al* 1988); através da dosagem de produtos plasmáticos plaquetários como o fator plaquetário 3 (FP3) (Chao *et al* 1982), β tromboglobulina (β TG) e fator plaquetário 4 (FP4) (Zahavi *et al* 1980, Zahavi & Zahavi 1985); e através de determinação da eliminação urinária de um metabólito do TXA_2 , o tromboxane B_2 (TXB_2) (Reilly & Fitzgerald 1986).

A agregação espontânea das plaquetas ganhou atenção nos últimos anos, quando alguns autores observaram que esta acontecia mais freqüentemente em indivíduos com risco de eventos isquêmicos do que em sadios. Os portadores destas doenças são na grande maioria indivíduos de idade mais avançada, sendo demonstrada uma correlação entre a idade e ativação plaquetária (Noris *et al* 1993).

Na literatura, entretanto, não existem estudos comparativos entre agregação espontânea e alterações ultra-estruturais das plaquetas, quer em indivíduos de diferentes grupos etários, quer em pacientes com manifestações ateroscleróticas, que são as maiores causas de morbidade e mortalidade no mundo ocidental (Kristensen

1992, Lastória & Maffei 1995).

Para a compreensão da complexidade da fisiologia do mecanismo da ativação plaquetária, torna-se importante salientar aspectos morfológicos e estruturais das plaquetas.

ESTRUTURA DA PLAQUETA EM REPOUSO

Plaquetas humanas, em repouso, circulam como discos anucleados, heterogêneos em tamanho, com dimensões que variam de 2,9 a 4,2 μ m de diâmetro maior e 0,6 a 1,2 μ m de diâmetro menor (Frojmovic & Panjuwani 1976), por um período de 6-10 dias (Steen & Holmsen 1987). Embora desprovidas de núcleo, possuem compartimentos subcelulares bastante complexos e arranjados de maneira ordenada no citoplasma (Verstraete & Vermeylen 1989).

A plaqueta pode ser dividida em 4 regiões distintas: zona periférica, zona sol-gel, zona das organelas e de sistemas de membranas.

1- Zona periférica: é constituída pela membrana plasmática, pelo citoplasma cortical e estruturas associadas.

A *membrana plasmática* das plaquetas é vista, à microscopia eletrônica de transmissão (MET), como uma unidade de membrana típica. Ela proporciona barreira química e física, separando os constituintes intra e extracelulares, além de fornecer superfície para interação com proteínas circulantes, inclusive as coagulantes. Os lipídeos são principalmente fosfolipídeos e colesterol, que estão distribuídos assimetricamente na bicamada (Pujol-Moix 1995). A membrana plaquetária, à microscopia eletrônica de varredura (MEV), tem aspecto liso e uniforme; minúsculas aberturas podem ser detectadas, referentes às saídas de canais intraplaquetários para o exterior. Como estes canais exibem interligações, a superfície da plaqueta pode ser comparada a uma esponja (White 1987). Estes canais são invaginações da membrana plaquetária, formando o sistema canalicular aberto, que descreveremos posteriormente.

Revestida externamente pelo glicocálice, que é uma camada de 15-20nm de espessura, a superfície celular contém uma infinidade de receptores, sendo os mais abundantes as proteínas glicosiladas, ou glicoproteínas (GP) (Pujol-Moix 1995).

As GP são classificadas em: *integrinas*, *ricas em leucinas*, e *selectinas*. Como exemplos de *integrinas* temos o complexo GPIIb-IIIa, que é ligante para fibrinogênio, fibronectina, fator de Von Willebrand (fvW), vitronectina, trombospondina (TSP) e colágeno e o complexo GPIa-IIa, que é receptor para colágeno. As *ricas em leucina* são: GPIb-IX, que é ligante do fvW e GPIV, ligante de TSP; entre as *selectinas* temos, como exemplo, a proteína de membrana externa de grânulo (PADGEM), ou GMP-140, também chamada de P-selectina (Philips & Agin 1977).

Receptores não glicoprotéicos da membrana plaquetária são ligantes para várias substâncias tais como ADP, epinefrina, serotonina e trombina. O ADP, por exemplo, quando se liga ao seu receptor específico altamente proteico (43kd), induz exposição de GPIIb-IIIa e agregação plaquetária (Bennet & Vilaire 1979). Por outro lado, o ADP atua como inibidor da adenilciclase, enzima que intervém nos processos de inibição plaquetária por incrementar os níveis de AMPc (Colman 1984). Uma plaqueta pode conter vários sítios ligantes para ADP na mesma ou em diferentes proteínas, capaz de se ligar a ele com diferentes afinidades (Cristalli & Mills 1993).

Através de receptores adrenérgicos, a epinefrina induz agregação, sem ocorrer mudança de forma da plaqueta. Quando a epinefrina se liga ao seu receptor, a adenilciclase é inibida e abrem-se canais de cálcio para o citoplasma plaquetário; no entanto parece que este agonista não causa mobilização de cálcio plaquetário como o ADP (Shattil 1987).

A ativação pela serotonina ocorre via receptores do subtipo S₂ (De Chaffoy *et al* 1985, Scrutton & Thompson 1986). Quando os receptores são ocupados, ocorre agregação e secreção plaquetária, via mecanismos acoplados à proteína G (Peroutka 1992).

O receptor para a trombina é uma proteína de 425 aminoácidos, com domínio

transmembrânico, e três sítios ligantes. Ativa plaquetas por múltiplas vias, dependendo da sua concentração (Brass *et al* 1991).

Metabólitos do AA incluindo TXA_2 e seus precursores PGG_2 e PGH_2 estimulam mudança de forma, agregação e secreção plaquetária (Hamberg *et al* 1975). O TXA_2 , quando se liga em seu receptor específico, induz a mobilização de cálcio intraplaquetário, potencializando a ação agregante (Pujol-Moix 1995). Por outro lado a prostaciclina (PGI_2), induz a ativação da adenilciclase, com aumento de AMPC , que tem efeito inibidor da agregação plaquetária (Moncada & Vane 1979). A plaqueta também é capaz de responder a diversas drogas, provavelmente através de receptores inespecíficos (Pujol-Moix 1995).

Um outro tipo de receptor que vale mencionar é o receptor para o fator de ativação plaquetária (PAF), complexo lipídico derivado de várias células inflamatórias e plaquetas, que induz mudança de forma, agregação e secreção plaquetária (Zucker & Nachmias 1985). As plaquetas possuem cerca de 300 receptores PAF (0,2 kd), que têm sido clonados e são membros da família das proteínas constituídas de uma cadeia simples de polipeptídeo expressando sete domínios transmembrânicos (Honda *et al* 1991).

O *citoplasma cortical* é representado pelo esqueleto associado à membrana plaquetária. Este é constituído de: espectrina, actina e proteínas associadas. Dímeros de espectrina, cada um com um sítio de ligação para um filamento de actina, encontram-se associados em tetrâmeros, sob condições fisiológicas. Os tetrâmeros são bipolares e contêm um sítio de ligação para actina em cada extremidade final da molécula. O citoesqueleto associado à membrana interconecta proteínas da membrana plasmática e actina citoplasmática; a *actin binding-protein*, ABP-280, por exemplo, liga os lados dos filamentos de actina com GP de membrana $\text{GPIb}_{\alpha\beta}\text{IX-V}$, receptor para o fvW (Rosemberg *et al* 1981, Rosemberg & Stracher 1982). Esse complexo é importante para a resistência mecânica da plaqueta em repouso (Hartwig 1998), estabilização da bicamada lipídica, manutenção da forma da plaqueta, regulação da distribuição e

manutenção das GPs em conformação favorável para unir-se a seus ligantes específicos (Pujol-Moix 1995).

Os filamentos de actina submembranosos desempenham, juntamente com a actina citoplasmática, papel importante na extrusão e estabilização dos pseudópodes (Shollmeyer *et al* 1978).

Assim, na zona periférica acontece a transformação de sinais recebidos pela superfície externa, em mensagens químicas citoplasmáticas, responsáveis pela ativação plaquetária (Pujol-Moix 1995).

2-Zona sol-gel: É constituída pela matriz do citoplasma plaquetário, incluindo o seu citoesqueleto. São sistemas de filamentos protéicos em vários estágios de polimerização que mantêm a forma discóide das plaquetas inalteradas, além de proporcionar sistema contrátil, envolvido na eventual mudança de sua forma, emissão de pseudópodes, contração interna e secreção (White 1987).

Os elementos estruturais que mantêm a forma discóide da plaqueta são: o anel de microtúbulos marginais, o esqueleto de membrana e a rede rígida de filamentos de actina citoplasmática, interligados. Pelo menos três sistemas de filamentos protéicos constituem a matriz das plaquetas: filamentos submembranosos, microtúbulos e microfilamentos, sendo os microtúbulos circunferenciais os elementos mais proeminentes (White 1994).

Plaquetas em repouso têm um proeminente anel de microtúbulo periférico, enrolado sobre si mesmo (White & Krivit 1967, White 1968). Os microtúbulos são recobertos por muitas proteínas associadas, na sua maioria, da família das dineínas e quinesinas (Sheetz 1996), proteínas motoras, que além de proporcionarem estabilidade ao polímero, promovem a movimentação de partículas associadas aos microtúbulos. Do total de tubulina presente no citoplasma, 60% encontram-se polimerizadas, e a ativação plaquetária leva à fragmentação deste polímero (Kenney & Linck 1985). Os microtúbulos mantêm a forma discóide e favorecem a organização e direcionamento dos movimentos gerados na interação actina-miosina (Pujol-Moix 1995).

Cortes longitudinais de plaquetas fixadas mostram feixes circulares de microtúbulos, em número de 8 a 24, cada um medindo aproximadamente 25nm, localizados nos polos finais das células discóides. Em cortes transversais, as bandas de microtúbulos estão localizadas sob a membrana celular, mas nunca em contato com ela, sugerindo sua participação no suporte do citoesqueleto e na manutenção da forma discóide (White 1994). Estudos recentes revelam que a remoção dos microtúbulos, com a utilização de drogas desestabilizadoras como a colchicina, afeta a movimentação central de organelas nas plaquetas expostas à agentes agregantes, evidenciando assim a participação destes elementos na contração, vista em plaquetas ativadas (White 1994).

O espaço entre os microtúbulos e a superfície celular é ocupado, freqüentemente, por filamentos submembranosos, muitas vezes identificados como filamentos intermediários (Tablin & Taube 1987).

Microfilamentos de actina e miosina dispõem-se em redes irregulares por toda a célula, sendo considerados os principais elementos contráteis da plaqueta (Pujol-Moix 1995). Do total de actina, 40% estão polimerizadas em aproximadamente 2000 filamentos no citoplasma (Pollard & Mooseker 1981). As extremidades finais destes filamentos de actina, nas plaquetas em repouso, são protegidos pela proteína chamada cap Z, que se liga constitutivamente ao filamento, com grande afinidade. O restante dos filamentos encontra-se no citosol, distribuído radialmente, a partir do centro da célula (Hartwig 1998).

No citoplasma também existem proteínas como ABP-280, que assim como a proteína cap Z, também aderem constitutivamente a actina à membrana plasmática, através de ligação ao receptor do fvW, proporcionando suporte à membrana plasmática (ver explicação na zona periférica).

O esqueleto de actina proporciona uma barreira que previne a movimentação dos grânulos e sua fusão com a membrana plasmática (Hartwig 1998).

3-Zona das organelas: nesta zona encontram-se as organelas subcelulares envolvidas em processos metabólicos e no estoque de enzimas.

Grânulos alfa: são os mais numerosos grânulos encontrados (cerca de 50 por plaqueta). São esféricos ou ovais, medindo de 300 a 500 nm de diâmetro, envolvidos por uma membrana simples. Contém proteínas específicas como β TG e FP4, sintetizadas no megacariócito, proteínas inespecíficas, entre elas fibrinogênio, albumina, fibronectina e alguns fatores de coagulação, como o fator V; contém também substâncias com propriedades mitogênicas, como o fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF) e fator transformador de crescimento, TGF β (Pujol-Moix 1995). Na face interna da membrana do grânulo existem receptores, por exemplo o complexo GPIIb-IIIa e GMP-140, que são expressos na superfície da membrana quando a plaqueta é ativada e libera o conteúdo destes grânulos (Wenche *et al* 1998).

Corpos densos: são grânulos de conteúdo interno denso, separado da membrana envolvente por um halo claro, menos elétron-denso (White 1972). Cada plaqueta possui cerca de 5 grânulos densos, que medem de 200 a 300 nm de diâmetro. O conteúdo destes grânulos é composto de cálcio e outros cátions, serotonina, pirofosfato e nucleotídeos da adenina: ATP e ADP (Holmsen 1985).

Lisossomos: são pequenos e estão presentes em pequena quantidade; contém enzimas degradativas: catepsina, fosfatases ácidas, β -glicuronidase e β -galactosidase. Esta organela, na plaqueta, deve exercer as mesmas funções que nas demais células, incluindo as relacionadas com endocitose (Page 1989).

Mitocôndrias: são diferenciadas das outras estruturas pela presença da dupla membrana. Existem na mesma proporção que os corpos densos. Participam do metabolismo energético plaquetário.

Peroxisomos: são identificados como um tipo especial de grânulo pouco denso, medindo cerca de 90nm de diâmetro; contêm enzimas oxidativas, entre elas a catalase. Seu número é bastante reduzido, nas plaquetas (Pujol-Moix 1995).

Ribossomos: existem em pequena quantidade, livres e espalhados no citoplasma. As plaquetas raramente contém cisternas de retículo endoplasmático rugoso (Alberts *et al* 1997).

Há também agregados de glicogênio que, com frequência, encontram-se agrupados em grandes massas pelo citoplasma, além de gotas de lipídeos, nucleotídeos (*pool* metabólico) e cálcio (Pujol-Moix 1995).

Outras organelas membranosas podem estar presentes, como o *Complexo de Golgi*. Pouco existe na literatura, com relação ao seu papel na fisiologia plaquetária (Pujol-Moix 1995).

4-Sistema de membranas: É constituído pelo sistema canalicular aberto (SCA) conectado à superfície, e pelo sistema tubular denso (STD).

O SCA é o mais abundante sistema interno de membranas das plaquetas. Formado por invaginações tortuosas da membrana plasmática plaquetária através do citoplasma, aumenta a superfície de contato do citoplasma com o espaço exterior. Existem cerca de 15 a 20 aberturas do SCA, proporcionando acesso de substâncias exógenas ao interior citoplasmático e saída de produtos dos grânulos e corpos densos para o exterior (Kawakami & Hirano 1985).

O STD é constituído de canais delgados, com conteúdo amorfo, que não se comunicam com o exterior; muitos autores consideram que o STD representa restos de retículo endoplasmático liso da célula que lhe deu origem (White 1972). É considerado o principal reservatório de cálcio da plaqueta, podendo liberá-lo para promoção de eventos contráteis; contêm ainda enzimas envolvidas no metabolismo das prostaglandinas (Gerrard & White 1978). Da mesma forma que o SCA, o STD também encontra-se disperso pelo citoplasma plaquetário, sem posição definida.

Não existem evidências de que haja comunicação entre as membranas do SCA e do STD; estes dois sistemas de membranas não são encontrados em outros tipos de células sangüíneas (White 1987).

ESTRUTURA DA PLAQUETA ATIVADA

A ativação plaquetária é um processo complexo que se inicia na superfície da

célula com a interação de um agonista com seu receptor. Os receptores são GPs na sua grande maioria, intercaladas na membrana plaquetária, com um ou mais domínios extracelulares e citosólicos. No domínio extracelular, encontra-se o sítio ativo e, no citosólico acontece a interação com moléculas efetoras. A ativação prossegue com a transdução do sinal recebido na membrana plaquetária, através da expressão das propriedades funcionais da plaqueta (Brass 1991).

Assim como em outras células, proteínas genericamente denominadas G são necessárias para desencadear a formação de mensageiros intracelulares (segundos mensageiros), para a ativação e resposta final plaquetária (Pujol-Moix 1995). As proteínas G são proteínas reguladoras que medeiam interação entre receptores de superfície e os distintos efetores intracelulares como a adenilciclase e as fosfolipases A_2 e C (Alberts *et al* 1997).

A interação do agonista com seu receptor e com as enzimas responsáveis pela formação dos segundos mensageiros, como o trifosfato de inositol (IP_3) e o diacilglicerol (DG) é mediada por proteínas G que regulam a hidrólise dos inositóis e a formação de AMPc (Alberts *et al* 1997).

A fosfolipase C é a lipase mais importante das plaquetas e encontra-se no citosol e em frações de membrana. É ativada por uma proteína G_q , e a adenilciclase é estimulada por uma proteína G_s e inibida por uma G_i (Gilman 1987). O IP_3 libera o cálcio do STD, e o DG, além de liberar AA, ativa a proteinoquinase C (PKC) e favorece a secreção e a exposição do complexo receptor para o fibrinogênio (GP IIb-IIIa) (Pujol-Moix 1995). Ao mesmo tempo, o aumento do cálcio citosólico favorece a ativação da fosfolipase A_2 , que libera o AA, o qual é metabolizado produzindo TXA_2 , que se difunde para fora da plaqueta e pode interagir com seu receptor e amplificar enormemente o processo (Pujol-Moix 1995).

A via dos inositóis, prioritária dos agonistas fortes (Siess 1989), implica na ativação de uma série de enzimas tipo quinases, que fosforilam e desfosforilam o anel de inositol. Inicia-se quando o difosfato de fosfatidilinositol (PIP_2), sob a ação da

fosfolipase C, forma os segundos mensageiros: IP_3 e DG. O IP_3 libera cálcio do STD, o que faz com que aumente a concentração citosólica de cálcio livre, ativando assim enzimas plaquetárias em repouso, onde a concentração de cálcio é baixa. As respostas de IP_3 são mediadas por receptores localizados nas membranas do STD (Brass 1991). O DG atua como cofator para a ativação da PKC, diminuindo a concentração de cálcio necessária à atividade da enzima, promovendo a união da enzima à uma fosfatidilserina da membrana (Pujol-Moix 1995).

A via metabólica do AA, maior constituinte lipídico da membrana plaquetária, requer a ação de várias enzimas que liberam o ácido graxo no meio intracelular (revisado por Krol & Sullivan 1998). Uma vez liberado das membranas, o AA pode ser oxidado pela ciclooxigenase em prostanóides (PGE_2 e TXA_2), ou pela lipooxigenase em ácido 12-hidroperoxi-eicosatetraenóico (12-HPETE), reduzido a ácido 12-hidroxi-eicosatetraenóico (12-HETE), potente quimiotático para macrófagos e neutrófilos, que parece ter participação na adesão plaquetária à substratos trombogênicos. Os endoperóxidos cíclicos (PGG_2 e PGH_2) são muito instáveis. Sob ação da tromboxano-sintase, originam TXA_2 , e sob a ação da prostaciclina-sintase originam PGI_2 . O primeiro é o mais potente indutor da mudança de forma, secreção e agregação plaquetária, e o segundo aumenta o AMPc ao ativar a adenilciclase, tendo portanto efeitos opostos (Pujol-Moix 1995).

Existem mecanismos distintos que controlam e limitam a interação da plaqueta com o agonista e a sua ativação inicial. O endotélio possui propriedades distintas que modulam a adesão e agregação plaquetária, através da prostaciclina e do óxido nítrico (NO), substâncias produzidas e liberadas por ele; ambas compartilham de propriedades vasoativas que podem relaxar músculo liso e inibir agregação plaquetária (Roseblum 1997).

A geração de trombina que ocorre nos locais de lesão endotelial, e que também pode ativar plaquetas, é controlada pela trombomodulina, pelo sistema de anticoagulação natural através da proteína C ativada e pela antitrombina III (Pujol-

Moix 1995).

Existem também mecanismos que controlam a concentração de cálcio livre nas plaquetas e os níveis de AMPc, através da adenilciclase e da fosfodiesterase, fundamentais para evitar a ativação (Pujol-Moix 1995).

As respostas plaquetárias à ativação podem ser de duas categorias: reversíveis ou irreversíveis, dependendo diretamente da natureza e intensidade do agente estimulante (Verstraete & Vermynen 1989).

As respostas reversíveis estão relacionadas com adesão, mudança de forma e agregação primária; já as respostas irreversíveis estão relacionadas com reação de liberação ou secreção plaquetária e agregação secundária (Siess 1989).

Em resposta imediata à ativação plaquetária, o citoesqueleto de actina é desorganizado e reposicionado. A reestruturação do citoesqueleto produz mudança rápida de forma na plaqueta, em cerca de 2 a 3 segundos, e é caracterizada por dois aspectos distintos: perda da forma discóide, quando as plaquetas tornam-se arredondadas, e emissão de pseudópodes (Deranleau *et al* 1982). Plaquetas esféricas podem apresentar extensões da superfície na forma de filapodia e lamelipodia (Hartwig 1998); sua superfície torna-se finalmente irregular e enrugada (Siess 1989).

Os pseudópodes aumentam a área de contato da plaqueta com o meio e com as demais plaquetas. Estas alterações quase sempre precedem alterações funcionais (Progmovie & Milton 1982).

A mudança na forma da plaqueta requer a quebra dos filamentos radiais de actina que estão nas proximidades da membrana plasmática; assim, o citoesqueleto de membrana fica livre para se expandir. Este passo requer um aumento na concentração de cálcio citosólico (Hartwig 1998).

Concomitante com as alterações de forma, os grânulos concentram-se no interior da célula pela contração dos microtúbulos e microfilamentos, pré requisito para a secreção plaquetária. A fusão e liberação do conteúdo dos grânulos depende da concentração de cálcio citosólico (Hatwig 1998).

A reversibilidade da plaqueta à sua forma discóide dependerá da intensidade da estimulação exercida pelo agente indutor. Se for de intensidade e duração suficientes, uma grande quantidade de íons cálcio será liberada do sistema tubular. Esses íons ativarão a fosfolipase que desencadeará a liberação de AA, que se transformará em TXA_2 na plaqueta. Íons cálcio livres podem ser novamente armazenados via mecanismo dependente da PGI_2 , que, atuando sobre a membrana plaquetária, estimula a adenilciclase, transformando ATP em AMPc, com fosforilação de uma proteína fixadora de cálcio. Dessa forma, os íons podem ser novamente fixados às estruturas como o STD. Quando não existir mais cálcio livre, a plaqueta se desagregará (Verstraete & Vermynen 1989).

Técnicas ultra-estruturais têm mostrado que as organelas fundem-se com canais do SCA, antes da liberação dos seus conteúdos, em resposta à ativação plaquetária. Tem sido demonstrado que a contração do citoesqueleto é essencial para direcionar os produtos para dentro do SCA. A secreção plaquetária é considerada um processo multifásico, envolvendo: fusão de organelas com membranas do SCA e extrusão de produtos estocados na plaqueta, sob influência de atividade contrátil (White 1974).

Como os filamentos de actina formam uma barreira à exocitose, estes devem ser removidos e, na plaqueta, esta função é determinada pela ativação da gelsolina, pelo cálcio. Assim, há no citoplasma um *pool* de gelsolina inativa e solúvel. Agonistas induzem o aumento da concentração do cálcio citosólico, o qual ativa a gelsolina solúvel a se ligar e fragmentar fibras de actina pré existentes, aumentando dramaticamente o número de filamentos curtos. Os fragmentos de actina permanecem inicialmente encapados pela gelsolina e cap Z. A fase de reorganização da actina inicia-se quando sinais de ativação gerados dissociam proteínas encapadas das extremidades finais dos filamentos. As extremidades finais dos filamentos, livres de seus *caps*, ligam-se para reorganização da actina; esta é finalizada quando os filamentos são reencapados pela cap Z (Hartwig 1998).

As cavidades do SCA dilatam-se, provocando um aumento de área de superfície

(Reverter 1994) e fundem-se com as membranas dos grânulos, cujo conteúdo é liberado para o meio extracelular através destes canais. O restante do citoesqueleto forma uma massa central de gel contrátil, persistindo alguns microtúbulos retorcidos, principalmente nos pseudópodes (White 1987). Neste estágio, o fenômeno atinge a irreversibilidade (Verstraete & Vermynen 1989).

Sob determinados estímulos ocorrem evaginações vesiculares a partir da membrana plaquetária, que se desprendem em forma de micropartículas esféricas, medindo cerca de 0,1µm de diâmetro. Estas contêm proteínas da membrana plasmática e também da membrana dos grânulos, tendo sido relacionadas com a atividade pró coagulante plaquetária (Sims *et al* 1989).

Após se converterem em formas ativadas, as plaquetas ligam-se umas às outras e se contraem. A agregação começa após os processos de reorganização da actina e do citoesqueleto; requer a presença de cátions divalentes e fibrinogênio, através de pontes formadas entre o fibrinogênio e complexos GPIIb-IIIa da membrana plaquetária. Forma-se uma massa de contornos irregulares, onde as plaquetas se mesclam formando um mosaico, e entre as membranas das células e fibras de colágeno, formam-se finas pontes filamentosas (Hartwig 1998).

Mediadores liberados dos grânulos atraem plaquetas adicionais, iniciando-se as reações de reparos celulares (Hartwig 1998). As plaquetas perdem os seus grânulos e degeneram em forma de *metamorfose viscosa* (White 1987); a actina presente nas células contraídas é reorganizada em fibras retráteis (Hartwig 1998).

A ativação plaquetária tem sido estudada por vários autores em várias doenças, utilizando de técnicas ultra-estruturais, tanto à MET como à MEV.

Na doença cardíaca isquêmica, Puri *et al* (1994) classificaram as plaquetas ativadas de acordo com as alterações morfológicas observadas à MET, com relação à forma e distribuição das organelas. Segundo estes autores, podem ser encontradas: plaquetas pseudotubulares, tendo numerosos grânulos e poucas projeções; plaquetas membranosas, com centralização de organelas e sistema de membrana intimamente

relacionados; plaquetas saculares, com abundante sistema de membranas e poucos grânulos; e plaqueta pseudopodiais, com numerosos pseudópodes proeminentes. Estas alterações foram relacionadas com a progressão da doença aterosclerótica.

Em diabéticos, alterações morfológicas plaquetárias foram observadas à MEV: foram detectados pseudópodes e microvesículas, liberadas em vários estágios de retinopatias e nefropatias, relacionando a ativação plaquetária à estágios de severidade da doença (Kim *et al* 1995).

Na hipertensão pulmonar, agregados plaquetários irreversíveis, observados à MEV, foram utilizados como indicadores da doença hipertensiva, tendo servido de base para a adoção de medidas terapêuticas para prevenção (Lopes *et al* 1993).

Reverter *et al* (1994), através da observação à MET da ativação de plaquetas coletadas durante sessão de hemodiálise em nefropatas, constataram que alterações plaquetárias progressivas durante o processo, provocadas por componentes mecânicos do sistema de hemodiálise, que poderiam contribuir para problemas plaquetários descritos nesses doentes.

O objetivo do estudo da ativação plaquetária, por todos esses autores, foi encontrar uma característica morfológica que pudesse ser utilizada como “marcador” dos diferentes estados da ativação plaquetária, visando a identificação inicial de doenças, para fins de diagnóstico e prevenção.

Não foram encontrados na literatura estudos que mostrem alterações morfológicas plaquetárias em pacientes portadores de AOP, no estágio de claudicação intermitente, grau II da classificação de Fontaine (Cimminiello *et al* 1994).

OBJETIVOS

Tendo em vista os dados apresentados, a presente pesquisa teve por objetivos:

- ◆ Estudar as plaquetas de indivíduos normais, de faixas etárias diferentes, do ponto de vista funcional (através da agregação espontânea) e morfológico (através da ultra-estrutura e morfometria plaquetárias);
- ◆ Comparar os dados funcionais e estruturais das plaquetas dos pacientes com AOP, no estágio de claudicação intermitente, com aqueles dos indivíduos normais, de mesma faixa etária.

MATERIAL E MÉTODO

1. Material

1.1. Casuística

O grupo em estudo foi constituído de 10 voluntários sadios, com idade inferior a 50 anos (grupo controle 1, **GC1**), 10 voluntários sadios com idade superior a 50 anos (grupo controle 2, **GC2**) e de 10 pacientes voluntários (grupo 3, **GAOP**), portadores de AOP no estágio de claudicação intermitente, atendidos no Ambulatório de Claudicação, da Disciplina de Cirurgia Vascular da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB)-UNESP.

Todos os participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Médica da FMB, após terem sido informados sobre a pesquisa.

Todos os indivíduos eram do sexo masculino e moravam na cidade de Botucatu ou regiões próximas.

1.1.1. Critérios de Exclusão dos Voluntários

A- Encontro de alterações clínicas nos exames cardiológicos e/ou vasculares.

B- Indivíduos com história de qualquer doença crônica ou atual.

C- Ter tomado qualquer tipo de medicamento em 15 dias antecedentes aos

testes.

D- Recusa de assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

E- Recusa a qualquer um dos procedimentos desta pesquisa.

1.1.2. Critérios de Exclusão dos Voluntários Pacientes

A- Encontro de glicemia acima dos valores normais estabelecidos pela OMS (Gavin *et al* 1997).

B- Ter tomado qualquer tipo de medicação antiagregante em 15 dias anteriores aos testes.

C- Recusa de assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

D- Recusa a qualquer um dos procedimentos desta pesquisa.

2. Método

2.1. Controle Clínico dos Voluntários

Dos indivíduos de todos os grupos foram coletados 20ml de sangue, pela manhã e em jejum, de uma veia periférica, sem garroteamento prolongado, com seringa estéril e agulha calibre 21G, e distribuídos imediatamente em tubos apropriados, para os testes posteriores.

Eletrocardiograma, medidas de pressões e verificação da intensidade de pulsos das artérias periféricas (tibiais anterior e posterior) dos membros inferiores direito e esquerdo foram realizados após a coleta do sangue, por médicos cardiologista e cirurgião vascular, respectivamente. O índice pressórico de cada voluntário foi calculado a partir do quociente de divisão da pressão arterial do membro inferior pela pressão arterial do membro superior. O critério adotado pelo cirurgião vascular para a

medida da intensidade de pulso periférico, utilizou *score* de 0 (ausente), 1+ (pulso fraco), 2+ (pulso de média intensidade), 3+ (pulso quase normal) e 4+ (pulso normal). As informações dos indivíduos foram obtidas de maneira padronizada, segundo ficha clínica e protocolo (apêndice).

Também foi investigada a frequência de tabagismo entre os grupos.

2.2. Coleta e Processamento do Material

Foram utilizados 11ml de sangue para: teste de agregação plaquetária espontânea, dosagem de fibrinogênio plasmático e análise ultra-estrutural das plaquetas. O restante do sangue coletado foi enviado ao laboratório clínico do Hospital das Clínicas da FMB, para realização das dosagens séricas de glicemia, triglicérides, colesterol total e frações HDL e LDL (controle laboratorial).

2.2.1. Agregação Plaquetária Espontânea

O procedimento utilizado foi o método de Born (1962). O sangue coletado (4,5ml) foi colocado em tubo de polipropileno graduado, com tampa, contendo 0,5ml de solução anticoagulante de citrato de sódio a 3,8% e agitado suavemente. Este sangue anticoagulado foi centrifugado a 80g durante 7min, para obtenção do plasma rico em plaquetas (PRP); esta fração foi transferida para outro tubo de ensaio de plástico, com tampa, e deixada em repouso por aproximadamente 30min. O plasma pobre em plaquetas (PPP) foi obtido do restante do material, por centrifugação posterior a 1600g durante 15min.

As contagens das plaquetas foram realizadas no Contador automático de células, modelo T-890 da Coulter (EUA), segundo Armitage *et al* (1978). Nas amostras com contagem acima de 5×10^8 plaquetas/L, o PRP foi diluído com PPP do próprio indivíduo, para obtenção de valor em torno de 3×10^8 plaquetas/L seguindo a fórmula:

$$X = \frac{\text{N}^\circ \text{ de plaquetas no PRP}}{300}$$

O valor de X corresponde ao volume de PPP a ser adicionado em 1,0ml de PRP original.

Esta correção se faz necessária, porque o número de plaquetas interfere na agregação plaquetária (Packham 1978, Williams *et al* 1985), e o agregômetro de plaquetas utilizado requer valores entre 10^8 e 5×10^8 plaquetas/L.

O teste de agregação plaquetária espontânea (APE) foi realizado em agregômetro de plaquetas, modelo PACKS-4, da Helena Laboratories. A calibração de 100% de agregação foi obtida com 500 μ l de PPP, e a calibração de 0% de agregação foi obtida com 500 μ l de PRP, após a estabilização da temperatura, em 37°C, seguindo instruções do manual do aparelho. A determinação da APE máxima foi realizada em 500 μ l de PRP, deixados em cubetas de vidro siliconizadas, sob agitação padronizada de 180g durante 20min, sem a adição de agente ativador plaquetário.

A APE foi considerada positiva quando houve um decréscimo na densidade óptica de 15% ou mais (valor obtido em experiência prévia do nosso laboratório, com 40 indivíduos normais). Este valor é similar ao referido na literatura: 15% (Noris *et al* 1993) e 20% (Hoogendijk *et al* 1979, Trip *et al* 1990).

2.2.2. Dosagem de Fibrinogênio Plasmático

Amostras de PPP, obtidas segundo o item 3.1, foram utilizadas para a dosagem do fibrinogênio, segundo a técnica de Ratnoff & Menzie (1951). Em um tubo cônico graduado de vidro (15x2cm) foram colocados: 1ml de PPP, 1ml de vidro moído, 10ml de solução fisiológica e 1ml de trombina (obtida de plasma humano fresco congelado, de voluntários doadores de sangue do Banco de Sangue da Divisão Hemocentro, da FMB-UNESP); esta trombina foi previamente testada para coagular PPP, também de voluntários doadores de sangue normais, em um tempo de 12 a 15seg. O tubo tampado com rolha foi agitado várias vezes por inversão, até formar um coágulo. O material foi centrifugado a 700g por 5min, para que o coágulo fosse depositado no fundo do tubo, sendo posteriormente amassado com um bastão de vidro. O coágulo obtido foi

submetido a 2 lavagens com solução aquosa de NaCl a 0,9%, sendo cada lavagem seguida de centrifugação a 700g por 3min. O sobrenadante foi desprezado após cada lavagem, e ao coágulo lavado foi acrescentado 1ml de solução aquosa de carbonato de sódio a 20%; o tubo com este material permaneceu em banho-maria a 56°C por 10min. Após ter esfriado, foram acrescentados ao tubo: 7ml de água destilada, 3ml de hidróxido de sódio a 10%, e 1ml de reagente de Folin Ciocalteu.

A leitura da absorbância foi feita após 15min, em espectrofotômetro digital, B-34211 da Micronal, em 650nm. A concentração de fibrinogênio foi calculada multiplicando-se a absorbância obtida por um fator (F) calculado previamente, através da curva de absorbância com diferentes concentrações de L-Tirosina.

2.2.3. Análise Morfológica Ultra-estrutural

Na preparação das plaquetas foi utilizada a técnica descrita por Roger *et al.* (1992), modificada após testes preliminares. Uma amostra de 3ml do sangue coletado foi transferida para 7ml de solução de glutaraldeído (2,5% em tampão fosfato 0,1M pH 7,4), sendo fixada por 30min em temperatura ambiente. Em seguida, o material foi centrifugado por 15min a 180g, para obtenção do PRP. O sobrenadante foi separado e centrifugado novamente por 15min a 1100g, para a obtenção do sedimento utilizado para MET.

Outra amostra de 3ml foi submetida ao mesmo processo, para utilização em MEV.

2.2.3.1. Microscopia Eletrônica de Transmissão

O sedimento foi refixado na solução de glutaraldeído por 3h pelo menos, sendo pós-fixado em tetróxido de ósmio a 1% em tampão fosfato, por 2h, em temperatura ambiente e ao abrigo da luz.

Após desidratação em soluções crescentes de acetona, o sedimento foi incluído em resina Araldite[®].

Os cortes espessos (0,5µm), feitos com navalha de vidro, foram corados à quente com solução de azul de metileno a 1% - azul de toluidina a 1%, e bórax 1%, e utilizados para escolha dos blocos com material adequado, em microscópio de luz. Destes blocos foram obtidos os cortes ultrafinos (500 Å) que foram contrastados com solução de acetato de uranila (saturada em álcool 50%) durante 20min, e posteriormente com citrato de chumbo (em meio alcalino) por 20min. O material foi observado ao microscópio eletrônico de transmissão CM 100 da Philips, onde foi fotografado.

As preparações dos diferentes grupos foram analisadas morfológicamente, avaliando-se os sinais característicos, descritos na literatura, para ativação plaquetária: presença de pseudópodes, de microvesículas, dilatação do sistema canalicular aberto, diminuição e/ou centralização de grânulos citoplasmáticos.

Sedimentos plaquetários de alguns indivíduos dos grupos analisados, escolhidos aleatoriamente, foram submetidos à pós-fixação pela técnica do Iodeto de Zinco-tetróxido de ósmio (ZIO), proposta por Reinecke & Walther (1978). O material pós-fixado foi submetido ao seguinte protocolo: lavagem em tampão fosfato 0,1M pH 7,3 com sacarose 8,5% (2x de 10min); lavagem em tampão TRIS-aminoacetato (1,13M de NaCl; 0,01M de CaCl₂; 0,03M de MgCl₂; 0,01M de Tris-aminometano) pH4,5 (4x de 5min); incubação em meio apropriado (ZIO)* no escuro, à 10 °C (17 a 22hs); lavagem em tampão TRIS-aminometano (2x de 5min). Os procedimentos posteriores seguiram protocolo da preparação convencional para MET.

**Preparação do meio de incubação (ZIO)*

-3g de zinco em pó em 10ml de água destilada

-1g de iodo ressublimado em 10ml de água destilada

Preparo: misturar as 2 soluções com tampão TRIS-aminometano (1:1) e, em seguida, misturar 4 partes da solução final com 1 parte de OsO₄ a 2% (em água destilada).

2.2.3.2. Microscopia Eletrônica de Varredura

O sedimento foi lavado e ressuspensionado em tampão fosfato 0,1M pH 7,4. Com o

auxílio de uma pipeta Pasteur, alíquotas de suspensão de plaquetas foram gotejadas sobre lamínulas de vidro previamente recobertas com Poli L-Lisina, permanecendo em câmara úmida, por 10min. Após a adesão das plaquetas, as lamínulas foram lavadas em tampão fosfato, refixadas em solução de glutaraldeído por 1h e pós-fixadas em tetróxido de ósmio a 1% no mesmo tampão.

A desidratação foi realizada em soluções crescentes de álcool, sendo as lamínulas secadas com CO₂ líquido em aparelho ponto crítico (CPD 020 da Balzers Union). Após montagem em suportes apropriados, estas foram recobertas com camada de 10nm de ouro em metalizador (MED 010 da Balzers Union) e examinadas em microscópio eletrônico de varredura SM 500 da Philips, onde foram fotografadas.

Nesta análise levaram-se em consideração as seguintes variáveis: a alteração da forma discóide, presença de pseudópodes e de microvesículas plaquetárias.

Para avaliação da quantidade de plaquetas ativadas, ainda durante a análise no MEV, foram contadas as plaquetas normais e aquelas com sinais de ativação, em cinco campos visuais (1 central e 4 laterais), com aumento de 2.000X, sendo então calculada a porcentagem de células alteradas em relação às normais.

2.3. Análise Morfométrica Ultra-estrutural

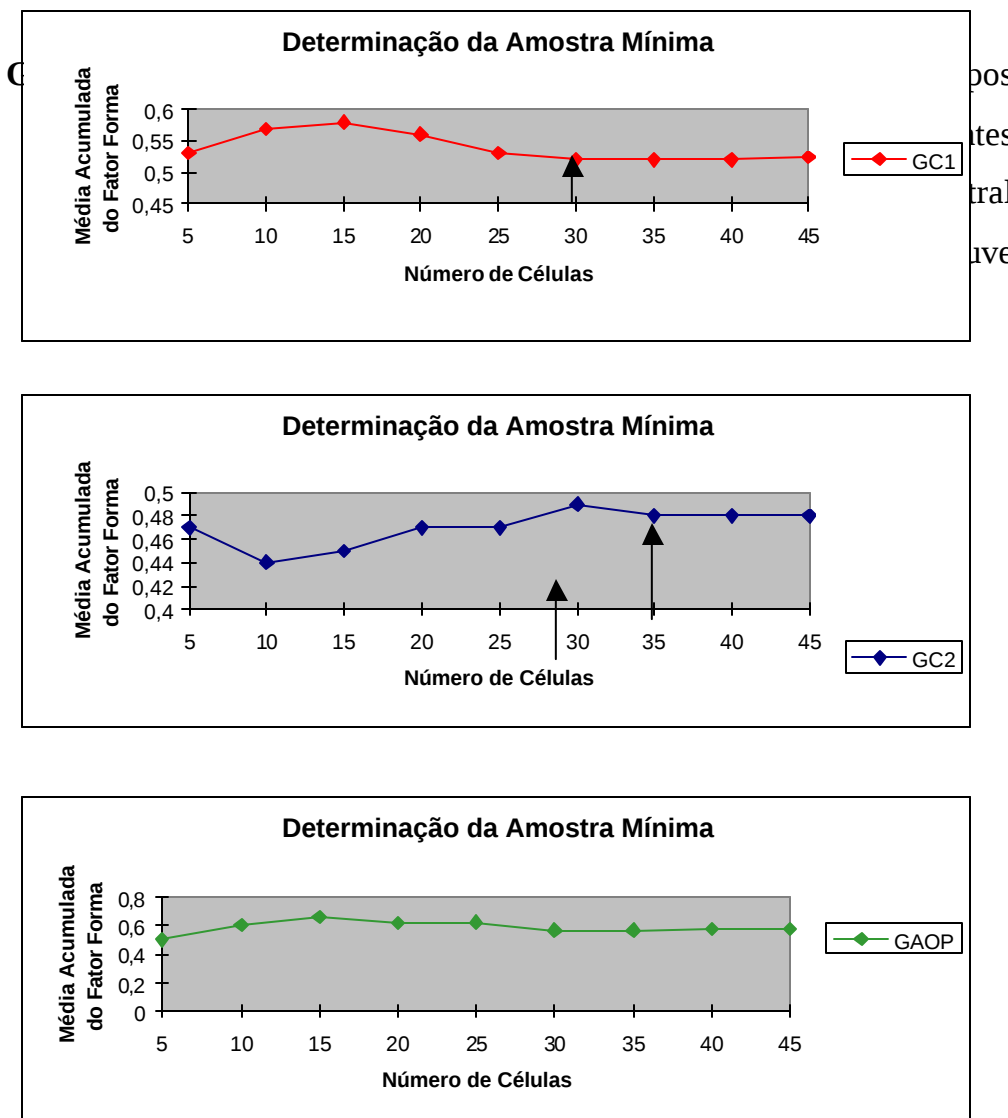
A análise morfométrica ultraestrutural da forma das plaquetas foi realizada em fotomicrografias de MET, com aumento final de 17.000X, em Analisador de Imagens Computadorizado da Nireco (Japão), com o programa Luzex- F. Estruturas muito pequenas desprovidas de detalhes ultra-estruturais, ou que não pudessem ser reconhecidas como plaquetas, foram descartadas, levando-se em consideração os critérios adotados por Park *et al.* (1990)

Foram realizadas medidas da área e do perímetro das plaquetas, utilizadas para avaliação da alteração da forma, segundo cálculo do fator forma (FF), estabelecido por Park *et al.* (1990).

$$FF = 4 \pi A / P^2, \text{ onde } A = \text{área e } P = \text{perímetro.}$$

Para a determinação do número mínimo de plaquetas necessárias para o cálculo de FF, em cada grupo, foi utilizada a técnica da média acumulada de Williams (1977). Para tanto, um indivíduo foi aleatoriamente escolhido de cada grupo, sendo realizado o cálculo **B** média acumulada do FF de cada 5 plaquetas, até que a média se estabilizasse. Foi verificado que a média se estabilizava em 30 plaquetas para o **GC1**, 35 para o **GC2** e 30 para o **GAOP (Gráfico 1A B e C)**. Estes foram os números utilizados para se efetuarem as medidas das plaquetas de todos os indivíduos participantes, em cada grupo de estudo.

C



2.4. Dosagens Bioquímicas Séricas

Foram realizadas dosagens séricas de: glicose, triglicérides e colesterol total pelo método enzimático colorimétrico.

As dosagens de HDL colesterol foram obtidas pelo método direto, por determinação homogênea. As concentrações de LDL colesterol foram calculadas a partir da fórmula de Freedwald:

$$\text{LDL} = \text{Colesterol total} - (\text{Triglicérides}/5 + \text{HDL colesterol})$$

Todas as amostras foram processadas em Sistema de Automação (modelo RA-XT, da Technicon).

2.5. Análise Estatística

A análise estatística foi realizada segundo metodologia de Fisher & Belle (1993).

Para comparação dos grupos quanto às pressões periféricas das artérias tibiais anterior e posterior dos membros inferiores esquerdo e direito, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis seguido do método de Student-Newman-Keuls, pois as mesmas não apresentavam distribuição normal.

Para comparação dos grupos quanto às dosagens séricas de glicemia, triglicérides, colesterol total e frações HDL e LDL, dosagem de fibrinogênio plasmático, agregação plaquetária espontânea, análise morfológica à MEV e análise morfométrica à MET, foi realizada a Análise de Variância seguida do Teste de Tukey, pois as variáveis apresentavam distribuição normal.

Para estudar a associação entre: tabagismo/grupo e pulsos periféricos/grupo, foi realizado o teste Exato de Fisher.

Para estudar a correlação entre: percentagem de plaquetas com sinal de ativação (MET/MEV) e agregação plaquetária espontânea, foi realizado o Coeficiente de relação de Pearson. Em todas as análises o nível de significância adotado foi de 5%.

RESULTADOS

1. AVALIAÇÃO CLÍNICA

Todos os valores individuais para cada parâmetro avaliado encontram-se no Apêndice deste trabalho.

1.1. Tabagismo

A frequência de tabagismo nos diferentes grupos investigados, está apresentada na **Tabela 1**. Não houve diferença significativa na frequência de tabagismo entre os grupos estudados.

Tabela 1- Distribuição de frequências absolutas e relativas dos indivíduos segundo grupo e tabagismo.

Grupos	Tabagismo		TOTAL
	SIM	NÃO	
GC1	3 (30,0)	7 (70,0)	10 (100,0)
GC2	4 (40,0)	6 (60,0)	10 (100,0)
GAOP	4 (40,0)	6 (60,0)	10 (100,0)

GC1: grupo de voluntários normais, com idade inferior a 50 anos.

GC2: grupo de voluntários normais, com idade superior a 50 anos.

GAOP: grupo de pacientes com aterosclerose obliterante periférica ($P > 0,05$)

1.2. Pressões nas Artérias Periféricas

Os valores medianos dos índices das pressões periféricas estavam alterados (menores que 1,00) apenas no grupo **GAOP**, para as artérias examinadas (ta/mie: 0,65, tp/mie: 0,75, ta/mid: 0,60 e tp/mid: 0,65), apresentando-se estatisticamente diferentes dos grupos controles **GC1** e **GC2**, onde os índices foram maiores ou iguais a 1,00, para todas as artérias examinadas (**Tabela 2**).

Tabela 2- Valores medianos dos índices de pressões das artérias tibiais anterior (ta) e posterior (tp), dos membros inferiores esquerdo (mie) e direito (mid), nos grupos controles e no grupo de pacientes com AOP.

Grupos	Artérias examinadas			
	ta/mie	tp/mie	ta/mid	tp/mid
GC1	1,10 a ⁽¹⁾	1,10 a	1,10 a	1,10 a
GC2	1,10 a	1,10 a	1,10 a	1,10 a
GAOP	0,65 b	0,75 b	0,60 b	0,65 b

GC1: grupo de voluntários normais, com idade inferior a 50 anos.

GC2: grupo de voluntários normais, com idade superior a 50 anos.

GAOP: grupo de pacientes com aterosclerose obliterante periférica.

(1) Medianas seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente ($P > 0,05$)

1.3. Intensidade de Pulsos Periféricos

A análise estatística realizada pelo Teste Exato de Fisher mostrou que, nos grupos controles **GC1** e **GC2**, todos os voluntários tiveram intensidade de pulsos periféricos de 4+, enquanto no grupo **GAOP** predominou a ausência de pulsos periféricos (0), para as artérias ta e tp/mie (**Tabela 3**). Os resultados da intensidade de pulsos periféricos obtidos nas artérias ta e tp/mid encontram-se na **Tabela 4**, onde no grupo **GC1**, a intensidade de pulsos periféricos foi de 4+ para todos os voluntários, no grupo **GC2** predominou presença de 4+, e no grupo **GAOP** predominou a ausência de pulsos periféricos.

Tabela 3- Distribuição de freqüências absolutas (e relativas) dos pulsos periféricos das artérias tibiais anterior (ta) e posterior (tp), do membro inferior esquerdo (mie), nos grupos controles e no grupo de pacientes com AOP.

GRUPOS	Intensidade de Pulsos Periféricos									
	0		1+		2+		3+		4+	
	ta	tp	ta	tp	ta	tp	ta	tp	ta	tp
GC1	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	10(100)	10(100)
GC2	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	10(100)	10(100)
GAOP	8(80)	7(70)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	1(10)	1(10)	1(10)	2(20)

GC1: grupo de voluntários normais, com idade inferior a 50 anos.

GC2: grupo de voluntários normais, com idade superior a 50 anos.

GAOP: grupo de pacientes com aterosclerose obliterante periférica ($P < 0,01$)

Tabela 4- Distribuição de freqüências absolutas (e relativas) dos pulsos periféricos das artérias tibiais anterior (ta) e posterior (tp), do membro inferior direito (mid), nos grupos controles e no grupo de pacientes com AOP.

GRUPOS	Intensidade de Pulsos Periféricos									
	0		1+		2+		3+		4+	
	ta	tp	ta	tp	ta	tp	ta	tp	ta	tp
GC1	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	10(100)	10(100)
GC2	1(1,0)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	1(1,0)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	8(80)	10(100)
GAOP	5(50)	5(50)	1(1,0)	1(1,0)	0(0,0)	2(2,0)	3(30)	1(10)	1(10)	1(10)

GC1: grupo de voluntários normais, com idade inferior a 50 anos.

GC2: grupo de voluntários normais, com idade superior a 50 anos.

GAOP: grupo de pacientes com aterosclerose obliterante periférica ($P < 0,01$)

2. AVALIAÇÃO LABORATORIAL

2.1. Dosagens Bioquímicas Séricas

As dosagens bioquímicas de glicose, triglicérides, colesterol total, HDL e LDL encontram-se na **Tabela 5**.

Tabela 5 Médias e desvios padrões das dosagens séricas de Glicose, Triglicérides, Colesterol total e frações: HDL e LDL, dos grupos controles e do grupo de pacientes com AOP.

Parâmetros Bioquímicos	Grupos		
	GC1	GC2	GAOP
Glicose (mg%)	95,80±5,65a ⁽¹⁾	98,50±7,92a	105,10±13,02a
Triglicérides (mg%)	128,00±46,45a	143,90±90,24a	134,90±88,83a
Colesterol total (mg%)	189,10±43,40a	228,20±37,04a	201,40±27,18a
HDL (mg%)	36,00±6,30ab	42,70±12,58a	30,00±5,33b
LDL (mg%)	140,50±40,10a	153,80±35,70a	140,00±26,89a

GC1: grupo de voluntários normais, com idade inferior a 50 anos.

GC2: grupo de voluntários normais, com idade superior a 50 anos.

GAOP: grupo de pacientes com aterosclerose obliterante periférica

(1) Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente ($P > 0,05$)

Com relação às dosagens séricas de glicose, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos controles (GC1 e GC2), e nem destes

com relação ao grupo de pacientes (**GAOP**).

Nos valores médios das dosagens de triglicérides não se observaram diferenças significativas entre os grupos estudados. Não foram observadas também diferenças significativas com relação às dosagens de LDL colesterol, nem entre os grupos controles de faixas etárias diferentes (**GC1** e **GC2**), nem entre os grupos controles e o grupo de pacientes (**GAOP**).

Não houve diferença estatisticamente significativa na média das dosagens do colesterol total sérico do **GAOP**, com relação aos grupos controles **GC1** e **GC2**, nem entre os grupos de faixas etárias diferentes. Não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos controles de faixas etárias diferentes (**GC1** e **GC2**) nas dosagens séricas de HDL colesterol, entretanto, houve diferença significativa entre o **GC2** ($42,70 \pm 12,58$) e **GAOP** ($30,00 \pm 5,33$).

2.2. Dosagem de Fibrinogênio Plasmático

As dosagens de fibrinogênio plasmático encontram-se na **Tabela 6**.

Tabela 6- Médias e desvios padrões das dosagens de Fibrinogênio plasmático nos grupos controles e no grupo de pacientes com AOP.

GRUPOS	Fibrinogênio (mg%)
GC1	$209,80 \pm 47,02b^{(1)}$
GC2	$236,40 \pm 45,07ab$
GAOP	$262,90 \pm 47,86a$

GC1: grupo de voluntários normais, com idade inferior a 50 anos.

GC2: grupo de voluntários normais, com idade superior a 50 anos.

GAOP: grupo de pacientes com aterosclerose obliterante periférica

(1) Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente ($P > 0,05$)

Houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos **GC1** ($209,80 \pm 47,02$) e **GAOP** ($262,90 \pm 47,86$) com relação às dosagens de fibrinogênio, mas não se observou diferença significativa entre os grupos **GC1** e **GC2**, e nem entre **GC2** e **GAOP**.

2.3. Avaliação da Função Plaquetária

Os resultados da avaliação da função plaquetária, realizada através da agregação plaquetária espontânea em suspensão de plaquetas (PRP), encontram-se na **Tabela 7**. Na prova de função plaquetária, não se observou diferença estatisticamente significativa entre os grupos investigados.

Tabela 7- Médias e desvios padrões das porcentagens de Agregação Plaquetária Espontânea, nos grupos controles e no grupo de pacientes.

GRUPOS	Agregação Espontânea (%)
GC1	11,05±2,96a ⁽¹⁾
GC2	10,91±3,14 a
GAOP	11,44±3,29 a

GC1: grupo de voluntários normais, com idade inferior a 50 anos.

GC2: grupo de voluntários normais, com idade superior a 50 anos.

GAOP: grupo de pacientes com aterosclerose obliterante periférica

(1) Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente(P>0,05)

3. AVALIAÇÃO ULTRA-ESTRUTURAL MORFOLÓGICA E MORFOMÉTRICA DAS PLAQUETAS

3.1. À Microscopia Eletrônica de Transmissão

3.1.1. Análise Morfológica

Com a técnica de coleta utilizada, foi possível a obtenção de cortes com plaquetas bem preservadas e espalhadas, o que facilitou a análise de cada uma, isoladamente. Raramente foram observadas amostras com plaquetas agregadas, o que dificultaria sua análise e poderia causar modificações em sua forma. Poucas amostras continham outros elementos sangüíneos como leucócitos e hemáceas.

De maneira geral, não foram observadas diferenças morfológicas ultra-estruturais marcantes entre as plaquetas dos diferentes indivíduos, dos três grupos estudados (Figs. 1-3).

A superfície da maioria das plaquetas era regular, podendo ser vistas plaquetas com quantidade considerável de pseudópodes, de tamanhos diversos (Figs. 1C-E; 2A e F; 3D). Na membrana citoplasmática foram observadas as aberturas do sistema canalicular aberto (Fig. 3C) que muitas vezes estava dilatado, podendo exibir conteúdo granular em seu interior (Fig. 2D).

Em cortes transversais, foi claramente observada a banda circunferencial de microtúbulo, sempre próxima à membrana; em cortes longitudinais, os microtúbulos podiam ser observados nos polos das plaquetas (Figs. 1B; 2C). O sistema tubular denso, situado próximo aos microtúbulos periféricos, ou distribuídos pelo citosol, estava sem aparente alteração (Figs. 1B; 2B; 3C).

Os grânulos (Figs. 1A e B; 2A e B; 3C), as mitocôndrias (Fig. 1B) e as áreas com glicogênio (Figs. 1A e 3A) estavam aleatoriamente distribuídos no citosol plaquetário (Figs. 1A-C; 2A, B e E; 3A e C). Em algumas amostras foi notada concentração e/ou marginalização de grânulos, e também plaquetas com desgranulação citoplasmática, independente do grupo analisado (Figs. 1C-D, 2F, 3D).

Em uma grande proporção de plaquetas, em todos os grupos estudados, estavam presentes “pequenas bolhas” que foram interpretadas como microvesículas (também chamadas de micropartículas) (Figs. 1C; 2A e C).

Sedimentos plaquetários submetidos à pós-fixação pela técnica do ZIO, evidenciaram complexos de Golgi bastante desenvolvidos e freqüentemente marcados positivamente (Figs. 4A-D). Vesículas pequenas estavam associadas às cisternas do Golgi, em ambas as faces cis e trans (Fig. 4A). Estruturas tubulares (Figs. 4C e D) coradas positivamente pelo ZIO foram identificadas próximas ao complexo de Golgi ou dispersas pelo citosol (Figs. 4C e D). Outras organelas podem não apresentar coloração positiva pelo ZIO, como por exemplo mitocôndrias (Figs. 4A e B), grânulos (Figs. 4A-D) e corpos densos (Figs. 4A e B).

3.1.2. Análise Morfométrica

A análise estatística da área, perímetro e do Fator Forma das plaquetas, obtidos através da mensuração em fotomicrografias não revelou diferenças significativas das plaquetas, entre os grupos estudados (**Tabela 8**). Os valores do Fator Forma encontrados mostraram que as plaquetas nos diferentes grupos não têm grandes variações na sua forma, conservando a forma elíptica.

Tabela 8:- Médias e desvios padrões dos valores da Área, Perímetro e do Fator Forma das plaquetas nos grupos controles e no grupo de pacientes com AOP.

GRUPOS	Área (mm ²)	Perímetro (mm)	Fator Forma
GC1	3,06±0,25a ⁽¹⁾	8,46±0,40a	0,54±0,04a
GC2	2,89±0,44a	8,38±0,67a	0,51±0,03 a
GAOP	3,24±0,61a	8,71±0,89a	0,54±0,05 a

GC1: grupo de voluntários normais, com idade inferior a 50 anos.

GC2: grupo de voluntários normais, com idade superior a 50 anos.

GAOP: grupo de pacientes com aterosclerose obliterante periférica

(1) Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente (p>0,05).

3.2. À Microscopia Eletrônica de Varredura

3.2.1. Análise Morfológica

As análises microscópicas à MEV revelaram que, em todos os grupos, havia as mesmas alterações, não havendo portanto alterações marcantes que diferenciassem um grupo do outro (Figs. 5-7).

Independente dos grupos de estudo, em todas as amostras investigadas foram notados campos microscópicos contendo plaquetas com sinais de ativação que se mesclavam com campos de plaquetas discóides sem nenhum sinal de ativação (Figs. 5A; 6A e B; 7A, B e D).

As plaquetas consideradas sem ativação possuíam superfície lisa e forma de pequenos discos delicados. Outras plaquetas possuíam superfície rugosa e alteração de forma que variava de esférica até formas mais irregulares, com pseudópodes de vários tamanhos, sendo identificadas como plaquetas ativadas (Figs. 5B-D; 6B-D; 7C-F).

Uma outra alteração observada foi a presença de emissão de microvesículas, que era freqüente em um grande número de plaquetas, de todos os grupos analisados (Figs. 5D; 6D; 7C).

3.2.2. Análise Quantitativa

Para avaliar a existência de eventuais diferenças na proporção de plaquetas normais e ativadas nos grupos em estudo, foi realizada a comparação da porcentagem de plaquetas com sinais de ativação em relação à porcentagem de plaquetas discóides. Os resultados obtidos encontram-se na **Tabela 9**.

Tabela 9- Porcentagem de plaquetas ativadas, à MEV, nos grupos controles e no grupo de pacientes com AOP

GRUPOS	Plaquetas Ativadas (%)
GC1	42,70±4,54a ⁽¹⁾
GC2	32,31±6,22b
GAOP	37,76±8,91b

GC1: grupo de voluntários normais, com idade inferior a 50 anos.

GC2: grupo de voluntários normais, com idade superior a 50 anos.

GAOP: grupo de pacientes com aterosclerose obliterante periférica

(1) Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente (p> 0,05)

Existe diferença estatisticamente significativa na porcentagem de plaquetas ativadas entre os grupos controles **GC1** (42,70±4,54) **GC2** (32,31±6,22), bem como entre os outros grupos **GC1** e **GAOP** (37,76±8,91).

Para completar a investigação, foi feita a correlação entre os resultados obtidos

de ativação plaquetária (avaliada à MEV e à MET) e a APE.

Os resultados estatísticos mostraram que a correlação foi baixa, negativa e não significativa ($r=-0,11$ e $p=0,58$).

DOCUMENTAÇÃO FOTOGRÁFICA

FIGURA 1

Ultra-estrutura (MET) de plaquetas de voluntários adultos e sadios, com idade inferior a 50 anos (GC1)

- A-** Aspecto geral das plaquetas. Notar que a maioria apresenta forma discóide, com estruturas subcelulares preservadas: notar grânulos dispersos pelo citosol, depósitos de glicogênio (*), sistema canalicular aberto (CA); ausência de pseudópodes e de microvesículas (17.000 X).
- B-** Plaqueta com características morfológicas normais, exibindo complexo de Golgi (CG) bastante desenvolvido, microtúbulos (T) localizados nos polos da célula, mitocôndrias (M), grânulos (G) e sistema canalicular aberto (CA) e sistema tubular denso (TD) distribuídos pelo citosol (42.000 X).
- C-** Detalhe de plaquetas com microvesícula (V) e pseudópode (P), centralização e dilatação de alguns canálculos do sistema canalicular aberto (CA) (23.000 X).
- D-** Plaquetas com formas irregulares, pela emissão de pseudópodes (P) de vários tamanhos; notar centralização de grânulos (17.000 X).
- E-** Plaqueta com pseudópodes; notar os grânulos centralizados. (17.000 X).

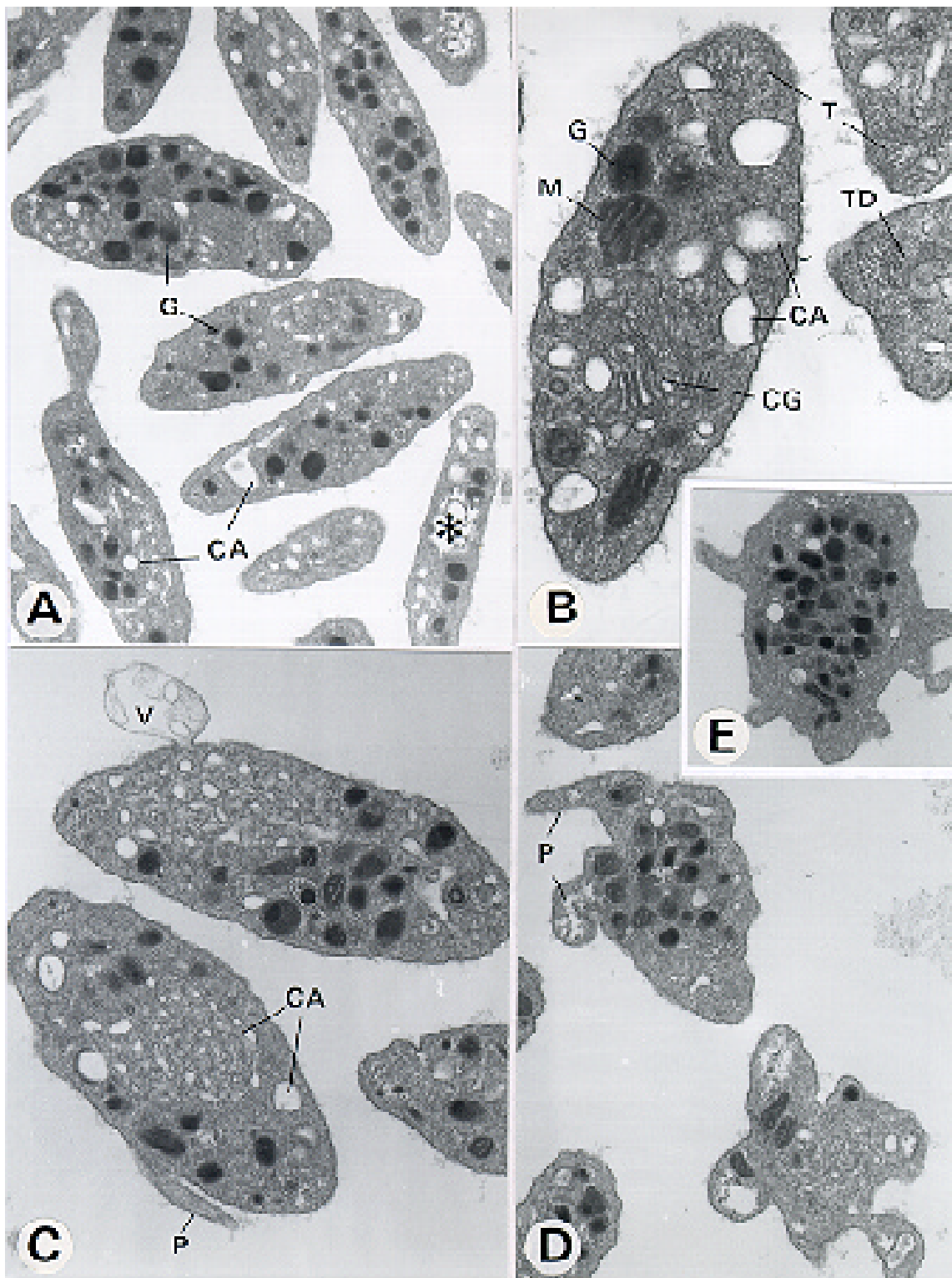


FIGURA 2

Ultra-estrutura (MET) de plaquetas de voluntários sadios, com idade superior a 50 anos (GC2)

- A-** Aspecto geral das plaquetas, algumas delas conservando a forma discóide. Notar os grânulos dispersos no citosol e alguns canais do sistema canalicular aberto (CA) dilatados; plaqueta com pseudópodes (P) e microvesícula (V) (17.000 X).
- B-** Plaqueta mostrando complexo de Golgi (CG) ocupando grande parte do centro celular. Notar grânulos dispersos, sistema canalicular aberto (CA) dilatado e sistema tubular denso (TD) (42.000 X).
- C-** Detalhe de plaqueta em corte longitudinal, evidenciando os microtúbulos (T) das extremidades e emissão de microvesícula (V) (57.500 X).
- D-** Plaquetas com material de grânulos (seta) liberado na luz do sistema canalicular aberto, que se comunica com o exterior (*) (17.000 X).
- E-** Plaqueta com alteração de forma e canais do sistema canalicular aberto (CA) concentrados na região central do citosol (23.000 X).
- F-** Plaqueta com forma bastante irregular, pela presença de pseudópodes de diversos tamanhos e poucos grânulos centralizados (17.000 X).

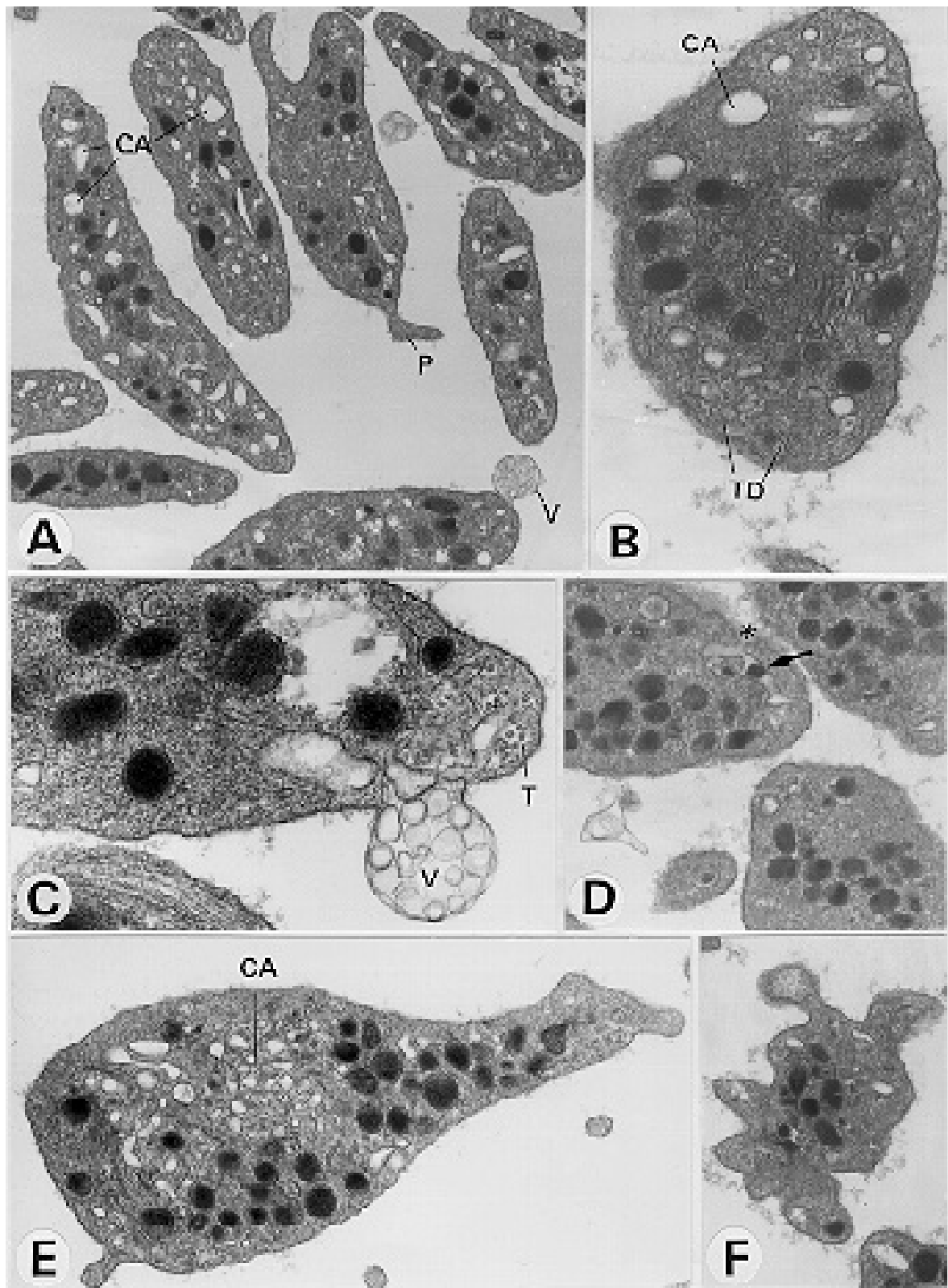


FIGURA 3

Ultra-estrutura (MET) de plaquetas de voluntários adultos, portadores de Aterosclerose Obliterante Periférica (GAOP)

- A-** Aspecto geral da morfologia plaquetária. Plaquetas mostrando a manutenção da forma discóide, para a maioria das células; notar depósitos de glicogênio (*), sistema canalicular aberto dilatado (CA) e microvesícula (V) (17.000 X).
- B-** Plaqueta apresentando complexo de Golgi evidente (CG), poucos grânulos e sistema canalicular aberto evidente (42.000 X).
- C-** Plaqueta exibindo elementos do sistema canalicular aberto dilatados (*), e com abertura para o exterior (seta). Os grânulos e os canais tortuosos do sistema tubular denso (TD) encontram-se distribuídos pelo citosol (57.500 X).
- D-** Plaqueta com forma irregular, mostrando inúmeros pseudópodes (P), grande quantidade de grânulos centralizados e dilatação do canalículo (*) (23.000 X).

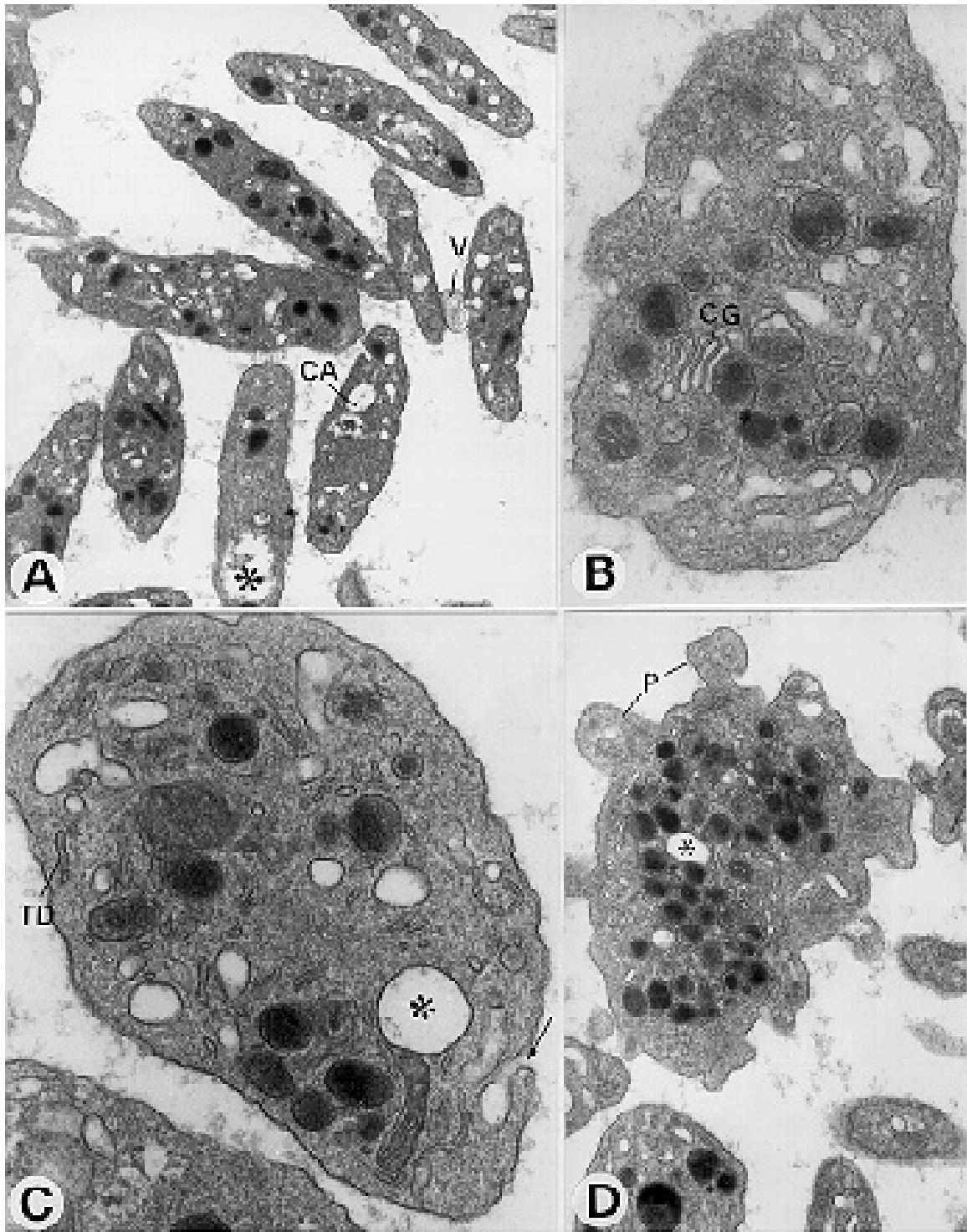


FIGURA 4

Ultra-estrutura (MET) de plaquetas de voluntários adultos e sadios (GC1 e GC2) e de portadores de Aterosclerose Obliterante Periférica (GAOP), revelada pela técnica do ZIO

- A- GC1.** Plaqueta com reação positiva nas cisternas do complexo de Golgi (CG) e nas inúmeras vesículas associadas, nas faces cis e trans. Notar reação negativa para alguns grânulos (G) (36.000 X).
- B- GC2.** Plaqueta com ausência de positividade para a reação em algumas cisternas do complexo de Golgi (seta), mitocôndrias e grânulos. Positividade em algumas regiões do sistema tubular denso (TD) (36.000 X).
- C- GAOP.** Plaqueta com complexo de Golgi bastante evidenciado pela técnica. Positividade para estruturas do sistema tubular denso (TD). Ausência de positividade para grânulos e sistema canalicular aberto (57.500 X).
- D- GC2.** Plaqueta apresentando complexo de Golgi (CG) positivo para a reação. Observar algumas estruturas do sistema tubular denso (TD) e mitocôndria (M), corados positivamente (42.000 X).

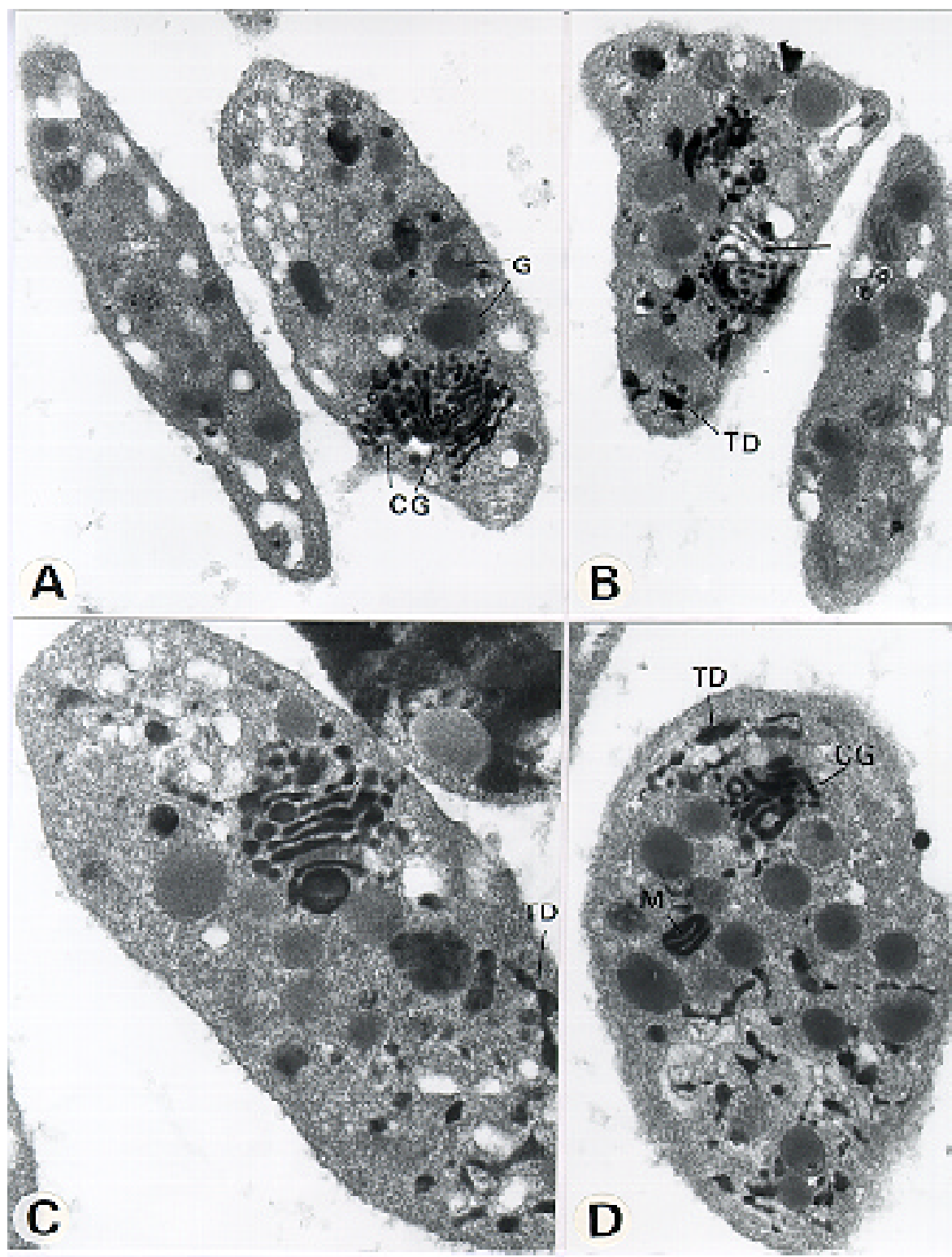


FIGURA 5

Ultra-estrutura (MEV) de plaquetas de voluntários adultos e saudáveis, com idade inferior a 50 anos (GC1)

- A-** Aspecto geral das plaquetas. A maioria delas apresenta forma discóide normal; outras mostram-se alteradas (*), pela emissão de pseudópodes curtos e longos (4.800 X).
- B-** Detalhe de plaqueta com superfície bastante irregular, com quantidade considerável de pseudópodes (10.600 X).
- C-** Plaquetas, na grande maioria com sinais de ativação. Notar presença de plaquetas arredondadas (*) e com emissão de quantidade variável de pseudópodes (P) (11.000 X).
- D-** Imagem de plaquetas arredondadas, com superfície irregular e com microvesículas (V) e pseudópodes (P) (13.600 X).

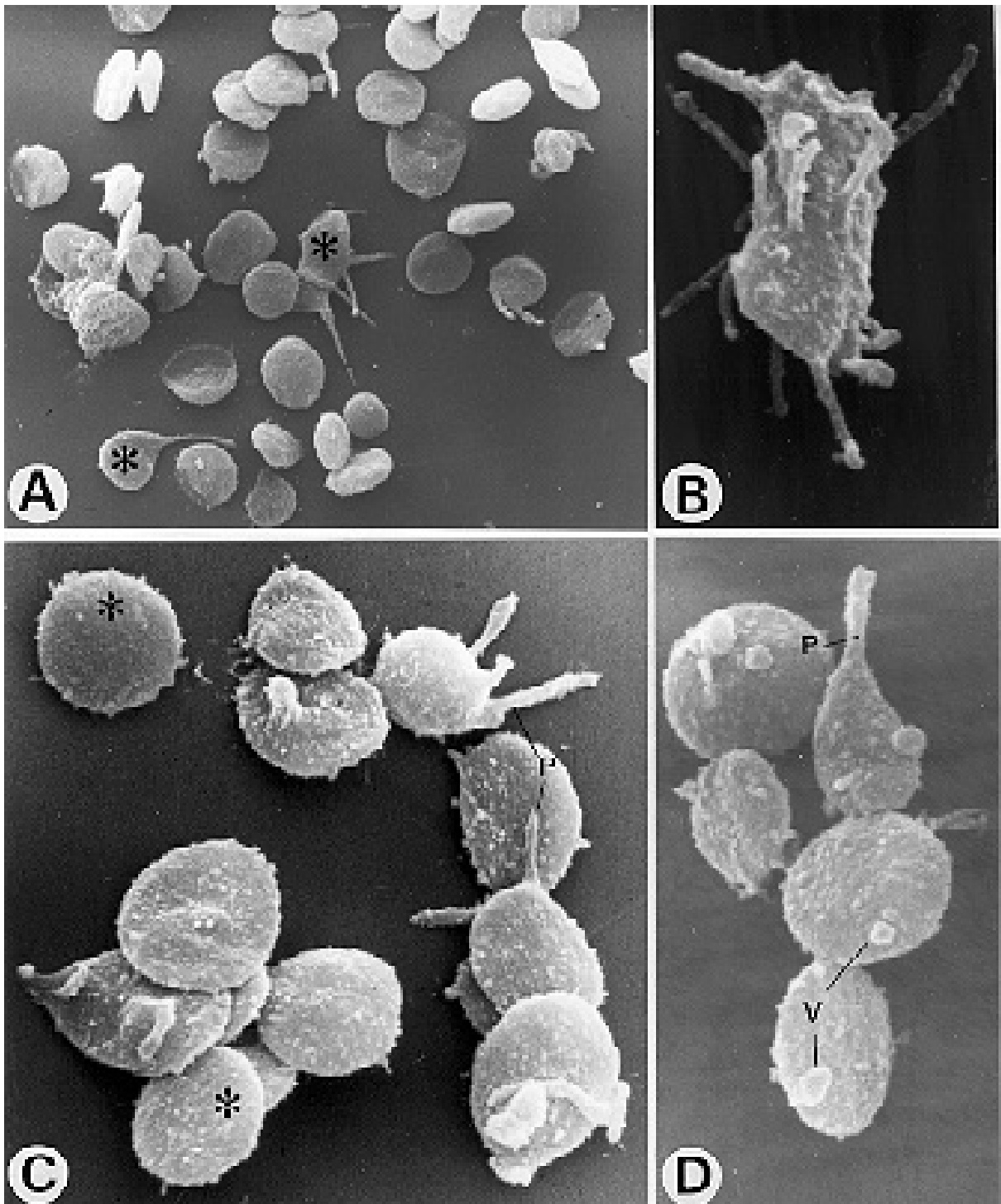


FIGURA 6

Ultra-estrutura (MEV) de plaquetas de voluntários sadios, com idade superior a 50 anos (GC2)

- A-** Aspecto geral das plaquetas. A maioria delas apresenta forma discóide normal; raras (*) mostram pseudópodes (6.500 X).
- B-** Imagem de plaqueta com forma discóide normal e outras com emissão de pseudópode (*) (8.500 X).
- C-** Plaquetas arredondadas, na grande maioria, algumas com pseudópodes (*) (11.500 X).
- D-** Plaquetas, na grande maioria com mudança de forma, pela emissão de microvesículas (V) e de pseudópodes (10.100 X).

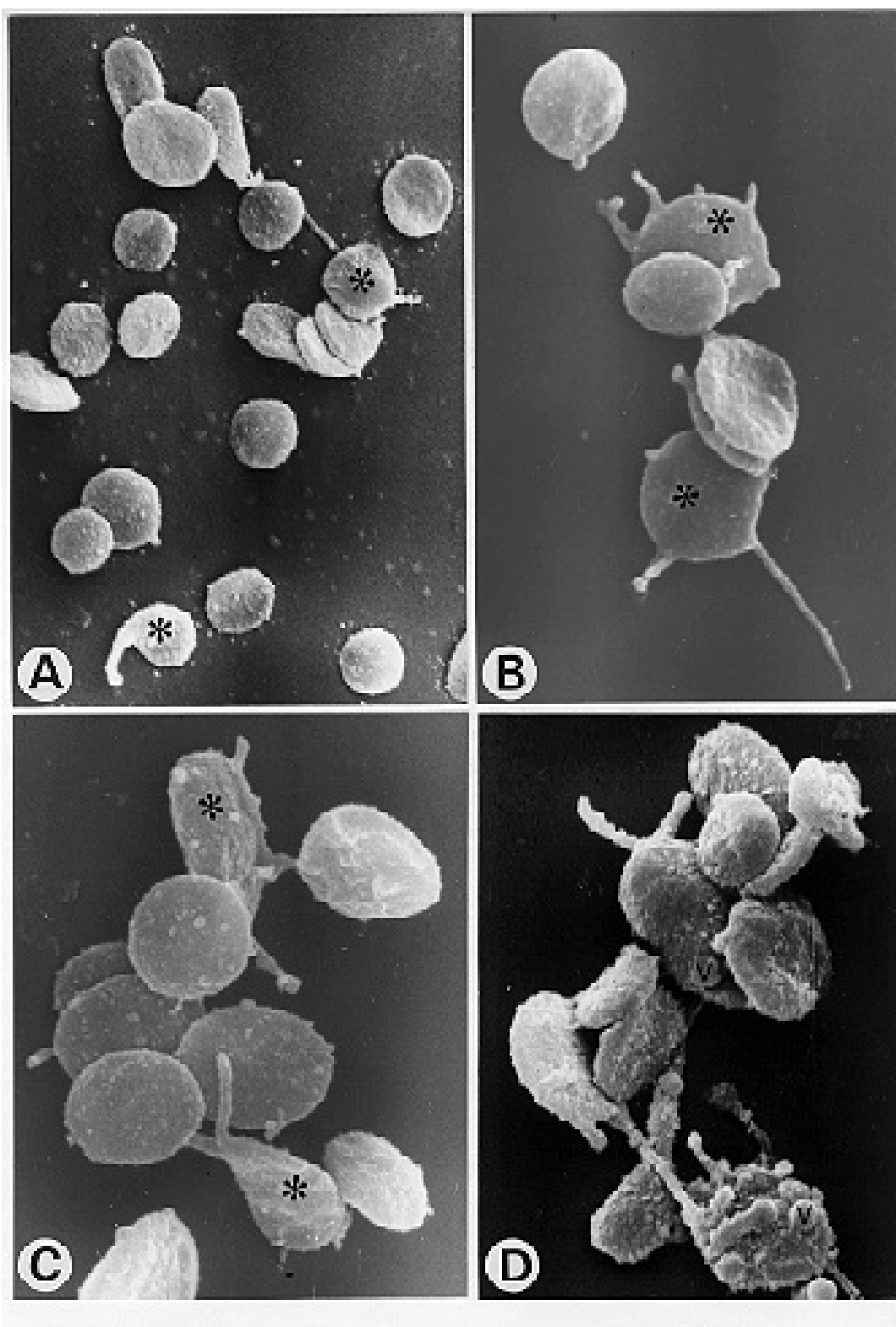
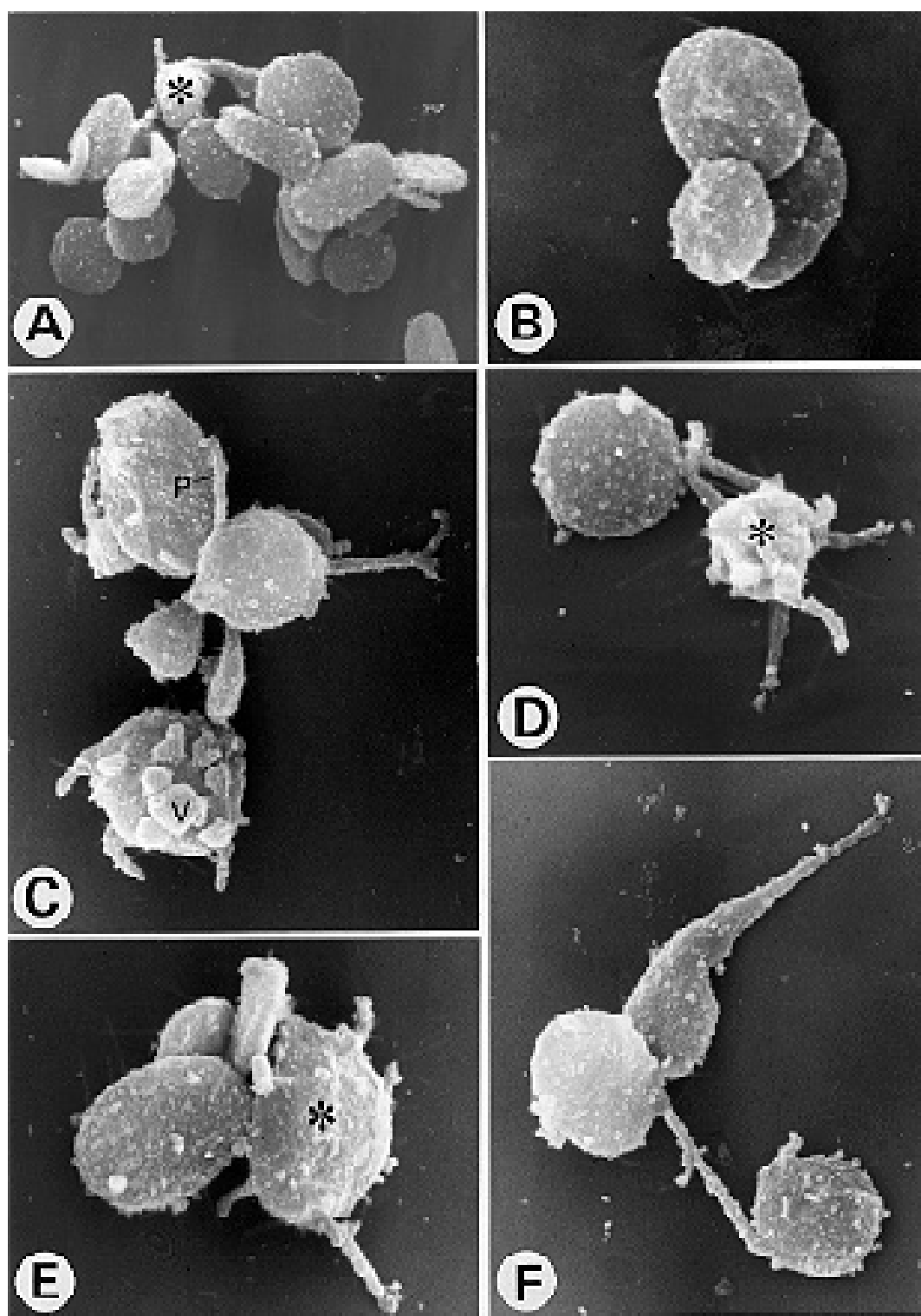


FIGURA 7

Ultra-estrutura (MEV) de plaquetas, de voluntários adultos, portadores de Aterosclerose Obliterante Periférica (GAOP)

- A-** Aspecto geral de plaquetas, a maioria com forma discóide normal e superfície regular; notar raras plaquetas (*) com emissão de pseudópodes (6.000 X).
- B-** Detalhe de plaquetas com forma discóide e superfície regular (11.000 X).
- C-** Plaquetas exibindo diferentes formas, pela emissão de pseudópodes (P) e de microvesículas (V), em grande quantidade (9.600 X).
- D-** Plaqueta com forma normal, contrastando com outra bastante irregular (*), pela presença de pseudópodes (12.000 X).
- E-** Detalhe de plaqueta com superfície irregular (*) pela emissão de pseudópodes, ao lado de outra de aspecto normal (11.000 X)
- F-** Plaquetas com forma irregular, com longos pseudópodes (10.600 X).



DISCUSSÃO

A aterosclerose obliterante periférica (AOP) é uma doença que predomina na faixa etária de 50-70 anos atingindo preferencialmente o sexo masculino. A claudicação intermitente é o sintoma patognomônico de doença arterial oclusiva, descrita pela fadiga, dor, cãibra, paralisia ou fadiga de certos músculos durante o exercício, devido ao fluxo sanguíneo ser insuficiente nessa região (Lastória & Maffei 1995). Pacientes portadores de AOP têm comprometimento simultâneo e importante dos setores coronariano e cerebrovascular (Smith *et al* 1990).

O presente trabalho avaliou a ativação plaquetária em pacientes portadores de AOP, no estágio de claudicação intermitente, comparativamente à indivíduos normais, da mesma faixa etária e de faixa etária mais jovem, relacionando este estágio da doença arterial e a idade dos indivíduos com as modificações morfo-funcionais das plaquetas. Para esta avaliação foram investigados parâmetros funcional (agregação plaquetária espontânea) e morfológico das plaquetas (análise ultra-estrutural morfológica e quantitativa).

Os resultados de nosso estudo indicam que, quando comparamos indivíduos sadios e com AOP, não há diferença significativa na APE. Assim, nossos dados apontam para a inexistência de plaquetas ativadas circulantes nos indivíduos, neste estágio da AOP.

A utilização da APE como teste de investigação de atividade funcional de plaquetas associada à diferentes doenças foi usada, em diferentes trabalhos. Wu & Hoak (1976) mostraram que a ocorrência de APE foi significativamente maior em diferentes condições clínicas como isquemia cerebral, angina estável, infarto agudo do miocárdio e insuficiência arterial periférica, quando comparada com indivíduos normais de mesma faixa etária. Trip (1990) relacionou positivamente a APE de pacientes sobreviventes ao infarto do miocárdio com a predição de novos eventos coronarianos e mortalidade. Da mesma forma, Gray *et al* (1993) demonstraram, em pacientes com infarto agudo do miocárdio, que a hiper-reatividade plaquetária (avaliada através da APE) foi mais acentuada nos pacientes do que nos indivíduos

normais.

Além da APE, vários são os métodos utilizados nos diferentes trabalhos da literatura para avaliar a ativação plaquetária (Steen & Holmsen 1987, Bianciardi *et al* 1993, Wu 1996, Davi *et al* 1997). A ativação plaquetária em indivíduos normais, avaliada através de dosagens plasmáticas de β TG e FP4 (produtos da reação de liberação plaquetária) mostrou que estes componentes aumentam com a idade (Zahavi *et al* 1980). A função plaquetária estimulada por agonistas encontra-se aumentada com a idade em indivíduos normais (Johnson *et al* 1975, Chao *et al* 1982, Vericel *et al* 1988), ou quando existem fatores de risco para doenças cardiovasculares, como diabetes (Fritschi *et al* 1984, Rao *et al* 1984), hipertensão (Markel *et al* 1983), fumo (Rival *et al* 1987) ou hipercolesterolemia (Tremoli *et al* 1984, Aviram *et al* 1985).

Não existem, na literatura, trabalhos relacionando a APE com a idade dos indivíduos; a maioria das publicações apresenta como integrantes do grupo controle indivíduos sadios, da mesma faixa etária dos pacientes (Hoogendijk *et al* 1979, Lupu *et al* 1988, Gray *et al* 1993, Noris *et al* 1993).

A inclusão do grupo de indivíduos mais jovens (GC1) em nosso estudo foi devido à hipótese levantada de que a idade poderia ter influência na função plaquetária.

Os estudos da ativação plaquetária em pacientes com AOP são escassos. Reininger *et al* (1996) detectaram que tanto a APE quanto à agregação estimulada por agonista eram alteradas em pacientes com AOP, e estas alterações eram mais pronunciadas nos estágios mais avançados da doença, quando comparado com indivíduos normais de mesma faixa etária, ou de faixa etária mais jovem.

Estes resultados são divergentes dos dados de nosso trabalho, pois os resultados da APE não mostraram diferença estatisticamente significativa entre os grupos estudados; verificou-se, entretanto, diferença morfológica importante entre os indivíduos com idade inferior a 50 anos e os de idade superior a 50 anos, portadores ou não de AOP.

Embora nossa casuística seja pequena, houve discrepância nos resultados

verificados entre APE e a análise à MEV, indicando a possibilidade de ser a avaliação morfológica mais sensível do que a funcional.

Um outro estudo utilizando método diferente, comparando pacientes com doença arterial periférica severa e indivíduos sadios de mesma faixa etária, não mostrou diferença estatisticamente significativa na expressão basal da P-selectina (por citometria de fluxo), ou da dosagem de β TG plasmática entre os grupos; porém, quando as plaquetas dos controles foram estimuladas “in vitro” com ADP, agregavam mais do que as dos pacientes, mostrando que nos indivíduos normais as plaquetas são mais responsivas do que nos doentes, onde a presença da aterosclerose prejudica a resposta à estimulação (Galt *et al* 1991).

Outros estudos da ativação plaquetária favorecem esta hipótese. Knight *et al* (1997) estudaram a ativação plaquetária e a resposta a agonistas fisiológicos (trombina e ADP) em pacientes com doença arterial coronariana e angina estável, através da citometria de fluxo em sangue total. Os resultados mostraram que, tanto a ligação do fibrinogênio (precursor da agregação plaquetária) induzida por agonista, como a expressão da P-selectina (marcador de desgranulação plaquetária), foram estatisticamente significativos em indivíduos normais jovens, quando comparados com aqueles de idade avançada ou em pacientes.

Há evidência, “in vitro”, de que as plaquetas expostas a agonistas fisiológicos como a trombina, são dessensibilizadas a um subsequente estímulo a este agonista (Hallam *et al* 1982). Assim, em nosso trabalho, as plaquetas dos pacientes (GAOP) poderiam exibir fenômeno similar “in vivo”, sendo menos ativáveis por estarem em contato constante com trombina, mesmo que em baixos níveis, induzida pela superfície endotelial comprometida pela aterosclerose. Outra explicação possível para nossos achados, seria de que estas plaquetas hiper-responsivas pudessem ter sido removidas da circulação, através de ligação a células endoteliais, leucócitos ou assimiladas dentro de trombos, permanecendo, na circulação, as plaquetas hipor-responsivas.

Os parâmetros clínicos avaliados na caracterização dos grupos; as medidas de pressões e intensidade de pulsos periféricos encontravam-se dentro dos limites previstos para AOP, no estágio de claudicação intermitente.

Para a caracterização dos grupos de voluntários normais e pacientes, a observação dos critérios de inclusão e exclusão se fez necessária.

Com relação aos diabéticos, tomou-se o cuidado de excluí-los, pois o diabetes representa como fator de risco para a doença cardiovascular, especialmente no que diz respeito à função plaquetária e à interação plaqueta-endotélio (Cowell *et al* 1976, Bern 1978, Mustard & Packham 1984, Winocour *et al* 1986). Numerosos estudos “in vitro” têm demonstrado que plaquetas de diabéticos mostram sensibilidade aumentada, tanto para APE (Bredin *et al* 1976), como para agregação estimulada por agonistas (Cowell *et al* 1976, Bern 1978, Mustard & Packham 1984, Winocour *et al* 1986). Esta ativação plaquetária pode desempenhar papel importante no desenvolvimento da microangiopatia diabética associada com complicações vasculares (Winocour *et al* 1986).

No grupo GAOP, encontrou-se valor de 126mg% para taxa de glicose, em dois pacientes que não referiram diagnóstico ou história de diabetes. Incluímos, entretanto, estes doentes no grupo GAOP, porque, embora o valor estipulado para taxa de glicose em indivíduos normais seja de 70 a 110mg%, valores compreendidos entre 110 e 126mg% não são considerados anormais (Gavin *et al* 1997). Os resultados dos testes de função plaquetária destes doentes não foram diferentes dos demais pacientes do grupo.

Outros fatores de risco para doença cardiovascular foram também investigados, nos indivíduos utilizados em nosso estudo. As dosagens de HDL foram mais baixas no grupo de pacientes com AOP, quando comparadas com os outros grupos. Estes resultados concordam com os dados da literatura que mostram ser as baixas concentrações de HDL um fator de risco para a claudicação intermitente (Johansson *et al* 1993).

No grupo de pacientes investigados (GAOP), a dosagem de fibrinogênio plasmático não foi diferente do grupo controle de mesma faixa etária (GC2). Este dado tem sido confirmado em literatura para a claudicação intermitente (Dormandy *et al* 1973). O fibrinogênio é uma molécula multifuncional, que além de substrato para a trombina na formação de fibrina, é proteína adesiva para a agregação plaquetária (Wu 1996). O nível aumentado de fibrinogênio plasmático, de acordo com dados da literatura, está associado a outros fatores de risco como o fumo, a dieta e a idade (Montalescot *et al* 1998). Em nosso trabalho os níveis de fibrinogênio estavam aumentados nos pacientes com AOP com relação aos grupos controles, porém, apenas estatisticamente significativo quando comparado com o grupo de indivíduos mais jovens (GC1).

Na tentativa de obter-se um parâmetro morfológico que pudesse indicar ativação plaquetária, as alterações na forma das plaquetas circulantes foram avaliadas, não só qualitativamente mas também pela análise morfométrica. O uso de critério morfométrico se fez necessário, uma vez que o qualitativo é subjetivo, necessitando de quantificações para melhor definir anomalias plaquetárias em diversas doenças (Payne & Glasser 1986).

Entre os parâmetros morfológicos e morfométricos descritos para a ativação plaquetária, a mudança de forma tem sido apontada como um indicativo precoce de alteração plaquetária (Steen & Holmsen 1987). Esta possível mudança de forma plaquetária foi analisada, em nossos materiais, tanto à MET como à MEV.

Nas fotomicrografias de cortes de plaquetas, à MET, a mudança de forma pode ser avaliada através das medidas de área, perímetro e do fator forma (FF) que correlaciona estes dois parâmetros (Roger *et al* 1992, Bianciardi *et al* 1993, Reverter *et al* 1994). O FF fornece dados precisos de irregularidades da forma; num círculo perfeito o valor do FF é igual a 1, enquanto desvios do círculo resultam em FF menores, e estruturas muito irregulares resultam em FF próximos de zero (Reverter *et*

al 1994).

Através da morfometria, não se observou diferença entre plaquetas dos diferentes grupos estudados. Assim, os valores obtidos com o FF, em plaquetas de pacientes portadores de AOP não foram estatisticamente diferentes daqueles dos indivíduos normais; também não foi observado variação na forma das plaquetas que pudesse ser correlacionada com a faixa etária dos indivíduos.

Quando se analisaram fotomicrografias obtidas à MEV, encontrou-se diferença na porcentagem de plaquetas com sinais de ativação entre os voluntários jovens (GC1) e aqueles dos outros grupos estudados (GC2 e GAOP). Estes resultados indicam que as plaquetas de indivíduos jovens encontravam-se mais reativas do que aquelas dos indivíduos dos outros grupos, inclusive daqueles com doença arterial.

Do ponto de vista qualitativo, não foi possível diferenciar plaquetas de indivíduos dos diferentes grupos investigados, à MET e MEV. De maneira geral, encontraram-se plaquetas com ultra-estrutura normal, ao lado de outras com diferentes sinais de alterações como mudança de forma, emissão de pseudópodes e microvesículas (MET e MEV), dilatação do SCA e centralização/liberação de grânulos (MET). Estes achados são classicamente referidos como sinais de ativação plaquetária, em inúmeros trabalhos da literatura (Puri *et al* 1994, Cañizares *et al* 1994, Kim *et al* 1995, Siljander *et al* 1996).

Na tentativa de diferenciar as plaquetas dos indivíduos dos diferentes grupos estudados, do ponto de vista qualitativo, foi realizada a análise morfológica ultra-estrutural de amostras plaquetárias de indivíduos escolhidos ao acaso, processados segundo técnica do ZIO. Mesmo com esta técnica não observamos diferenças entre os grupos estudados.

O que esta análise possibilitou foi a evidência clara de complexos de Golgi bem desenvolvidos, em plaquetas de todos os grupos estudados; cabe frisar que os complexos de Golgi também puderam ser observados nas preparações convencionais, mas de maneira mais discreta. Ficou evidente que o Golgi das plaquetas humanas é

constituído de inúmeras cisternas empilhadas com vesículas e vacúolos adjacentes. Raras são as descrições de complexos de Golgi em plaquetas humanas, sendo pouco comentado sobre o seu papel na fisiologia plaquetária (Pujol-Moix 1995). Estudo realizado em plaquetas bovinas, ativadas pelo PAF e inibidas parcialmente por Cetoprofeno, mostraram alterações morfológicas no complexo de Golgi: com infusão do ativador, o Golgi foi mais freqüentemente visível, concomitante com outras alterações relacionadas à ativação plaquetária tais como forma irregular, emissão de pseudópodes e número de grânulos diminuído; com a infusão do inibidor antes do ativador, as alterações morfológicas das plaquetas foram limitadas, e o complexo de Golgi era raramente visível (Bastos da Silva *et al* 1997).

Os achados de complexo de Golgi em plaquetas humanas no presente estudo, em todos os grupos estudados, não apontam para uma relação de sua presença com ativação plaquetária, verificada pela observação à MEV, no grupo GC1. Sua presença constante nas plaquetas, entretanto, sugere que esta estrutura ainda realiza processamento de materiais sintetizados pela célula de origem, não sendo meros fragmentos citoplasmáticos de megacariócitos, com produtos previamente processados, estocados e subdivididos nos seus fragmentos. Sendo assim, as plaquetas poderiam ter a qualidade de seus conteúdos afetada por estes processamentos decorrentes das atividades do complexo de Golgi, mesmo depois de liberadas na circulação.

CONCLUSÕES

Tendo em vista a metodologia utilizada e os resultados obtidos pudemos concluir:

- ◆ As plaquetas circulantes dos pacientes portadores de AOP não mostraram alterações funcionais ou morfológicas, quando comparadas às dos indivíduos normais da mesma faixa etária.
- ◆ A frequência de plaquetas circulantes com alteração de forma, em preparações de MEV, foi maior nos indivíduos normais com idade inferior a 50 anos, sugerindo haver influência da idade na função plaquetária.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J., RALF, M., ROBERTS, K., WATSON, J.D. Tráfego de vesículas nas vias secretora e endocítica. In: ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J., RALF, M., ROBERTS, K., WATSON, J.D. (Eds.) *Biologia molecular da célula*. Porto Alegre: Artes Médicas, 1997. p. 599-651.
- ARMITAGE, J.O., GOEKEN, J.A., FEAGLER, J.R. Spurious elevation of the count in acute leukemia. *JAMA*, v. 239, p. 433-4, 1978.
- AVIRAM, M., WINTERSTEIN, G., BROOK, J.G. Differencial effect of platelet inhibition in normal and in hipercholesterolaemic subjects. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, v. 19, p. 715-9, 1985.
- BASTOS DA SILVA, M., DESSY C., DAVID, J.L., LEKEUX, P. Morphological alterations of blood platelets induced by platelet activating factor (PAF) and partial inhibition by ketoprofen in calves. *Vet. Res.*, v. 28, p. 489-502, 1997.
- BENNET, J.S., VILARIE, G. Exposure of platelet fibrinogen receptor by ADP and epinephrine. *J. Clin. Invest.*, v. 64, p. 1393-401, 1979.
- BERN, M.M. Platelet functions in diabetes mellitus. *Diabetes*, v. 27, p. 342-50, 1978.
- BIANCIARDI, G., TANGANELLI, P., WEBER, G. New perspectives from ultrastructural morphometry. *Semin. Thromb. Hemost.*, v. 19, p. 108-14, 1993.
- BORN, G.V.R. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature*, v. 194, p. 927-8, 1962.
- BRASS, L.F. The biochemistry of platelet activation. In: HOFFMAN, R., BENZ, E.J., SHATTIL, S.J., FURIE, B., COHEN, H.J. (Eds.) *Hematology: basic principles and practice*. New York: Churchill Livingstone, 1991. p. 1176-97.
- BRASS, L.F., MANNING, D.R., SHATTIL, S.J. GTP-binding proteins and platelet activation. In: COLLIER, B.S. (Ed.) *Progress in hemostasis and thrombosis*. Philadelphia: WB Saunders, 1991. v. 10, p. 127-74.
- BREDIN, K., GRUN, H., KRZYWANIEK, H.R. On the measurements of spontaneous platelet aggregation: the platelet aggregation test III. Methods and first clinical results. *Thromb. Haemost.*, v. 35, p. 669-91, 1976.
-
- UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA. Coordenadoria Geral de Bibliotecas. *Normas para publicações da UNESP*, 1994. v.2: Referências Bibliográficas.
- NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE. *List of journals indexed in Medicus*. Washington, 1997. 240p

- CANIZARES, C., VIVAR ,N., HERDOIZA, M. Role of the microtubular system in platelet aggregation. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v. 27, p. 1533-51, 1994.
- CHAO, F.C., TULLIS, J.L., ALPER, C.A., GLYNN, R.J., SILBERT, J.E. Alteration in plasma proteins and platelet functions with aging and cigarette smoking in healthy men. *Thromb. Haemost.*, v. 47, p. 259-64, 1982.
- CIMMINIELLO, C., ARPAIA, G., ALOISIO, M., UBERTI, T., ROSSI, F., POZZI, F., BONFARDECI, G. Platelet-derived growth factor (PDGF) in patients with different degrees of chronic arterial obstructive disease. *Angiology*, v. 45, p. 289-93, 1994.
- COLMAN, R.W. Surface mediated defense reactions. The plasma contact activation system. *J. Clin. Invest.*, v. 73, p. 1249-53, 1984.
- COWELL , J.A., HALUSHIKA, P.V., SARII, K., LEVINE, J., SAGE, J., NAIR, R.M.G. Altered platelet formation in diabetes mellitus. *Diabetes*, v. 25, p. 28826-31, 1976.
- CRISTALLI, G., MILLS, D.C. Identification of a receptor for ADP on blood platelets by photoaffinity labeling. *Biochem. J.*, v. 291, p. 875-81, 1993.
- DAVI, G., GRESELE, P., VIOLI, F., BASILI, S., CATALANO, M., GIAMMARRESI, C., VOLPATO, R., NENCI, G.G., CIABATTONI, G., PATRONO, C. Diabetes mellitus, hypercholesterolemia, and hypertension but not vascular disease per se are associated with persistent platelet activation in vivo. *Circulation*, v. 96, p. 69-75, 1997.
- DAVIES, M.J., THOMAS, A.C. Thrombosis and acute coronary - artery lesions in sudden cardiac death. *N. Engl. J. Med.*, v. 310, p. 1137-40, 1984
- DAVIES, M.J., THOMAS, A.C., KNAPMAN, P.A., HANGARTNER, J.R. Intramiocardial platelet aggregation in patient with instable angina suffering sudden cardiac death. *Circulation*, v. 73, p. 418-27, 1986.
- DE CHAFFOY, D.E., COURCELLES, D., LEYSEN, J.E., DE CLERCK, F. Evidence that phospholipid turnover in the signal transducing system is coupled to serotonin S₂ receptor sites. *J. Biol. Chem.*, v. 260, p. 7603-8, 1985.
- DERANLEAU, D.A., DUBLER, D., RHOTEN, C., LUSCHER, F.E. Transient kinetics of the rapid shape change of unstirred human platelets stimulated with ADP. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 79, p. 7297-301, 1982.

- DORMANDY, A., HOARE, E., KHATTAB, A.H., ARROWSMITH, D.E., DORMANDY, T.L. Prognostic significance of rheological and biochemical findings in patients with intermittent claudication. *Br. Med. J.*, v. 4, p. 581-3, 1973.
- FALK, E. Plaque rupture with pre-existing stenosis precipitating coronary thrombosis. Characteristics of coronary atherosclerotic plaques underlying fatal occlusive thrombi. *Br. Heart J.*, v. 50, p. 127-34, 1983.
- FALK, E. Unstable angina with fatal outcome dynamic coronary thrombosis leading to infarction and /or sudden death. Autopsy evidence of recurrent mural thrombosis with peripheral embolization culminating in total vascular occlusion. *Circulation*, v. 71, p. 699-708, 1985.
- FISHER, L.D., BELLE, G.V. *Bioeststatistics*. a methodology for the health sciences. New York: Wiley-Interscience, 1993. p. 991.
- FITZGERALD, D.J., ROY, L., CATELA, F., FITZGERALD, G.A. Platelet activation in instable coronary disease. *N. Engl. J. Med.*, v. 315, p. 983-89, 1986.
- FRITSCHI, J., CHRISTE, M., LÄMMLE, B., MARBET, G.A., BERGER, W., DUKERT, F. Platelet aggregation, beta-thromboglobulin and platelet factor 4 in diabetes mellitus and in patient with vasculopathy. *Thromb. Haemost.*, v. 52, p. 236-39, 1984.
- FROJMOVIC, M.M., PANJUWANI, R. Geometry of normal mammalian platelets by quantitative microscopic studies. *Biophys J.*, v. 16, p. 1071-89, 1976.
- GALT, S.W., MC DANIEL, M.D., AULT, K.A., MITCHAEAL, J., CRONENWETT, J.L. Flow cytometric assessment of platelet function in patients with peripheral arterial disease. *J. Vasc. Surg.*, v. 14, p. 747-56, 1991.
- GAVIN, J.R., ALBERTI, K.G.M.M., DAVIDSON, M.B., DEFRONZO, R.A., DRASH, A., GABBE, S.G., GENUTH, S., HARRYS, M.I., KAHN, R., KEEN, H., KNOWLER, W.C., LEOVITZ, H., MACLAREN, N.K., PALMER, J.P., RASKIN, P., RIZZA, R.A., STERN, M.P. Report of the Expert Committee on the Diagnostic and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*, v. 20, p. 1183-97, 1997.
- GERRARD, J.M., WHITE, J.G. Prostaglandins and thromboxanes: "Middlemen" modulating platelet function in hemostasis and thrombosis. *Prog. Hemost. Thromb.*, v. 4, p. 87-94, 1978.

- GILMAN, A.G. Proteins G: transducers of receptor generated signals. *Ann. Rev. Biochem.*, v. 56, p. 615-49, 1987.
- GRAY, R.P., HENDRA, T.J., PATTERSON, D.L.H., YUDKIN, J.S. "Spontaneous" platelet aggregation in whole blood in diabetic and non-diabetic survivors of acute myocardial infarction. *Thromb. Haemost.*, v. 70, p. 932-6, 1993.
- HALLAM, T.J., RUGGLES, P.A., SCRUTTON, M.C., WALLIS, R.B. Desensibilisation in human and rabbit blood platelets. *Thromb. Haemost.*, v. 47, p. 278-84, 1982.
- HAMBERG, M., SVENSSON, J., SAMUELSSON, B. Thromboxanes: a new group of biologically active compounds derived from prostaglandin endoperoxides. *Proc. Natl. Acad Sci USA*, v.72, p. 2994-8, 1975.
- HARTWIG, J.H. Platelet Morphology. In: LOSCALZO, J., SHAFER, A.I. (Eds.). *Trombosis and Hemorrhage*. 2^o ed. Maryland: Williams & Wilkins – Baltimore, 1998. p. 207-28.
- HOLMSEN, H. Platelet metabolism and activation. *Semin. Haematol.*, v. 22, p. 219-40, 1985.
- HONDA, Z., NAKAMURA, M., MIKI, I., MINAMI, M., WATANABE, T., SEYAMA, Y., OKADO, H., TOH, H., ITO, K., MIYAMOTO, T., SHIMIZU, T. Cloning by functional expression of platelet-activating factor receptor from guinea pig lung. *Nature*, v. 349, p. 342-6, 1991.
- HOOGENDIJK, E.M.G., JENKINS, C.S., VAN WIJK, E.M., VOS, J., TEN CATE, J.W. Spontaneous platelet aggregation in cerebrovascular disease II. *Thromb Haemost*, v. 41, p. 512-22, 1979.
- JOHANSSON, J., EGBERG, N., JOHANSSON, H., CARLSON, L.A. Serum lipoproteins and hemostatic function in intermittent claudication. *Arterioscler. Thromb.*, v. 13, p. 1441-8, 1993.
- JOHNSON, M., RAMEY, E., RAMWELL, PE. Sex and age differences in human platelet aggregation. *Nature*, v. 253, p. 355-7, 1975.
- KAWAKAMI, H., HIRANO, H. Three dimensional reconstruction of the open canalicular system of human platelets by means of high-voltage electron microscopy. *J. Electron. Microsc.*, v. 34, p. 38-41, 1985.
- KENNEY, D.M., LINCK, R.W. The cytoskeleton of unstimulated blood platelets: structure and composition of the isolated marginal microtubular band. *J. Cell. Sci.*, v. 78, p. 1-22, 1985.

- KIM, S.W., RYU, G.H., LEE, I., KOH, J.J., MIN, B.G., LEE, H.K. Adhered platelet morphology in diabetes mellitus. *Diabetes Metab.*, v.21, p. 50-3, 1995.
- KNIGHT, C.J., PANESAR, M., WRIGHT, C., CLARKE, D., BUTOWSKI, P.S., PATEL, D., PATRINELI, A., FOX, K., GOODALL, A.H. Altered platelet function detected by flow cytometry. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, v. 17, p. 2044-53, 1997.
- KRISTENSEN, S.D. The platelet - vessel wall interaction in experimental atherosclerosis and ischaemic heart disease with special reference to thrombopoiesis. *Dan. Med. Bull.*, v. 39, p. 110-27, 1992.
- KROLL, M.H., SULLIVAN, R. Mechanisms of platelet activation . In: LOSCALZO, J. , SHAFER, A.I. (Eds.). *Trombosis and Hemorrhage*. 2.ed. Maryland: Williams & Wilkins-Baltimore, 1998. p 261-91.
- LASTORIA, S, MAFFEI, F.H.A. Aterosclerose Obliterante Periférica (AOP). Etiopatogenia, Fisiopatologia, Patologia e Diagnóstico. In: MAFFEI, F.H.A., 1998. p 261-91.
- LASTORIA, S, MAFFEI, F.H.A., YOSHIDA, W.B., ROLLO, H.A.(eds). *Doenças vasculares periféricas*. 2.ed. São Paulo: MEDSI, 1995. p. 419-440.
- LOPES, A.A., MAEDA, N.Y., ALMEIDA, A., JAEGER, R., EBAID, M., CHAMONE, D.F. Circulating platelet aggregates indicative of in vivo platelet activation in pulmonary hypertension. *Angiology.*, v. 44, p. 701-6, 1993.
- LUPU, F., CALB, M., FIXMAN, A. Alterations of phospholipid asymmetry in the membrane of spontaneously aggregated platelets in diabetes. *Thromb. Res.*, v. 50, p. 605-16, 1988.
- MARKEL, A., BROOK, J.G., LEVY, Y., AVIRAM, M., YAUDIIM, M.B.H. Increased platelet adhesion and aggregation in hypertensive patients: effects of atenolol. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, v. 16, p. 663-8, 1983.
- MONCADA, S, VANE, J.R. Pharmacology and endogenous roles of prostaglandin endoperoxides, tromboxane A2 and prostacyclin. *Pharmacol. Rev.*, v. 30, p. 293-331, 1979.
- MONTALESCOT, G., COLLET, J.P., CHOUSSEAT, R., THOMAS, D. Fibrinogen as a risk factor for coronary heart disease. *Eur. Heart J.*, v. 19, p. 11-7, 1998.
- MUSTARD, J.F., PACKHAM, M.H. Platelets and diabetes mellitus. *N. Engl. J. Med.*, v. 311, p. 665-7, 1984.
- NORIS, P., BERTOLINO, G., PREVITALI, M., FERRARIO, M., BALDUINI, C.L. Heparin infusion facilitates “ex vivo” spontaneous platelet aggregation in patients with acute

- myocardial infarction who have undergone thrombolytic therapy. *Haemostasis*, v. 23, p. 185-91, 1993.
- OURIEL, K., DONAYRE, C., SHORTELL, C.K., CIMINO, C., DONNELLY, J., OXLEY, D., GREEN, R.M. The hemodynamics of thrombus formation in arteries. *J. Vasc. Surg.*, v. 14, p.757, 1991.
- PACKHAM, M.A. Methods of detection of hypersensitive platelets. *Thromb. Haemost.*, v. 40, p. 175-95, 1978.
- PAGE, C.P. Platelets as inflammatory cells. *Immunopharmacol.*, v.17, p. 51-7, 1989.
- PARK, K., MAO, F.W., PARK, H. Morphological characterization of surface induced platelet activation. *Biomaterials*, v. 11, p. 24-31, 1990.
- PAYNE, C.M., GLASSER, L. An ultrastructural morphometric analysis of platelet giant and fusion granules. *Blood*, v. 67, p. 299-309, 1986.
- PEROUTKA, S.J. Phylogenetic tree analysis of G protein-coupled 5HT receptors: implications for receptor nomenclature. *Neuropharmacol.*, v. 31, p. 609-13, 1992.
- PHILIPS, D.R., AGIN, P.P. Platelet plasma membrane glycoproteins. *J. Biol. Chem.*, v. 252, p. 2121-6, 1977.
- POLLARD, T.D., MOOSEKER, M.S. Direct measurement of actin polymerization rate constants by electron microscopy of actin filaments nucleated by isolated microvillus cores. *J. Cell. Biol.*, v. 88, p. 654-9, 1981.
- PROGMOVIE, M.M., MILTON, J.G. Human platelet size, shape and related functions in health and disease. *Physiol. Rev.*, v. 62, p. 185, 1982.
- PUJOL-MOIX, N. *Plaquetopenias*. Espanha: Doyma Libros, 1995. p.3-40.
- PURI, V.K., CHANDRA, N., MILLIS, D. Study of platelet ultrastructure in ischemic heart disease. *Indian Heart J.*, v. 46, p. 155-8, 1994.
- RAO, A.K, GOLDBERG, R.E, WASH, P.N. Platelet coagulant activities in diabetes mellitus. Evidence for relationship between platelet coagulant hiperactivity and platelet volume. *J. Lab. Clin. Med.*, v. 103, p. 82-92, 1984.
- RATNOFF, O.D., MENZIE, C. A new method for the determination of fibrinogen in small samples of plasma. *J. Lab. Clin. Med.*, v. 37, p. 316-20, 1951.
- REILLY, I.A.G., FITZGERALD, G.A. Eicosanoid biosynthesis and platelet function with advancing age. *Thromb. Res.*, v. 41, p. 545-54, 1986.

- REINECKE, M., WALTHER, C. Aspects of turnover and biogenesis of synaptic vesicles at locus neuromuscular junctions as revealed by zinc iodine osmium tetroxide (ZIO) reacting with intra vesicular SH groups. *J. Cell. Biol.*, v. 21, p. 839-55, 1978.
- REININGER, C.B., GRAF, A. J., REININGER, A. J., SPANNAGL, M., STECKMEIER, B., SCHWEIBERER, L. Increased platelet and coagulatory activity in peripheral atherosclerosis flow mediated platelet function is a sensitive and specific disease indicator. *Int. Angiol.*, v. 15, p. 335-43, 1996.
- REVERTER, J.C., ESCOLAR, G., SANZ, C., CASES, A., VILLAMOR, N., NIEUWENHUIS, H.K., LÓPEZ, J., ORDINAS, A. Platelet activation during hemodialysis measured through exposure of P- selectin: analysis by flow cytometric and ultrastructural techniques. *J. Lab. Clin. Med.*, v. 124, p. 79-84, 1994.
- RIVAL, J., RIDDLE, J.M., STEIN, P.D. Effects of chronic smoking on platelet function. *Thromb. Res.*, v. 45, p. 75-85, 1987.
- ROGER, M., HUITFELDT, H.S., HOVIG, T. Ultrastructural morphometric analysis of human blood platelets exposed to minimal handling procedures . *Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.*, v. 100, p. 922-9, 1992.
- ROSEMBLUM, W.I. Platelet adhesion and aggregation without endothelial denudation or exposure of basal lamina and/or collagen. *J. Vasc. Res.*, v. 34, p. 409-17, 1997.
- ROSENBERG, S., STRACHER, A. Effect of actin-binding protein on the sedimentation properties of actin. *J. Cell. Biol.*, v. 94, p. 51-5, 1982.
- ROSENBERG, S., STRACHER, A., LUCAS, R.C. Isolation and characterization of actin and actin-binding protein from human platelets. *J. Cell. Biol.*, v. 91, p. 201-11, 1981.
- RUGGERI, Z.M. Mechanisms of shear induced platelet adhesion and aggregation. *Thromb. Haemost.*, v. 70, p. 932-6, 1993.
- SCHOLLMEYER, J.V., RAO, G.H.R., WHITE, J.G. An actin binding protein in human platelets: Interactions with α actinin on gelatin of actin and the influence of cytochalasin B. *Am. J. Pathol.*, v. 93, p. 433, 1978.
- SCRUTTON, M.C., THOMPSON, N.T. Agonists and receptors: serotonin. In: HOLMSEN, H. (Ed.) *Platelet responses and metabolism II. Receptors and metabolism*. Boca Raton: CRC Press, 1986. p. 57-72.

- SHATTIL, S.J. Activation of human platelets by epinephrine. In: INSEL, P. A. (Ed.) *Adrenergic receptors in man*. New York: Marcel Dekker, 1987. p. 303-53.
- SHEETZ, M.P. Microtubule motor complexes moving membranous organelles. *Cell. Struct. Funct.*, v. 211, p. 369-73, 1996.
- SIESS, W. Molecular Mechanisms of platelet activation. *Physiol. Rev.*, v. 69, p. 58-178, 1989.
- SILJANDER, P., CARPEN, O., LASSILA, R. Platelet-derived microparticles associate with fibrin during thrombosis. *Blood*, v. 97, p. 465-63, 1996.
- SIMS, P.J., WIEDMER, T., ESMON, C.T., WEIS, H.J., SHATTIL, S.J. Assembly of the platelet prothrombinase complex is linked to vesiculation of the platelet plasma membrane. *J. Biol. Chem.*, v. 264, p. 17049-57, 1989.
- STEEN, V.M., HOLMSEN, H. Current aspects on human platelet activation and responses. *Eur. J. Haematol.*, v. 38, p. 383-99, 1987.
- TABLIN, F., TAUBE, D. Platelet intermediate filaments detection of a vimentin like protein in human and bovine platelet. *Cell. Motil. Cytoskeleton.*, v. 8, p. 61-7, 1987.
- TREMOLI, E., MADERNA, P., COLLI, S., MORAZZONI, G., SIRTORI, M., SIRTORI, C.R. Increased platelet sensitivity and thromboxane B₂ formation in Type II hiperlipoproteinaemic patient. *Eur. J. Clin. Invest.*, v. 14, p. 329-33, 1984.
- TRIP, M.D., CATS, V.M., VAN CAPELLE, F.J.L., VREEKEN, J. Platelet hiperreactivity and prognosis in survivors of myocardial infection. *N. Engl. J. Med.*, v. 322, p. 1549-54, 1990.
- VERICEL, E., CROSET, M., SEDIVY, P., COURPRON, P., DECHAVANNE, M., LAGARDE, M. Platelet and aging I- aggregation, arachidonate metabolism and antioxidant status. *Thromb. Res.*, v. 49, p. 331-42, 1988.
- VERSTRAETE, M., VERMYLEN, J. Determinantes celulares químicos e reológicos da Trombose e fibrinólise. In: VERSTRAETE, M., VERMYLEN, J. (Eds.). *Thrombose*. S.Paulo: Editora Sarvier, 1989. p 1-45.
- WEISS, H.J. Platelets and ischaemia heart disease. *N. Engl. J. Med.*, v. 302, p. 225-6, 1980.
- WENCHE, J., HORSTMAN, L.L., PARK, H., MAO, W.W., VALANT, P., AHN, Y.S. Platelet aggregates as markers of platelets activation: characterization of flow cytometric method suitable for clinical application. *Am. J. Hematol.*, v. 57, p. 33-42, 1998.
- WHITE, J.G. Effects of colchicine and vinca alkaloids on human platelets. *Am. J. Pathol.*, v. 53, p. 281-91, 1968.

- WHITE, J.G. Interaction of membrane systems in blood platelets. *Am. J. Pathol.*, v. 66, p. 295, 1972.
- WHITE, J.G. Electron microscopic studies of platelet secretion. *Prog. Hemost. Thromb.*, v. 2, p. 49, 1974.
- WHITE, J.G. Platelet ultrastructure. In: BLOOM, A.L., THOMAS, D.P. (Eds.) *Haemostasis and Thrombosis*. 2^o ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1987. p. 20-46.
- WHITE, J.G. Anatomy and structural organization of the platelet. In: COLMAN, W.R., HIRSH, J., MARDER, J.V., SALZMAN, W.E. (Eds.). *Hemostasis and Thrombosis*. Philadelphia: J.B. Lippincott Company, 1994. p. 397-412.
- WHITE, J.G., KRIVIT, W. An ultrastructural basis for the shape changes induced in platelets by chilling. *Blood*, v. 30, p. 625-35, 1967.
- WILLIAMS, C.E., ENTWISTLE, M.B.P., SHORT, P.E. Platelet function test: a critical review of methods. *Med. Lab. Sci.*, v. 42, p. 262-74, 1985.
- WILLIAMS, M.A. *Quantitative methods in Biology*. Amsterdam: North-Holland Publishing Company, 1977. 234p.
- WINOCOUR, P.D., KINLOUGH-RATHBONE, R.L., MUSTARD, J.F. Pathways responsible for platelet hypersensitivity in rats with diabetes. I Streptozotocin-induced diabetes. *J. Lab. Clin. Med.*, v. 107, p. 148-53, 1986.
- WREEKEN, J., van AKEN, W.G. Spontaneous aggregation of blood platelets as a cause of idiopathic thrombosis and recurrent painful toes and fingers. *The Lancet*, v. 2, p.1394-7, 1971.
- WU, K.K. Platelet activation mechanisms and markers in arterial thrombosis. *J. Int. Med.*, v. 239, p. 17-34, 1996.
- WU, K.K., HOAK, J.C. Spontaneous platelet aggregation in arterial insufficiency: mechanisms and implications. *Thromb. Haemost.*, v. 35, p. 702-11, 1976.
- ZAHAVI, J., ZAHAVI, M. Enhanced platelet release reaction, shortened platelet survival time and increased platelet aggregation and plasma thromboxane B₂ in chronic obstructive arterial disease. *Thromb. Haemost.*, v. 53, p.105-9, 1985.
- ZAHAVI, J., JONES, N.A.G., LEYTON, J., DUBIEL, M., KAKKAR, V.V. Enhanced in vivo platelet "release reaction" in old healthy individuals. *Thromb. Res.*, v. 17, p. 329-36, 1980.
- ZUCKER, M.B., NACHMIAS, V.T. Platelet activation. *Atherosclerosis*, v. 5, p. 2-18, 1985.

RESUMO

FRANCO, EMG. Ultra-estrutura e Função Plaquetária em Indivíduos Normais e Pacientes com Aterosclerose Obliterante Periférica. Botucatu, 2001. 77p. Dissertação (Mestrado em Patologia) – Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

RESUMO :O objetivo do presente estudo foi analisar plaquetas de pacientes do sexo masculino, portadores de aterosclerose obliterante periférica (GAOP) no estágio de claudicação intermitente, comparando-as com grupo controle de indivíduos normais (GC2) do mesmo sexo e faixa etária. As plaquetas foram estudadas do ponto de vista funcional, através da agregação plaquetária espontânea, e morfológico, através da ultra-estrutura e da morfometria plaquetária. Também foram analisadas plaquetas de indivíduos normais, de faixa etária inferior a 50 anos (GC1), para verificar eventual influência do fator idade na função plaquetária. Para a análise morfológica e morfométrica, sedimentos plaquetários foram processados para microscopia eletrônica de transmissão (MET) e varredura (MEV), segundo técnicas convencionais. Para a prova funcional, o plasma rico em plaquetas foi agitado em agregômetro de plaquetas, sem a adição de agonistas. Todos os indivíduos foram avaliados clínica e laboratorialmente. Com relação à função plaquetária, não houve diferença significativa na agregação plaquetária espontânea, entre os grupos analisados ($p>0,05$). A morfometria das plaquetas também não acusou diferença na forma das plaquetas, entre os grupos estudados ($p>0,05$). À MEV, as plaquetas dos indivíduos do grupo GC1 apresentaram frequência de alterações na forma significativamente maior ($42,70\pm4,54$), quando comparadas às dos outros grupos, GC2 ($32,31\pm6,22$) e GAOP ($37,76\pm8,91$), $p>0,05$. A dosagem de fibrinogênio do grupo GAOP ($262,90\pm47,86$) revelou-se significativamente maior que do grupo GC1 ($209,80\pm47,02$), $p>0,05$; a dosagem de HDL colesterol do grupo GAOP ($30,00\pm5,33$) foi significativamente menor que do grupo GC2 ($42,70\pm12,58$), $p>0,05$. Nossos resultados mostram que as plaquetas circulantes dos pacientes portadores de AOP não exibem alterações funcionais ou morfológicas, quando comparadas às dos indivíduos normais da mesma faixa etária; a frequência de plaquetas circulantes com alteração de forma, em preparações de MEV, foi maior nos indivíduos normais com idade inferior a 50 anos, sugerindo haver influência do fator idade na função plaquetária.

Palavras-chave: Plaquetas, Ativação Plaquetária, Aterosclerose Obliterante Periférica, Claudicação Intermitente, Ultra-estrutura, Fator Idade, Morfometria Plaquetária.

ABSTRACT

FRANCO, EMG. Platelet Ultrastructure and Function in Healthy Subjects and in Patients with Peripheral Obliterative Atherosclerosis. Botucatu, 2001. 77p. Dissertação (Mestrado em Patologia) – Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

ABSTRACT: This study aims to analyze the platelets of patients with peripheral obliterative atherosclerosis (POAG), at the intermittent claudication stage and comparing this platelets with the control group of healthy age and sex-matched subjects (CG2). The platelets were studied in relation to: their function, by the spontaneous platelet aggregation, and their morphology, by the platelet ultrastructure and morphometry. We also analyzed the platelets of younger healthy subjects aged less than 50 years (CG1) to find out a probable influence of age factor on platelet function. Morphological and morphometric analyses were performed using platelet pellets processed by transmission electron microscopy (TEM) and scanning electron microscopy (SEM), according to conventional procedures. The functional test was performed using the platelet-rich plasma, mixed in platelet aggregometer without the addition of stimulating agents. All the healthy subjects and patients submitted to clinical and laboratory evaluations. Platelet function did not show significant difference in the studied groups ($p > 0.05$). Platelet morphometry did not show difference in the analysed groups ($p > 0.05$). The CG1 platelets showed major alterations in shape (42.70 ± 4.54) than the other groups: CG2 (32.31 ± 6.22) and POAG (37.76 ± 8.91), $p > 0.05$. The POAG fibrinogen determination (262.90 ± 47.86) was significantly higher than CG1 group (209.80 ± 47.02), $p > 0.05$. The POAG HDL determination (30.00 ± 5.33) was significantly higher than CG2 (42.70 ± 12.58), $p > 0.05$. Our results reveal: the POAG circulating platelets do not show functional or morphological alterations when compared to the age-matched healthy subjects; and the frequency of circulating platelet with alterations in shape using SEM preparations were greater in CG1. This suggests an influence of the age factor on function platelet.

Key words: Platelets, Platelet Activation, Peripheral Obliterative Atherosclerosis, Intermittent Claudication, Ultrastructure, Age Factor, Platelet Morphometry.

APÊNDICE

Valores individuais de Idade e Frequência de Tabagismo.

Nº Indivíduo	Idade			Tabagismo		
	GC1	GC2	GAOP	GC1	GC2	GAOP
1	36	62	61	N	N	N
2	32	61	60	N	N	S
3	31	60	51	S	N	S
4	22	60	76	S	S	N
5	38	60	50	N	S	N
6	35	59	76	N	N	N
7	31	59	58	N	N	S
8	38	71	47	S	S	S
9	33	50	69	N	S	N
10	35	63	70	N	N	N

Valores individuais das dosagens séricas de Glicose

Dosagens de glicose (mg%)			
Nº Indivíduo	Grupo GC1	Grupo GC2	Grupo GAOP
1	87	102	95
2	90	107	110
3	97	95	126
4	89	109	97
5	98	89	95
6	96	103	114
7	98	103	92
8	99	88	96
9	98	88	126
10	100	101	100

Valores individuais das dosagens séricas de Triglicérides

Dosagens de triglicérides (mg%)			
Nº Indivíduo	Grupo GC1	Grupo GC2	Grupo GAOP
1	108	148	116
2	192	164	65
3	60	135	172
4	164	343	142
5	102	47	80
6	67	82	104
7	174	246	131
8	117	65	370
9	120	95	87
10	176	114	82

Valores individuais das dosagens séricas de Colesterol total

Dosagens de colesterol total (mg%)			
Nº Indivíduo	Grupo GC1	Grupo GC2	Grupo GAOP
1	204	224	152
2	182	260	193
3	282	290	216
4	169	247	245
5	161	176	226
6	200	179	181
7	165	246	217
8	191	209	197
9	117	200	176
10	220	251	211

Valores individuais das dosagens séricas de HDL-colesterol

Dosagens de HDL-colesterol (mg%)			
Nº Indivíduo	Grupo GC1	Grupo GC2	Grupo GAOP
1	34	40	32
2	30	40	28
3	38	26	20
4	32	36	36
5	38	34	32
6	26	43	30
7	32	42	38
8	40	48	24
9	45	74	28
10	45	44	32

Valores individuais das dosagens séricas de LDL-colesterol

Dosagens de LDL-colesterol (mg%)			
Nº Indivíduo	Grupo GC1	Grupo GC2	Grupo GAOP
1	148	154	97
2	114	168	152
3	234	237	162
4	104	142	135
5	103	133	178
6	161	120	130
7	165	155	153
8	128	148	99
9	108	107	131
10	140	174	163

Valores individuais das dosagens plasmáticas de Fibrinogênio

Dosagens de fibrinogênio (mg%)			
Nº Indivíduo	Grupo GC1	Grupo GC2	Grupo GAOP
1	214	205	228
2	160	290	314
3	188	188	265
4	229	200	347
5	155	222	300
6	305	200	222
7	172	315	214
8	219	217	205
9	262	288	246
10	194	239	288

Valores individuais das Contagens de Plaquetas no PRP e Porcentagens máximas de Agregação Plaquetária Espontânea

Nº	Nº de plaquetas($\times 10^3/\text{mm}^3$)			% Agregação plaquetária espontânea		
	GC1	GC2	GAOP	GC1	GC2	GAOP
1	400	184	339	9,1	13,6	8,6
2	150	335	490	11,4	9,0	11,8
3	210	300	385	9,5	6,4	11,8
4	300	375	197	13,2	11,4	9,5
5	300	325	425	10,9	14,5	12,3
6	460	310	431	9,1	16,4	20,0
7	300	420	209	14,1	8,2	9,1
8	307	222	139	5,5	9,1	12,7
9	362	420	450	15,9	11,4	10,0
10	380	395	393	11,8	9,1	9,5

Valores médios individuais das Porcentagens de plaquetas ativadas à MEV.

Porcentagem de plaquetas ativadas à MEV			
Nº Indivíduo	GC1	GC2	GAOP
1	35,13	23,93	42,19
2	43,36	41,54	27,14
3	44,59	36,76	29,41
4	42,23	25,00	42,66
5	37,62	28,41	53,06
6	41,86	32,96	35,16
7	46,15	40,00	34,74
8	42,66	32,31	50,00
9	50,74	29,89	
10			

**Valores médios individuais das medidas de Área,
Perímetro e Fator Forma das Plaquetas**

Grupos	Área	Perímetro	Fator forma
GC1			
1	2,8809	8,7345	0,4720
2	3,2525	8,2070	0,5976
3	2,7360	7,8157	0,5566
4	3,0121	8,5383	0,5302
5	3,4917	8,8995	0,5573
6	2,9563	8,1107	0,5666
7	2,9870	8,1930	0,5598
8	3,2380	8,7015	0,5359
9	2,7354	8,3151	0,4994
10	3,3298	9,0898	0,5103
GC2			
1	2,6819	8,3477	0,4790
2	2,8575	7,9080	0,5768
3	1,9211	6,8137	0,5213
4	3,0216	8,8039	0,4819
5	3,0621	8,8058	0,4830
6	3,1432	8,6439	0,5313
7	3,1078	8,4381	0,5443
8	3,5678	9,3360	0,5047
9	2,5561	8,2653	0,4750
10	3,0006	8,4525	0,5347
GAOP			
1	3,0450	7,8676	0,6214
2	3,3522	8,7558	0,5491
3	2,8309	8,0552	0,5774
4	3,3478	9,0629	0,5131
5	4,1114	9,2772	0,6080
6	2,3241	7,3623	0,5306
7	3,7441	9,7202	0,5120
8	3,8322	10,009	0,4852
9	3,5011	9,2068	0,5218
10	2,3024	7,8043	0,4760

Valores individuais de Índices de Pressões e Pulsos Periféricos, das artérias tibiais anteriores e posteriores dos membros inferiores esquerdo e direito.

	Índices de Pressões Periféricas				Pulsos periféricos			
	Ta/mie	Tp/mie	Ta/mid	Tp/mid	Ta/mie	Tp/mie	Ta/mid	Tp/mid
GC1								
1	1,1	1,1	1,1	1,1	4+	4+	4+	4+
2	1,0	1,3	1,0	1,0	4+	4+	4+	4+
3	1,0	1,0	1,0	1,0	4+	4+	4+	4+
4	1,1	1,0	1,0	1,0	4+	4+	4+	4+
5	1,1	1,3	1,1	1,1	4+	4+	4+	4+
6	1,1	1,2	1,1	1,2	4+	4+	4+	4+
7	1,0	1,1	1,0	1,0	4+	4+	4+	4+
8	1,2	1,2	1,2	1,2	4+	4+	4+	4+
9	1,1	1,1	1,1	1,1	4+	4+	4+	4+
10	1,0	1,1	1,1	1,1	4+	4+	4+	4+
GC2								
1	1,2	1,3	1,2	1,3	4+	4+	0	4+
2	1,1	1,1	1,1	1,1	4+	4+	4+	4+
3	1,1	1,1	1,0	1,1	4+	4+	4+	4+
4	1,2	1,3	1,2	1,3	4+	4+	4+	4+
5	1,1	1,1	1,0	1,1	4+	4+	4+	4+
6	1,0	1,0	1,1	1,1	4+	4+	4+	4+
7	1,1	1,1	1,1	1,1	4+	4+	4+	4+
8	1,1	1,1	1,1	1,2	4+	4+	4+	4+
9	1,0	1,0	1,0	1,0	4+	4+	4+	4+
10	1,2	1,1	1,1	1,1	4+	4+	2+	4+
GAOP								
1	0,6	0,8	1,1	1,1	0	0	3+	3+
2	0,6	0,6	0,7	0,5	0	0	1+	0
3	0	0,5	0	0,7	0	3+	4+	4+
4	0,8	0,7	0	0,9	0	4+	0	0
5	0,3	0,4	0,3	0,6	0	0	3+	2+
6	0,8	0,8	0,8	0,8	0	0	0	1+
7	1,0	1,0	0	0,4	3+	0	0	0
8	0,7	0,8	1,0	1,3	0	0	3+	0
9	0,3	0,6	0,6	0,6	0	0	0	2+
10	1,0	1,0	0,6	0,4	4+	4+	0	0

Ultra-estrutura e Função Plaquetária em Indivíduos Normais e Pacientes com AOP									
<u>Grupo</u>		Data ____/____/____							
<u>Dados Pessoais</u>									
Nome:						Registro:			
Idade:			Sexo						
Tabagismo: Sim Não			Quantidade :						
Diagnósticos:		1-			2-				
		3-			4-				
Medicamentos:									
<u>Dados Laboratoriais</u>									
Colesterol Total mg%		HDL mg%		LDL mg%		Triglicérides mg%			
Fibrinogênio Plasmático mg%				Glicemia mg%					
Agregação Plaquetária Espontânea %									
Contagem de Plaquetas no Sangue Total /mm ³									
Contagem de Plaquetas no PRP /mm ³									
<u>Dados Complementares</u>									
			MSD		MSE		MID MIE		
Pressões Periféricas					Tp		Ta Tp T a		
		PA							
		Pulso							
Eletrocardiograma									

FICHA CLÍNICA

Nome (iniciais)**Idade**

Sexo

Rg no HC

Antecedentes pessoais: Hipertensão arterial _ Doença de Chagas _ Sopros cardíacos _.

Dabetes _ Hiperlipidemia _ Reumatismo na infância _ Bronquite crônica _ .

Tabagismo _ Infarto do miocárdio _ Outros _.

Dispnéia: Ausente _ Aos esforços grandes _ Médios _ Pequenos _ Há quanto tempo _ .

Edema de membros inferiores: Ausente _ Presente _ Há quanto tempo _ .

Palpitações: Ausentes _ Presentes _ Em repouso _ Rítmicas _ Arrítmicas _ De início e término súbitos _.

Fraqueza aos esforços: Ausente _ Presente _ Episódios de tontura: Ausentes _ Presentes _ .

Episódios de perda de consciência: Ausentes _ Presentes _ Há quanto tempo _ .

Dor pré-cordial ou retroesternal aos esforços: Ausente _ Presente _ Há quanto tempo _ .

PA braquial em decúbito dorsal:

FC=

$$P \equiv$$

Estase jugular: Ausente _ Presente _ Estertores nas bases pulmonares: Ausente _ Presente _ .

Localização do ictus cardíaco:-----M1: Normal _ Hiperfonética _ Hipofonética _.

P2: Normal _ Hiperfonética _ Hipofonética _ Desdoblada constante _ B3 _ B4 _ .

Sopro sistólico: Foco-----Sopro diastólico: Foco -----.

Hepatomegalia: Ausente _ Presente _ Borda hepática na LHC a _____ cm.

Esplenomegalia: Ausente _ Presente _ Borda esplênica a -----cm.

Sinais de ascite _ Edema de membros inferiores _ Sacral _ .

Observações:

Examinador:

Data: