

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CURSO DE BIOMEDICINA
ESTÁGIO DE PESQUISA E TRABALHO DE
CONCLUSÃO DE CURSO EM BIOMEDICINA**

**PADRONIZAÇÃO DE UMA TÉCNICA PARA
QUANTIFICAR GLICOGÊNIO EM
PLAQUETAS HUMANAS**

DÉBORA SANTOS ROCHA/00191650

Porto Alegre, julho de 2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CURSO DE BIOMEDICINA
ESTÁGIO DE PESQUISA E TRABALHO DE
CONCLUSÃO DE CURSO EM BIOMEDICINA

PADRONIZAÇÃO DE UMA TÉCNICA PARA
QUANTIFICAR GLICOGÊNIO EM
PLAQUETAS HUMANAS

Débora Santos Rocha/00191650

Orientador:

Marcos E. dos Santos Frizzo

Porto Alegre, 2013

ÍNDICE

Resumo.....	ix
I. Introdução.....	04
1. Biologia das plaquetas.....	04
1.1 Metabolismo do glicogênio em plaquetas.....	06
1.2 Patologias associadas: a relevância do glicogênio.....	08
1.3 Técnicas para estudo do glicogênio: breve histórico.....	09
2. Contribuições da técnica proposta.....	10
3. Objetivo do trabalho.....	10
II. Artigo Científico.....	12
III. Conclusões e Perspectivas.....	37
Referências Bibliográficas.....	38
Anexo I (normas da revista “Platelets”).....	40

RESUMO

A função clássica das plaquetas humanas tem sido relacionada com a hemostase, entretanto, demonstrou-se que esta é apenas uma das inúmeras funções destas células. Elas contêm maquinaria disponível para síntese e degradação de glicogênio e esses processos são sensíveis ao ambiente extracelular. A quantidade dessa molécula e a atividade das enzimas envolvidas em seu metabolismo, como a glicogênio sintase cinase-3B (GSK3 β) têm sido discutidas em inúmeras patologias, como transtorno depressivo, diabetes, doença de Alzheimer. Assim, métodos de determinação de glicogênio seriam de grande auxílio na investigação destas desordens. Um dos métodos mais utilizados para essa determinação é a técnica do ácido periódico de Shiff (PAS), que tem sido de suma importância para o estudo do metabolismo energético e da estrutura plaquetários. Entretanto, esta técnica permite apenas uma análise semiquantitativa, o que prejudica especialmente a avaliação de discretas alterações neste conteúdo. Outro método utilizado é a avaliação da atividade da enzima GSK3 β , porém essa estratégia, mesmo que bastante sensível, pode sofrer influências ainda não descritas em plaquetas. Sendo assim, o objetivo deste trabalho é estabelecer uma técnica para determinação quantitativa das reservas de glicogênio em plaquetas humanas.

O sangue foi coletado por venopunção, no Hemocentro do Hospital de Clínicas de Porto Alegre a partir de doadores saudáveis (CEP/HCPA 110565), em tubos EDTA-K3. Das amostras foi obtido o plasma rico em plaquetas (PRP). Após, foram feitos alguns ajustes na técnica descrita por Van Handel (1965), utilizada para pequenos tecidos e que tem como princípio a extração e hidrólise do polímero à glicose livre. Por fim, foi feita a reação de determinação de glicose e a detecção por espectrofotômetro (505nm).

O valor médio encontrado foi de $0,108 \pm 0,058 \mu\text{g}/10^6$ plaquetas (n=39). Adicionalmente, verificamos uma positiva e moderada correlação entre a glicose plasmática e os níveis de glicogênio plaquetário (r=0,74).

Diante dos resultados apresentados, foi possível padronizar um método para quantificar o glicogênio de plaquetas humanas, ajustando a quantidade do polímero pelo número de células. O método demonstrou ser simples e sensível e será importante para futuros estudos de metabolismo energético, tendo uso potencial nas investigações de diversas patologias.

I. INTRODUÇÃO

1 Biologia das plaquetas

Plaquetas são células anucleadas encontradas normalmente no sangue humano numa densidade de $150-400 \times 10^9/L$ (BRIGGS et al. , 2007). Em condições fisiológicas, têm entre 2 a $5 \mu m$ de diâmetro e volume de 7 a 10 fL. Seu tempo de vida é de 7 a 10 dias, sendo o baço o principal local de remoção e destruição. Através da microscopia eletrônica observa-se que sua superfície apresenta depressões que correspondem ao seu sistema canalicular aberto, responsável pela pronta reatividade destas células ao meio extracelular. Esta capacidade reativa está ligada à sua função clássica na formação do tampão hemostático após a injúria vascular. Quando ativadas, por exemplo, pelo contato com colágeno, ácido araquidônico, cálcio ou ADP, têm sua morfologia modificada e secretam, dentre outros fatores, tromboxanoA2 e ADP na circulação (FAVALORO et al., 2010), ativando outras plaquetas, em especial, pelo receptor GPIIb/IIIa (COLLER; SHATTIL, 2008). Ou seja, após a ativação, seguem-se as fases de iniciação, extensão e perpetuação do tampão hemostático até a contenção do dano e resolução do tampão. Além de sua função clássica na hemostase, plaquetas apresentam semelhanças com células do sistema nervoso central (SNC), tais como a liberação e captação de algumas moléculas que agem como sinalizadores no SNC (GABA, glutamato, serotonina, etc.), além da presença das respectivas proteínas receptoras. Por esta razão, estas células também têm sido utilizadas em estudos que avaliam alterações bioquímicas e farmacológicas presentes em doenças do SNC, agudas e neurodegenerativas (ALIPRANDI et al., 2005; DA PRADA et al. 1988).

Uma peculiaridade morfológica das plaquetas é a presença de grânulos secretores em seu citoplasma: alfa, delta (ou densos) e gama (ou lisossomos). Os grânulos alfa são os mais numerosos e contêm fibrinogênio, fator de crescimento plaquetário, citocinas, moléculas de adesão e moduladores imunológicos. Os grânulos densos estão em menor número e contêm nucleotídeos (ADP e ATP), serotonina, fosfatase, cálcio, glutamato e magnésio. Os grânulos gama contêm hidrolases lisossomais, catepsinas e outras proteínas de membrana lisossômica. Estes grânulos têm importância crucial na função clássica dessa célula e são liberados durante a sua ativação. Também foi descrita a presença de corpos multivesiculares durante o desenvolvimento dos megacariócitos (precursores das plaquetas na medula óssea), que seriam

advindos do Golgi (face trans). Estes corpos são considerados como indicadores dos estágios de maturação dos grânulos (BRIGGS et al. , 2007).

Outro aspecto biológico interessante das plaquetas é que apesar de serem anucleadas e de apresentarem quantidades reduzidas de RNA, estudos de proteômica têm descrito uma expressiva atividade de síntese proteica (GNATENKO et al., 2006). Ou seja, apesar de não ser possível nova transcrição gênica, a presença de mRNA permite que ocorra novo processo de tradução, demonstrando que há capacidade de modulação pós-transcricional.

Recentemente, surgiram evidências de novas funções destas células no organismo, indicando uma participação ativa das plaquetas em diversos eventos. Além da função clássica (hemostase), inúmeros artigos científicos têm demonstrado a participação destas células num amplo espectro de atividades, como a capacidade de secreção de moléculas para a corrente sanguínea e interação com células de outras linhagens, como monócitos, em especial durante a sua ativação (GAWAZ et al., 2005). Um exemplo disso é a sua participação em processos inflamatórios, através de evidências como a presença de receptores toll-like, atuação de receptores de reconhecimento microbiano ou capacidade de interação com as células imunes; ou seja, participando e auxiliando na regulação da resposta imune inata e adaptativa no organismo (WAZNA, 2006; YEAMAN; BAYER, 2013). Estes achados podem ser importantes no entendimento da fisiopatologia de doenças que envolvem o sistema imune e o tecido neuronal.

Outra característica das plaquetas é a presença de poucas mitocôndrias, além de uma estrutura composta por grande quantidade de glicogênio que parece estar associada a uma membrana derivada de um retículo endoplasmático liso. Esta última estrutura é denominada glicosoma, sendo considerada por alguns pesquisadores como uma organela característica de plaquetas. Ainda cabe salientar a importância destas reservas de glicogênio para as plaquetas, as quais parecem ser fundamentais para estas células, sendo mobilizadas para uma variedade de funções, incluindo a da atividade secretória (WHITE, 2013).

Como citado anteriormente, a estrutura e a função plaquetária apresentam peculiaridades que ainda são objeto de investigação. Isso sugere a possibilidade do estudo do metabolismo dessas células através da ação de suas enzimas, do consumo de substratos e da formação de produtos. Entretanto, para a realização destas avaliações são necessárias técnicas que permitam a determinação desses parâmetros nestas células. Em nosso trabalho, o foco foi à padronização da quantificação de um produto do metabolismo energético das plaquetas: o glicogênio.

1.1 Metabolismo do glicogênio em plaquetas

O glicogênio é uma forma de estoque de glicose, sendo a glicogênese correspondente à síntese e a glicogenólise, mobilização dessa molécula. Este polímero é formado por resíduos de glicosil, ligados principalmente por ligações α -1,4 e ramificações α -1,6. A literatura descreve como órgãos de maior concentração desse polímero o fígado e o músculo; sendo que, a glicogênese e a glicogenólise são mais expressivas nesses tecidos. Ainda cabe salientar que as reservas de glicogênio de plaquetas humanas são significativas, sendo equivalentes em quantidade de tecido, às encontradas no músculo esquelético (KARPATKIN, 1967).

A glicogênese requer a fosforilação da glicose que entra na célula. Isso é feito pela hexoquinase IV no fígado e pelas outras isoformas da hexoquinase em outros tecidos. A captação de glicose requer transportadores específicos (do tipo GLUT), que são de vários subtipos e estão distribuídos de maneira distinta nos tecidos do organismo. Os que estão presentes nas plaquetas são GLUT-1 e GLUT-3 (CRAIK et al., 1995), o primeiro é um transportador constitutivo e o segundo, insulina independente.

O glicogênio tem síntese e degradação controladas. As enzimas glicogênio sintase e glicogênio fosforilase têm importante papel regulatório nesse processo, sendo que ambas podem ser reguladas por modulação alostérica e ligação covalente. A glicogênio fosforilase está envolvida na degradação do glicogênio e é ativada por fosforilação, na presença da fosforilase quinase. A fosforilase é ativada na presença de AMP e inibida na presença de glicose e ATP; já que a presença de AMP indica maior demanda energética e, portanto, necessidade de quebra de glicogênio em glicose, e a presença de glicose e ATP indicam uma menor demanda energética e, assim, possibilidade de estoque de glicose na forma do polímero. Além disso, o próprio crescimento da macromolécula realiza retroalimentação negativa, inibindo sua síntese. Em suma, as enzimas glicogênio sintase e glicogênio fosforilase necessitam estar em estados de atividade diferentes para a efetividade dos processos de síntese e mobilização. A glicogênio sintase está envolvida com o desvio da glicose da rota glicolítica, em especial, para a síntese de glicogênio. Intimamente relacionada a essa enzima, está a glicogênio sintase cinase-3B (GSK3 β), que regula a atividade da sintase através de fosforilação, inativando-a e, conseqüentemente, diminuindo sua atividade. Sendo assim, GSK3 β quando ativada fosforila a glicogênio sintase diminuindo a síntese de glicogênio (RYLATT et al., 1980). Todos estes pontos de controle, obviamente, também

sofrem interferências externas ao processo intracelular, como a presença de glucagon, epinefrina e insulina na corrente sanguínea (HARRIS, 2010).

A glicogenólise ocorre de maneira descontínua nas plaquetas, diferentemente da glicogênese, o que leva a algumas hipóteses como a separação das enzimas de quebra do glicogênio em compartimentos ou uma organização diferenciada das ramificações do polímero. Assim como no fígado e no rim, essas células também têm descrita atividade de gliconeogênese, em especial, devido à presença da enzima frutose-1,6-difosfatase, que converte frutose-1,6-bifosfatase a frutose-6-fosfato, sendo que a atividade desta enzima também tem poder limitante na síntese de glicogênio (KARPATKIN et al., 1970). Além disso, a atividade da fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPCK) também é detectável, porém níveis menos expressivos. Ela promove a conversão do oxaloacetato em fosfoenolpiruvato. O fosfoenolpiruvato, por sua vez é transformado em frutose-1,6-bisfosfato por enzimas participantes na glicólise, que catalisam reações reversíveis, podendo operar a via no sentido inverso até a obtenção de glicose (SCHRIJVER et al., 1975).

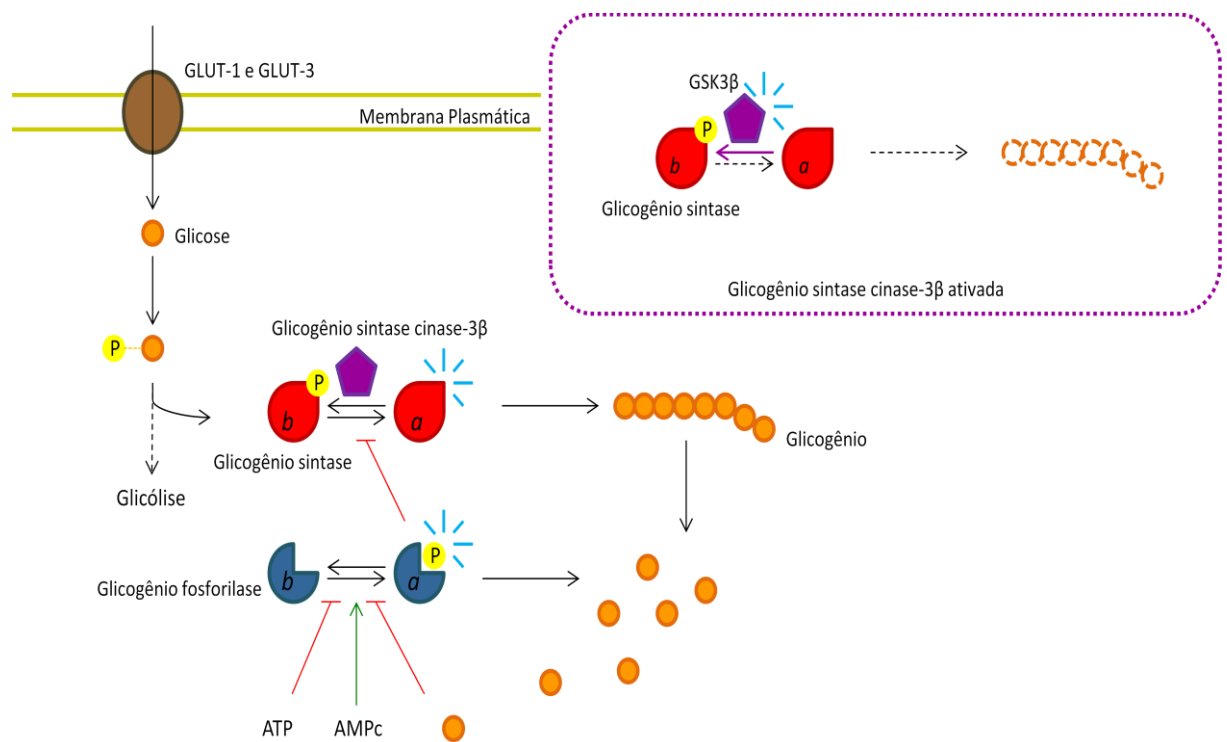


Figura 1. Visão geral do mecanismo de regulação da síntese de glicogênio modulada pela enzima glicogênio sintase cinase-3 β .

Portanto, existe a possibilidade de incorporação de glicose em polímeros de glicogênio através de ligações glicosil α -1,4 e α -1,6, assim como essa molécula tem disponibilidade para degradação e exteriorização através da enzima glicose-6-fosfatase. Esses processos também

sofrem influência direta da concentração de plaquetas, de glicose (KARPATKIN et al., 1970) e de AMPc (SCOTT, 1967); ou seja, são células sensíveis ao ambiente extracelular e, por consequência, às alterações que possam estar presentes neste meio inclusive em algumas patologias descritas posteriormente. Em contrapartida, a presença de trombina, durante a ação pro-coagulante também afeta os níveis das moléculas anteriormente citadas. Sendo assim, tanto o ambiente extracelular é capaz de modificar o metabolismo, quanto à alteração no estado energético, por sua vez, pode interferir na função hemostática dessas células (AKKERMAN et al., 1984).

1.2 Patologias associadas: a relevância do glicogênio

Embora a GSK3 β seja comumente descrita como uma enzima chave em várias cascatas de sinalização, originalmente ela foi identificada como uma enzima chave na regulação da síntese de glicogênio, inativando a glicogênio sintase através de fosforilação (BALARAMAN et al., 2006; CHIN et al., 2005; EMBI et al., 1980; FRIZZO, 2013).

A modificação nos níveis da GSK3 β tem sido observada em inúmeras patologias. Da mesma forma, fármacos utilizados no tratamento das mesmas patologias demonstram alterar os níveis de GSK3 β . Recentemente, foi demonstrado que a quantidade de GSK3 β fosforilada é diferente em relação aos níveis totais de GSK3 β em pacientes com depressão comparados a indivíduos saudáveis (JOAQUIM et al., 2012); além disso, esses níveis totais são maiores nas células sanguíneas de pacientes com depressão (LI et al., 2006).

Na doença de Alzheimer, também foi investigada a alteração na atividade da GSK3 β em plaquetas. Diante de evidências da alteração concomitante da atividade dessa enzima em outras células, como neurônios, sugere-se que essa enzima seja mais um ponto chave para o estudo dessa patologia (LOVESTONE et al., 1994).

Alterações no metabolismo de carboidratos, inclusive do glicogênio, foram descritas nas plaquetas de diabéticos. Nesta patologia, além da diminuição na captação de glicose (LEONCINI et al., 1987), também foi relatado um aumento da atividade da GSK3 β (JOPE et al., 2007), o que sugere uma diminuição do estoque do polímero de glicose, uma vez que a ativação da GSK3 β diminui a atividade da glicogênio sintase. Um argumento importante a ser ressaltado refere-se à contribuição da modificação da atividade ou dos níveis de GSK3 β nas patologias citadas anteriormente. Não há descrição dessas alterações como causas primárias (fatores necessários) ou secundárias (fatores contribuintes) destas patologias, mas apenas como observações simultâneas às desordens aqui abordadas.

1.3 Técnicas para estudo do glicogênio: breve histórico

Dentre os métodos mais utilizados para a determinação de glicogênio, está a técnica descrita por McManus na década de 1940 (MCMANUS, 1946, 1948, 1961). O método utiliza a reação do ácido periódico de Schiff (PAS) e foi empregado por vários autores para identificar o glicogênio em diferentes células (BAUER, 1933; CATCHPOLE, 1947; GERSH, 1947; GIBB; HOTCHKISS, 1948; LILLIE, 1947; MARCHESE, 1947; STOWELL, 1949), tendo sido também de suma importância para o estudo do metabolismo energético e da estrutura plaquetária (AKKERMAN et al. 1984). O método do PAS baseia-se na oxidação dos resíduos de glicose pelo ácido periódico que produz aldeídos livres. Numa segunda reação, o reagente de Schiff revela os aldeídos livres através de uma cor rósea intensa. Entretanto, a técnica de PAS permite apenas uma análise semiquantitativa e, desta forma, o estabelecimento de um método quantitativo para o estudo destas reservas em plaquetas humanas poderia contribuir com futuras investigações relacionadas ao metabolismo do glicogênio nestas células.

Posteriormente, uma técnica para quantificar o glicogênio em pequenas quantidades de tecido hepático de rato foi desenvolvida por Van Handel em 1965. Neste trabalho, o autor determinou quantidades expressivas de glicogênio, próximas a ordem de microgramas. No protocolo, para extração do polímero foi utilizado KOH, seguido pela hidrólise ácida com HCl e posterior determinação da glicose livre pelo uso do reagente de antrona. Entretanto, segundo o próprio autor, a última etapa de reação é limitada pela sensibilidade do reagente (VAN HANDEL, 1965).

Apesar da relevância dos estoques de glicogênio para as plaquetas, a determinação quantitativa dos mesmos não foi objeto de estudo até o momento. Por outro lado, vários trabalhos avaliaram a regulação (ou expressão) da GSK3 β nestas células em diferentes condições (BARRY et al., 2003), tendo em vista que esta enzima tem a capacidade de regular a síntese de glicogênio (RYLATT et al., 1980). A atividade desta enzima tem sido avaliada com a finalidade de caracterizar o metabolismo de carboidratos em plaquetas tanto em indivíduos saudáveis, quanto em indivíduos com patologias como transtorno bipolar, depressão maior, Alzheimer e diabetes. Estes estudos têm demonstrado que essa enzima está alterada nestas patologias. Outro ponto importante, é que o status da mesma parece ser alterado com o tratamento dos pacientes, em especial naqueles com transtorno de humor bipolar [PANDEY et al., 2010]. Recentemente, a quantificação do glicogênio em plaquetas

foi proposta como um indicador rápido e econômico para avaliação do *status* funcional da GSK3 β (FRIZZO, 2013).

2 Contribuições da técnica proposta

A avaliação dos níveis da enzima GSK3 β e/ou a detecção de um produto da atividade desta enzima, como o glicogênio, são ferramentas potencialmente importantes para avaliação do metabolismo celular nas plaquetas. Estas abordagens poderiam, inclusive, servir para a descrição das mudanças desses estoques em indivíduos com as doenças citadas anteriormente bem como a avaliação da efetividade da estratégia terapêutica escolhida para os mesmos. Entretanto, a modulação dessa enzima em plaquetas ainda não é totalmente compreendida. Ou seja, moduladores da GSK3 β em plaquetas podem ter uma ação particular nestas células, e como consequência estar sujeita a uma modulação distinta. Neste sentido, a determinação do metabolismo de carboidratos nessas células poderia ser melhor avaliada pela quantificação de um dos próprios produtos finais dessa enzima: o glicogênio.

A utilização da técnica de PAS tem grande importância por se tratar de um método bastante prático e de baixo custo, porém, os resultados obtidos não podem ser quantificados. Como alternativa, uma adaptação do método de Van Handel poderia solucionar o problema da quantificação do glicogênio de plaquetas. Neste caso específico, substituímos a detecção da glicose livre através do reagente de antrona por um método mais sensível, aumentando significativamente a sensibilidade da detecção.

Outra contribuição de nosso trabalho foi o de realizar o ajuste da quantidade de glicogênio pelo número de células determinadas com o uso de analisador hematológico. Até o momento, os artigos que demonstram a determinação do glicogênio em plaquetas (de forma semiquantitativa) utilizam a técnica de PAS e apresentam a correção da quantidade desta molécula pelo número de células da amostra obtidas através de contagem em câmara de Neubauer.

3 Objetivo do trabalho

O objetivo do nosso trabalho foi padronizar um método para quantificar o glicogênio de plaquetas, corrigindo o valor obtido pelo número de células determinadas de forma

eletrônica. Com este protocolo buscamos uma metodologia mais sensível e simples para o estudo dessa molécula. Potencialmente, o método pode contribuir nos estudos que buscam determinar alterações dos níveis de glicogênio em patologias, bem como naqueles que verificam a efetividade terapêutica de fármacos utilizados no tratamento das doenças aqui descritas.

II. ARTIGO CIENTÍFICO

Padronização de uma técnica para quantificar glicogênio em plaquetas humanas

Débora S. Rocha¹, Samir K. de Souza¹, Roselis S. M. da Silva², Marcos E. Frizzo¹

¹Laboratório 51, Departamento de Ciências Morfológicas, ICBS/UFRGS. Sarmiento Leite 500, Porto Alegre/RS, Brasil.

²Laboratório 10, Departamento de Ciências Morfológicas, ICBS/UFRGS. Sarmiento Leite 500, Porto Alegre/RS, Brasil.

Autor Correspondente: Débora S. Rocha; telefone -555133084536; email 00191650@ufrgs.br; Laboratório 51, Departamento de Ciências Morfológicas, ICBS/UFRGS. Sarmiento Leite 500, Porto Alegre/RS, Brasil.

Palavras-chave: GSK-3B, Transtorno depressivo, Diabetes, Alzheimer

Resumo

A função clássica das plaquetas humanas tem sido relacionada com a hemostase, entretanto, demonstrou-se que esta é apenas uma das inúmeras funções destas células. Elas contêm maquinaria disponível para síntese e degradação de glicogênio e esses processos são sensíveis ao ambiente extracelular. A concentração dessa molécula e a atividade das enzimas envolvidas em seu metabolismo, como a glicogênio sintase cinase-3B (GSK3 β) têm sido discutidas em inúmeras patologias, como transtorno depressivo, diabetes, doença de Alzheimer. Assim, métodos de determinação da concentração de glicogênio seriam de grande auxílio na investigação destas desordens. Um dos métodos mais utilizados para essa determinação é a técnica do ácido periódico de Schiff (PAS), que tem sido de suma importância para o estudo do metabolismo energético e da estrutura plaquetários. Entretanto, esta técnica permite apenas uma análise semiquantitativa, o que prejudica especialmente a avaliação de discretas alterações neste conteúdo. Outro método utilizado é a avaliação da atividade da enzima GSK3 β , porém essa estratégia, mesmo que bastante sensível, pode sofrer influências ainda não descritas em plaquetas. Sendo assim, o objetivo deste trabalho é estabelecer uma técnica para determinação quantitativa das reservas de glicogênio em plaquetas humanas.

O sangue foi coletado por venopunção, no Hemocentro do Hospital de Clínicas de Porto Alegre a partir de doadores saudáveis (CEP/HCPA 110565), em tubos EDTA-K3. Das amostras foi obtido o plasma rico em plaquetas (PRP). Após, foram feitos alguns ajustes na técnica descrita por Van Handel (1965), utilizada para pequenos tecidos e que tem como princípio a extração e hidrólise do polímero à glicose livre. Por fim, foi feita a reação de determinação de glicose e a detecção por espectrofotômetro (505nm).

O valor médio encontrado foi de $0,108 \pm 0,058\mu\text{g}/10^6$ plaquetas (n=39). Adicionalmente, verificamos uma positiva e moderada correlação entre a glicose plasmática e os níveis de glicogênio plaquetário ($r=0,74$).

Diante dos resultados apresentados, foi possível padronizar um método para quantificar o glicogênio de plaquetas humanas, ajustando a concentração do polímero pelo número de células. O método demonstrou ser simples e sensível e será importante para futuros estudos de metabolismo energético, tendo uso potencial nas investigações de diversas patologias.

Introdução

Plaquetas são células anucleadas encontradas normalmente no sangue humano numa densidade de $150-400 \times 10^9/L$ e sua função clássica está ligada à formação do tampão hemostático após a injúria vascular [1]. Um aspecto biológico interessante é que são anucleadas e apresentam quantidades reduzidas de RNA. Ou seja, apesar de não ser possível nova transcrição gênica, a presença de mRNA permite que ocorra novo processo de tradução, demonstrando que há capacidade de modulação pós-transcricional. Outra característica das plaquetas é a presença de poucas mitocôndrias, além de uma estrutura composta por grande concentração de glicogênio que parece estar envolvido por uma membrana derivada de um retículo endoplasmático liso. Esta última estrutura é denominada glicossoma, sendo considerada por alguns pesquisadores como uma organela característica de plaquetas. Ainda cabe salientar que as reservas de glicogênio seriam fundamentais para estas células, sendo mobilizadas para uma variedade de funções, incluindo a da atividade secretória [2].

Recentemente, surgiram evidências de novas funções destas células no organismo, indicando uma participação ativa das plaquetas em diversos eventos. Além da função clássica (hemostase), inúmeros artigos científicos têm demonstrado a participação destas células num amplo espectro de atividades, como a capacidade de secreção de moléculas para a corrente sanguínea e interação com células de outras linhagens, como monócitos, em especial durante a sua ativação [7]. Estes achados podem ser importantes no entendimento da fisiopatologia de doenças que envolvem o sistema imune e o tecido neuronal. Especificamente, apresentam funções semelhantes às células do sistema nervoso central (SNC), tais como a liberação e captação de algumas moléculas que agem como sinalizadores no SNC (GABA, glutamato, serotonina, etc.), além da presença das respectivas proteínas receptoras. Por esta razão,

plaquetas também têm sido utilizadas em estudos que avaliam alterações bioquímicas e farmacológicas presentes em doenças do SNC, agudas e neurodegenerativas [4,5].

Como citado anteriormente, a estrutura e a função plaquetária apresentam peculiaridades que ainda são objeto de investigação. Isso sugere a possibilidade do estudo do metabolismo dessas células através da ação de suas enzimas, do consumo de substratos e da formação de produtos. Entretanto, para a realização destas avaliações são necessárias técnicas que permitam a determinação desses parâmetros nestas células. Em nosso trabalho, o foco foi à padronização da quantificação de um produto do metabolismo energético das plaquetas: o glicogênio.

O glicogênio é uma forma de estoque de glicose, sendo a glicogênese correspondente à síntese e a glicogenólise, mobilização dessa molécula. A literatura descreve como órgãos de maior concentração desse polímero o fígado e o músculo, e ainda cabe salientar que as reservas de glicogênio de plaquetas humanas são significativas, sendo equivalentes em quantidade de tecido, àquelas encontradas no músculo esquelético [6]. A glicogênese requer a fosforilação da glicose que entra na célula. Isso é feito pela hexoquinase IV no fígado e pelas outras isoformas da hexoquinase em outros tecidos. A captação de glicose requer transportadores específicos (do tipo GLUT), que são de vários subtipos e estão distribuídos de maneira distinta nos tecidos do organismo. Os que estão presentes nas plaquetas são GLUT-1 e GLUT-3 [7], o primeiro é um transportador constitutivo e o segundo, insulina independente.

O glicogênio tem síntese e degradação controladas. As enzimas glicogênio sintase e glicogênio fosforilase têm importante papel regulatório nesse processo, sendo que ambas podem ser reguladas por modulação alostérica e ligação covalente. A glicogênio fosforilase está envolvida na degradação do glicogênio e é ativada por fosforilação, na presença da fosforilase quinase. A glicogênio sintase está envolvida com o desvio da glicose da rota glicolítica, em especial, para a síntese de glicogênio. Intimamente relacionada a essa enzima,

está a glicogênio sintase cinase-3B (GSK3 β), que regula a atividade da sintase através de fosforilação, inativando-a e, conseqüentemente, diminuindo sua atividade. Sendo assim, GSK3 β quando ativada fosforila a glicogênio sintase diminuindo a síntese de glicogênio [8]. Todos estes pontos de controle, obviamente, também sofrem interferências externas ao processo intracelular, como a presença de glucagon, epinefrina e insulina na corrente sanguínea [9]. Portanto, existe a possibilidade de incorporação de glicose em polímeros de glicogênio através de ligações glicosil α -1,4 e α -1,6, assim como essa molécula tem disponibilidade para degradação e exteriorização através da enzima glicose-6-fosfatase. Esses processos também sofrem influência direta da concentração de plaquetas, glicose [10] e AMPc [11]; ou seja, são células sensíveis ao ambiente extracelular e, por conseqüência, às alterações que possam estar presentes neste meio inclusive em algumas patologias descritas posteriormente. Em contrapartida, a presença de trombina, durante a ação pro-coagulante também afeta os níveis das moléculas anteriormente citadas. Sendo assim, tanto o ambiente extracelular é capaz de modificar o metabolismo, quanto à alteração no estado energético, por sua vez, pode interferir na função hemostática dessas células [12].

Embora a GSK3 β seja comumente descrita como uma enzima chave em várias cascatas de sinalização, originalmente ela foi identificada como uma enzima chave na regulação da síntese de glicogênio, inativando a glicogênio sintase através de fosforilação [13-16]. A modificação nos níveis da GSK3 β tem sido observada em inúmeras patologias. Da mesma forma, fármacos utilizados no tratamento das mesmas patologias demonstram alterar os níveis de GSK3 β . Recentemente, foi demonstrado que a quantidade de GSK3 β fosforilada é diferente em relação aos níveis totais de GSK3 β em pacientes com depressão comparados a indivíduos saudáveis [17]; além disso, esses níveis totais são maiores nas células sanguíneas de pacientes com depressão [18]. Na doença de Alzheimer, também foi investigada a alteração na atividade da GSK3 β em plaquetas. Diante de evidências da alteração

concomitante da atividade dessa enzima em outras células, como neurônios, sugere-se que essa enzima seja mais um ponto chave para o estudo dessa patologia [19]. Alterações no metabolismo de carboidratos, inclusive do glicogênio, foram descritas nas plaquetas de diabéticos. Nesta patologia, além da diminuição na captação de glicose [20], também foi relatado um aumento da atividade da GSK3 β [21], o que sugere uma diminuição do estoque do polímero de glicose, uma vez que a ativação da GSK3 β diminui a atividade da glicogênio sintase. Um argumento importante a ser ressaltado refere-se à contribuição da modificação da atividade ou dos níveis de GSK3 β nas patologias citadas anteriormente. Não há descrição dessas alterações como causas primárias (fatores necessários) ou secundárias (fatores contribuintes) destas patologias, mas apenas como observações simultâneas às desordens aqui abordadas.

Apesar da relevância dos estoques de glicogênio para as plaquetas, a determinação quantitativa dos mesmos não foi objeto de estudo até o momento. Por outro lado, vários trabalhos avaliaram a regulação (ou expressão) da GSK3 β nestas células em diferentes condições [22], tendo em vista que esta enzima tem a capacidade de regular a síntese de glicogênio [23]. A atividade desta enzima tem sido avaliada com a finalidade de caracterizar o metabolismo de carboidratos em plaquetas tanto em indivíduos saudáveis, quanto em indivíduos com patologias como transtorno bipolar, depressão maior, Alzheimer e diabetes. Estes estudos têm demonstrado que essa enzima está alterada nestas patologias. Outro ponto importante, é que a atividade da mesma parece ser alterado com o tratamento dos pacientes, em especial naqueles com transtorno de humor bipolar [24]. Recentemente, a quantificação do glicogênio em plaquetas foi proposta como um indicador rápido e econômico para avaliação do *status* funcional da GSK3 β [16].

A avaliação dos níveis da enzima GSK3 β e/ou a detecção de um produto da atividade desta enzima, como o glicogênio, são ferramentas potencialmente importantes para avaliação

do metabolismo celular nas plaquetas. Estas abordagens poderiam, inclusive, servir para a descrição das mudanças desses estoques em indivíduos com as doenças citadas anteriormente bem como a avaliação da efetividade da estratégia terapêutica escolhida para os mesmos. Entretanto, a modulação dessa enzima em plaquetas ainda não é totalmente compreendida. Ou seja, moduladores da GSK3 β em plaquetas podem ter uma ação particular nestas células, e como consequência estar sujeita a uma modulação distinta. Neste sentido, a determinação do metabolismo de carboidratos nessas células poderia ser melhor avaliada pela quantificação de um dos próprios produtos finais dessa enzima: o glicogênio.

Dentre os métodos mais utilizados para a determinação de glicogênio, está a técnica descrita por McManus na década de 1940 [25-27]. O método utiliza a reação do ácido periódico de Schiff (PAS) e foi empregado por vários autores para identificar o glicogênio em diferentes células [28-34], tendo sido também de suma importância para o estudo do metabolismo energético e da estrutura plaquetária [35]. Entretanto, a técnica de PAS permite apenas uma análise semiquantitativa e, desta forma, o estabelecimento de um método quantitativo para o estudo destas reservas em plaquetas humanas poderia contribuir com futuras investigações relacionadas ao metabolismo do glicogênio nestas células. Posteriormente, uma técnica para quantificar o glicogênio em pequenas quantidades de tecido hepático de rato foi desenvolvida por Van Handel em 1965. Neste trabalho, o autor determinou quantidades expressivas de glicogênio, próximas a ordem de microgramas. No protocolo, para extração do polímero foi utilizado KOH, seguido pela hidrólise ácida com HCl e posterior determinação da glicose livre pelo uso do reagente de antrona. Entretanto, segundo o próprio autor, a última etapa de reação é limitada pela sensibilidade do reagente [36].

A utilização da técnica de PAS tem grande importância por se tratar de um método bastante prático e de baixo custo, porém, os resultados obtidos não podem ser quantificados.

Como alternativa, uma adaptação do método de Van Handel poderia solucionar o problema da quantificação do glicogênio de plaquetas. Neste caso específico, substituímos a detecção da glicose livre através do reagente de antrona por um método mais sensível, aumentando significativamente a sensibilidade da detecção.

Outra contribuição de nosso trabalho foi o de realizar o ajuste da quantidade de glicogênio pelo número de células determinadas com o uso de analisador hematológico. Até o momento, os artigos que demonstram a determinação do glicogênio em plaquetas (de forma semiquantitativa) utilizam a técnica de PAS e apresentam a correção da quantidade desta molécula pelo número de células da amostra obtidas através de contagem em câmara de Neubauer.

O objetivo do nosso trabalho foi padronizar um método para quantificar o glicogênio de plaquetas, corrigindo o valor obtido pelo número de células determinadas de forma eletrônica. Com este protocolo buscamos uma metodologia mais sensível e simples para o estudo dessa molécula. Potencialmente, o método pode contribuir nos estudos que buscam determinar alterações dos níveis de glicogênio em patologias, bem como naqueles que verificam a efetividade terapêutica de fármacos utilizados no tratamento das doenças aqui descritas.

Material e Métodos

Origem da amostra: O estabelecimento desta técnica é um dos objetivos do projeto “Caracterização de um modelo de plaquetas para estudos *in vitro*” aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (CEP-HCPA 110565, vigente).

Preparação da amostra: O sangue foi coletado por venopunção (8 mL) no Serviço de Hemoterapia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre a partir de 23 doadores saudáveis (não usuários de fármacos) do sexo masculino. O sangue foi coletado em tubos EDTA-K3 e o número de plaquetas determinado através de um analisador hematológico (Micros ES60). Os experimentos foram realizados no Laboratório de Neurobiologia Celular do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (UFRGS) onde foi obtido o plasma rico em plaquetas (PRP).

Avaliação da glicemia: Após a obtenção das amostras de sangue, iniciou-se a separação da fração de eritrócitos e plasma por centrifugação a 380g por 10min. Uma amostra de plasma (50µL) foi transferida para minitubo previamente tratado com NaF 0,1M. A avaliação da glicemia foi realizada no mesmo dia da coleta com o uso do kit Glicose-LaborclinBioliquid.

Técnica de glicogênio: Após a obtenção do PRP, foi adicionado 500 µL KOH (30%) e as amostras foram fervidas por 60 minutos. Em seguida, adicionado 50µl de Na₂SO₄ (35%) e 1 mL de etanol absoluto para permitir a precipitação do polímero. As amostras foram centrifugadas por 10 minutos (2000 rpm). O sobrenadante foi descartado e o precipitado, ressuspenso em água destilada. Foi adicionado 1 mL de etanol absoluto e realizada nova centrifugação. Para a hidrólise do glicogênio, foram adicionados 500 µL de HCl (4M), as amostras foram novamente aquecidas em banho-maria por 60 minutos e neutralizadas ao fim do processo com Na₂CO₃ (2M). Por fim, foi feita a reação de determinação de glicose

conforme indica o kit Glicose-Laborclin Bioliquid e realizada a leitura em espectrofotômetro em 505nm.

Análise estatística: Após a determinação da concentração de glicogênio presente nas amostras, foi feito o teste de Shapiro-Wilk para avaliação da normalidade dos dados. Para verificação de relação entre concentração de glicogênio em plaquetas e glicemia, foi aplicado um teste de correlação simples e considerado o $P < 0,1$ para confiabilidade. Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão da média. Os testes estatísticos foram feitos no programa *Graphpad Prism 6*.

Resultados

Neste estudo foi padronizada uma técnica para determinação quantitativa de glicogênio em plaquetas humanas. Após a extração do glicogênio foi realizada a hidrólise do polímero para obtenção da glicose que foi determinada com o uso de um kit colorimétrico.

Para estabelecer a técnica de obtenção do glicogênio foram utilizadas amostras provenientes de 39 doadores saudáveis. O valor médio de glicogênio obtido nas amostras foi de $0,108 \pm 0,058 \mu\text{g}/10^6$ plaquetas (Figura 1).

Para testar se a obtenção de glicogênio em amostras de PRP poderia ser realizada com um tempo de extração inferior ao proposto no método de Van Handel (1965), foram testadas amostras de quatro doadores diferentes. As amostras de PRP foram submetidas a diferentes tempos de fervura (15, 30, 60 e 90 minutos) em KOH (30%). Na figura 2 é possível notar que não há oscilações significativas na concentração de glicogênio obtida nos diferentes tempos de fervura de amostra de cada doador. A média de glicogênio dos quatro doadores para os tempos estudados foi de $0,112 \pm 0,007$; $0,105 \pm 0,004$; $0,160 \pm 0,007$ e $0,147 \pm 0,009 \mu\text{g}/10^6$ plaquetas, respectivamente para 15, 30, 60 e 90 minutos. Entretanto, as amostras de glicogênio dos doadores 1 e 2 demonstraram ser significativamente diferentes daquelas obtidas dos doadores 3 e 4, segundo o teste ANOVA de duas vias com 95% de confiança. Este resultado pode ser explicado pela origem diversa dos PRPs, as quais continham reservas diferentes de glicogênio.

Com o objetivo de estudar uma possível correlação entre os níveis séricos de glicose das amostras dos doadores e os respectivos valores de glicogênio obtidos, foram estudadas 6 amostras de doadores diferentes. A tabela 1 demonstra os valores médios de glicemia dos doadores e as respectivas médias de glicogênio obtido nas amostras.

Após a obtenção dos dados de glicemia e de glicogênio destes 6 doadores, foi testada a normalidade através do teste de Shapiro-Wilk, a seguir foi realizado um teste de correlação simples. A correlação encontrada entre os dois eventos (glicemia e glicogênio plaquetário) demonstrou ser positiva e moderada ($r=0,74$) (Figura 3).

Discussão

Diante dos resultados apresentados, foi possível padronizar um método para quantificar glicogênio em plaquetas humanas ajustando a concentração do polímero pelo número de células. Até o momento não havia uma técnica descrita para esta finalidade, além disso, a disponibilidade dos artigos que descrevem a detecção direta do polímero, em especial pela técnica de PAS, é limitada, já que são antigos e de difícil acesso eletrônico. Desta forma, estamos apresentando um método atual, simples e sensível que permitirá futuros estudos com essa molécula.

Tendo como base o método descrito por Van Handel [36] para quantificar quantidades pequenas de glicogênio, em outros tipos de amostra, adaptamos a técnica com o objetivo de aumentar a sensibilidade da mesma para o uso em plaquetas. A sensibilidade foi aumentada pelo uso de um kit enzimático na etapa da reação de glicose, o que era uma das limitações do ensaio segundo o autor usado como base, já que o reagente de detecção da glicose livre (resultado da hidrólise ácida do glicogênio) era pouco sensível na época de descrição do método base.

Outra contribuição deste trabalho foi corrigir a concentração de glicogênio obtida na amostra pelo número de células. Existem quatro formas de determinar o número de plaquetas: contagem manual por microscopia de contraste de fase, análise de impedância, análise de fluorescência e imunomarcção por citometria de fluxo. Em nosso trabalho, utilizamos a contagem por bioimpedância do analisador hematológico Micros ES 60, pois este método possui como vantagens diante dos outros métodos maior praticidade; análise concomitante de diversos parâmetros da célula, como volume, variância de volume, percentagem de plaquetas diante do sangue total (plaquetócrito); análise simultânea de outras populações sanguíneas [1].

Na descrição do seu método, Van Handel observou que a fervura com KOH por tempos maiores ou menores que 60 minutos resultava numa menor disponibilidade do polímero para o restante do processo (sulfatação, precipitação, hidrólise e detecção da glicose livre). Ainda segundo o autor, neste caso a quantidade de glicogênio nas amostras era subestimada. Na adaptação do método para uso em plaquetas, decidimos estudar o efeito de diferentes tempos de extração (fervura com KOH) sobre os níveis de glicogênio obtidos, considerando que estas células encontram-se em suspensão e ao contrário das amostras estudadas por Van Handel, não estão aderidas a estruturas de sustentação. Nossos resultados mostraram que não há um tempo de fervura ideal entre 15 e 90 minutos para que ocorra a detecção máxima em amostras de plaquetas, já que não foram observadas diferenças estatísticas entre os tempos estudados, para cada amostra. A origem diferente das amostras (fígado, plaquetas, etc.) poderia explicar as diferenças na determinação da glicose livre para os distintos tempos de extração estudados, uma vez que uma maior ou menor disponibilidade do polímero durante a extração resultaria numa maior ou menor quantidade do mesmo para detecção. Ou seja, o autor trabalhou com amostras integras: com tecido de sustentação, e nosso trabalho utilizou células em suspensão.

No decorrer do trabalho questionamos a possibilidade da existência de uma relação entre os níveis plasmáticos de glicose e a quantidade das reservas de glicogênio nas plaquetas. Para investigar esta hipótese determinamos a glicemia dos doadores e em seguida quantificamos as reservas de glicogênio nos respectivos PRPs obtidos. O resultado da análise indicou uma correlação moderada e positiva entre essas duas variáveis ($r=0,74$). Os resultados obtidos sugerem a necessidade de um estudo mais aprofundado e com um número amostral maior. Neste caso, um eventual aumento do coeficiente de correlação entre a glicemia e o glicogênio plaquetário permitiria uma estimativa dos valores de glicogênio de plaquetas, a partir dos níveis plasmáticos de glicose.

Neste trabalho foram determinadas as reservas de glicogênio de plaquetas de doadores saudáveis. Os dados obtidos serão importantes na utilização desse método em estudos futuros. Além disso, recentemente foi proposto que o glicogênio de plaquetas poderia ser um indicador periférico do status da enzima glicogênio sintase cinase-3 β (GSK3 β) [16]. Variações nos níveis e/ou na atividade desta enzima têm sido relacionadas com inúmeras patologias, como depressão, diabetes e mal de Alzheimer [17-21]. Desta forma, uma possível utilização do método padronizado neste trabalho seria a detecção de um produto da atividade da GSK3 β (o glicogênio). Este uso poderia servir para a descrição das mudanças desses estoques em indivíduos com as doenças citadas anteriormente. Além disso, a modulação dessa enzima ainda não está bem compreendida em plaquetas; quer dizer, moduladores da GSK3 β nessas células, podem ter ação particular e conseqüentemente distinta. Assim, a técnica descrita poderia contribuir como uma ferramenta adicional para a realização destes estudos.

Referências

- [1] Briggs C, Harrison P, Machin SJ. Platelets counting. In: Michelson A, editors. Platelets. 2th ed. Boston:Academic Press; 2007. p. 475–483.
- [2] White JG. Platelet structure. In: Michelson A, editors. Platelets.3th ed. Boston; 2013. p.117-144.
- [3] Gawaz M, Langer H, May AE. Platelets inflammation and atherogenesis. J Clin Invest. 2005;115(12):3378-3384.
- [4] Aliprandi A, Longoni M, Stanzani L, Tremolizzo L, Vaccaro M, Begni B, Galimberti M, Garofolo R, Ferrarese C. Increased plasma glutamate in stroke patients might be linked to altered platelet release and uptake. J Cereb Blood Flow Metab2005;25:513-519.
- [5] Da Prada M, Cesura AM, Launay JM, Richards JG. Platelets as a model for neurones?Experientia 1988;44:115-126.
- [6] Karpatkin S. Studies on human platelet glycolysis. Effect of glucose, cyanide, insulin, citrate, and agglutination and contraction on platelet glycolysis.J Clin Invest. 1967;46(3):409-417.
- [7] Craik DJ, StewartM, CheesemanCI. GLUT3(brain-type) glucose transporterpolypeptides in human bloodplatelets. Thromb Res 1995;79(5-6):461-469.
- [8] Rylatt DB, Aitken A, Bilham T, Condon GD, Embi N, Cohen P. Glycogen synthase from rabbit skeletal muscle. Amino acid sequence at the sites phosphorylated by glycogen synthase kinase-3, and extension of the N-terminal sequence containing the site phosphorylated by phosphorylase kinase.Eur J Biochem1980;107(2): 529–537.
- [9] Harris RA. Carbohydrate Metabolism I: Major Metabolic Pathways and Their Control. In: Devlin TM, editor. Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations. 7th ed.Nova Jersey: John Wiley & Sons, Inc;2010. p. 619-615.

- [10] Karpatkin S, Charmatz A, Langer RM. Glycogenesis and glyconeogenesis in human platelets: Incorporation of glucose, pyruvate, and Citrate into platelet glycogen; glycogen Synthetase and fructose-1,6-diphosphatase activity. *J Clin Invest* 1970;49(1):140-149.
- [11] Scott RB. Activation of glycogen phosphorylase in blood platelets. *Blood* 1967;30(3):321-330.
- [12] Akkerman JW, Rijkssen G, Gorter G, Staal GE. Platelet functions and energy metabolism in a patient with hexokinase deficiency. *Blood* 1984;63(1):147-53.
- [13] Embi N, Rylatt DB, Cohen P. Glycogen synthase kinase-3 from rabbit skeletal muscle. Separation from cyclic-AMP-dependent protein kinase and phosphorylase kinase. *Eur J Biochem* 1980;107(2):519-527.
- [14] Chin PC, Majdzadeh N, D'Mello SR. Inhibition of GSK3 β is a common event in neuroprotection by different survival factors. *Brain Res Mol Brain Res* 2005;137(1-2):193-201.
- [15] Balaraman Y, Limaye ER, Levey AI, Srinivasan S. Glycogen synthase kinase 3B and Alzheimer's disease: pathophysiological and therapeutic significance. *Cell Mol Life Sci* 2006;63(11):1226-1235.
- [16] Frizzo ME. Putative role of glycogen as a peripheral biomarker of GSK3 β activity. *Med Hypotheses* 2013;pii: S0306-9877(13)00249-1.
- [17] Joaquim HP, Talib LL, Forlenza OV, Diniz BS, Gattaz WF. Long-term sertraline treatment increases expression and decreases phosphorylation of glycogen synthase kinase-3B in platelets of patients with late-life major depression. *J Psychiatr Res.* 2012;46(8):1053-1058.
- [18] Li X, Friedman AB, Zhu W, Wang L, Boswell S, May RS, Davis LL, Jope RS. Lithium regulates glycogen synthase kinase-3 β in human peripheral blood mononuclear cells: implication in the treatment of bipolar disorder. *Biol Psychiatry* 2006; 61(2):216-222.

- [19] S. Lovestone, C.H. Reynolds, D. Latimer, D.R. Davis, B.H. Anderton, J.M. Gallo et al. Alzheimer's disease-like phosphorylation of the microtubule-associated protein tau by glycogen synthase kinase-3 in transfected mammalian cells. *Curr Biol* 1994;4(12):1077-1086.
- [20] Leoncini G, Maresca M, Balestrero F, Polvani C, Armani U, Piana A. Platelet glucose metabolism in type I diabetic subjects. *Eur J Haematol* 1987; 39(2):166-171.
- [21] Jope RS, Yuskaitis CJ, Beurel E. Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): inflammation, diseases, and therapeutics. *Neurochem Res* 2007;32(4-5):577-595.
- [22] Barry FA, Graham GJ, Fry MJ, Gibbins JM. Regulation of glycogen synthase kinase 3 in human platelets: a possible role in platelet function? *FEBS Lett.* 2003;553(1-2):173-178
- [23] Rylatt DB, Aitken A, Bilham T, Condon GD, Embi N, Cohen P. Glycogen synthase from rabbit skeletal muscle. Amino acid sequence at the sites phosphorylated by glycogen synthase kinase-3, and extension of the N-terminal sequence containing the site phosphorylated by phosphorylase kinase. *Eur J Biochem* 1980;107(2):529-537.
- [24] Pandey GN, Ren X, Rizavi HS, Dwivedi Y. Glycogen synthase kinase-3beta in the platelets of patients with mood disorders: effect of treatment. *J Psychiatr Res* 2010;44(3):143-148.
- [25] McManus JFA. Histological and histochemical uses of periodic acid. *Stain Technology* 1948;23: 99-108.
- [26] McManus JFA. Periodate oxidation techniques. *General Cytochem Met* 1961;2:171.
- [27] McManus JFA. Histological demonstration of mucin after periodic acid. *Nature* 1946;158:202.
- [28] Hotchkiss RD. Cytochemistry of the Gonadotropic Hormones. *Arch Biochem Biophys.* 1948;162:651.
- [29] Gersh I. Polysaccharide complex in individual follicles of the thyroid gland of the rat. *Fed Proc* 1947;6:392.

- [30] Catchpole HR. Cellular distribution of glycoprotein in the anterior lobe of the pituitary gland. *Fed Proc* 1947;6:88.
- [31] Marchese S. Periodic acid is not specific as a reagent for mucin. *Atti della Societa Lombarda di Scienze Mediche e Biologiche* 1947;2:9.
- [32] Lillie RD. Reticulum staining with Schiff reagent after oxidation by acidified sodium periodate. *J Lab Clin Med* 1947;32:910-912.
- [33] Bauer H. Mikroskopisch-chemischer nachweis von glycogen und einigen anderen polysacchariden. *Z Mikrosk Anat Forsch* 1933;33:143.
- [34] Gibb PR, Stowell RE. Glycogen in human blood cells. *Blood* 1949;4:569-579.
- [35] Akkerman JW, Rijksen G, Gorter G, Staal GE. Platelet fus and energy metabolism in a patient with hexokinase deficiency. *Blood* 1984;63:147-153.
- [36] Van Handel E. Estimation of glycogen in small amounts of tissue. *Anal Biochem.* 1965;11(2):256-265.

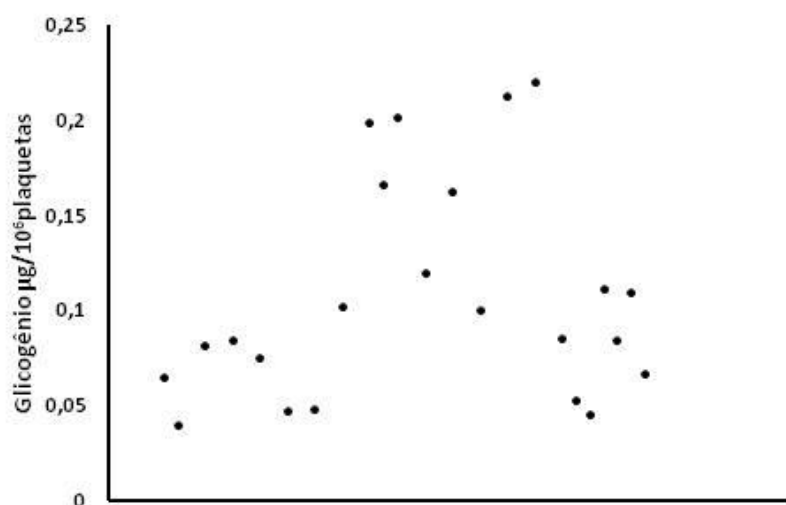
Tabelas e Figuras

Figura 1. Níveis de glicogênio em plaquetas humanas. Concentração de glicogênio em plaquetas de 23 doadores saudáveis do sexo masculino. O valor médio encontrado foi de $0,108 \pm 0,058 \mu\text{g}/10^6$ plaquetas.

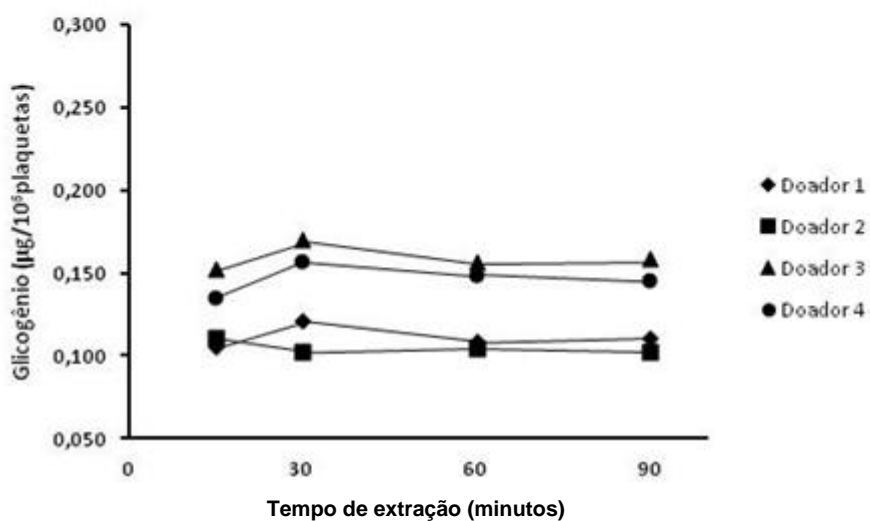


Figura 2. Curva de tempo de extração de glicogênio. Efeito de 15, 20, 60 e 90 minutos de fervura em KOH 30% para extrair glicogênio. Não foram observadas diferenças significativas entre os pontos da curva de cada doador. Os valores de glicogênio são expressos em $\mu\text{g}/10^6$ plaquetas.

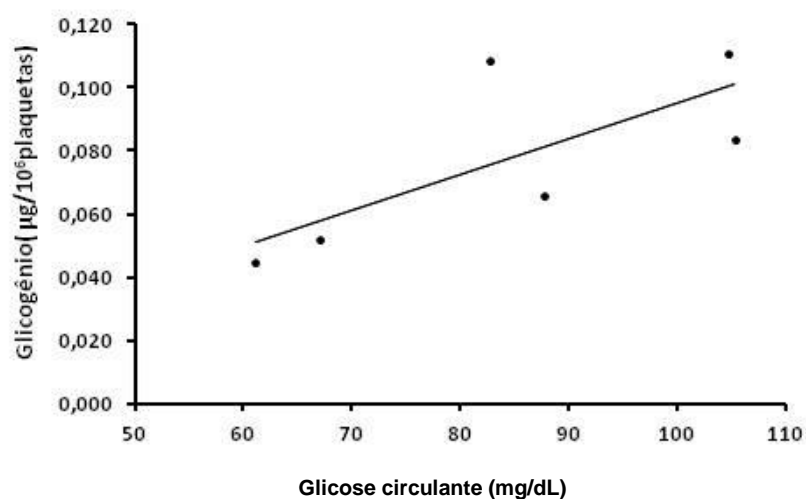


Figura 3. Correlação entre glicogênio plaquetário e glicemia dos doadores. Foram utilizadas 6 amostras para avaliar uma possível correlação entre as duas variáveis. Como indica valor de $r = 0,74$ há correlação positiva entre o glicogênio plaquetário e a glicemia em 6 doadores.

Tabela I. Níveis glicêmicos de doadores e os respectivos valores de glicogênio.

Doador	Glicemia (mg/dL)	Glicogênio ($\mu\text{g}/10^6$plaquetas)
1	67,1	0,052
2	61,1	0,045
3	104,6	0,111
4	105,2	0,084
5	82,6	0,109
6	87,6	0,066
	84,7\pm18,4	0,078\pm0,028

Níveis glicêmicos de doadores e os respectivos valores de glicogênio. A glicemia média foi de 84,7 \pm 18,4 mg/dL e os valores de glicogênio 0,078 \pm 0,028 $\mu\text{g}/10^6$ plaquetas

CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Os resultados apresentados demonstram que foi possível padronizar um método para quantificar glicogênio de plaquetas humanas corrigindo a concentração do polímero pelo número de células. A técnica demonstrou ser sensível, de simples execução e permitirá posteriormente, que sejam feitos estudos utilizando a concentração do glicogênio plaquetário como parâmetro de avaliação de patologias com essa molécula. Não existia até o momento, uma técnica para esta finalidade, além disso, a disponibilidade dos artigos que descrevem a detecção direta do polímero, em especial pela técnica de PAS, é limitada, já que são antigos e de difícil acesso eletrônico.

O método descrito por Van Handel [38] para amostras de pequena massa foi utilizado como base para este trabalho. Realizamos adaptações com o objetivo de simplificar e aumentar a sensibilidade do método para as plaquetas. O aumento da sensibilidade foi conseguido com o uso de um kit enzimático para determinação de glicose, o que era uma das limitações do ensaio, segundo Van Handel, já que o reagente de detecção da glicose livre (resultado da hidrólise ácida do glicogênio), a antrona, era pouco sensível. A consequência da aplicação desta técnica de quantificação de glicogênio será a possibilidade de uma nova ferramenta para estudar as reservas de glicogênio em plaquetas humanas e correlacioná-la à atividade da GSK3 β

BIBLIOGRAFIA ADICIONAL

COLLER, B.S.; SHATTIL, S.J. The GPIIb/IIIa (integrin α IIb β 3) odyssey: a technology-driven saga of a receptor with twists, turns, and even a bend. **Blood**, New York, 112(8):3011-3025, 2008.

FAVALORO, E.J. et al. Contemporary platelet function testing. **Clin Chem Lab Med**, Westmead, 48(5):579-598, 2010.

GAWAZ, M et al. Platelets in inflammation and atherogenesis. **J Clin Invest**. Tübingen, 115(12):3378-3384, 2005.

GNATENKO, D.V. et al. Proteomic approaches to dissect platelet function: Half the story. **Blood**, New York, 108(13):3983-3991, 2006.

SCHRIJVER, J. et al. Insignificance of Gluconeogenesis in Human Blood Platelets. **European Journal of Clinical Investigation**. Netherlands, 5(1):7-14, 1975.

WAZNA, E. Platelet-mediated regulation of immunity. **Postepy Hig Med Dosw**, Zakład, 60:265-277, 2006.

YEAMAN, M.R.; BAYER, A.S. Antimicrobial Host Defense. In: Michelson A, editors. **Platelets**. 3th ed. Boston: Academic Press. p. 767-801, 2013.

ANEXO I (NORMAS DA REVISTA “PLATELETS”)

Este trabalho será submetido na revista “Platelets”. As orientações aos autores para submissão de trabalhos encontram-se a seguir.

Platelets

Instructions for Authors

Platelets considers all manuscripts at the Editors' discretion; the Editors' decision is final.

Platelets considers all manuscripts on the strict condition that they are the property (copyright) of the submitting author(s), have been submitted only to *Platelets*, that they have not been published already, nor are they under consideration for publication, nor in press elsewhere. Authors who fail to adhere to this condition will be charged all costs which *Platelets* incurs, and their papers will not be published. Copyright will be transferred to the journal *Platelets* and Informa UK Ltd., if the paper is accepted.



Editors

Editor-in-Chief:

S Heptinstall
Cardiovascular Medicine
University Hospital
Queen's Medical Centre
Nottingham NG7 2UH, UK
Tel: (+44) 115 970 9340
Fax: (+44) 115 970 9384
Email: s.heptinstall@nottingham.ac.uk

Review Editor:

A W Poole
Department of Physiology & Pharmacology
School of Medical Sciences
University Walk
Bristol, BS8 1TD, UK
Tel: (+44) 117 331 1435
Fax: (+44) 117 331 2288
Email: A.Poole@bristol.ac.uk

Method Section Editors:

K J Clemetson - Theodor Kocher Institute, Switzerland

P Harrison - Churchill Hospital Oxford, UK

Article Types

Platelets publishes original articles, review articles, short communications, case reports and letters to the editor. Suggestions for review articles should be emailed to the [Review Editor](#).

In September 2009, in addition to the usual articles listed above, the Journal introduced a new Methods section. This is a unique feature of *Platelets*. With the growing complexity and enormous range of different methodologies involved in research on platelets, coupled with increasing utility of new technologies, we envisage that this section will be of huge benefit to platelet researchers worldwide. This should not only improve standardization between laboratories but provide up-to-date and detailed descriptions of both old and new methods that are often difficult to replicate and may thus help to resolve controversies in the field.

From June 2010 *Platelets* is introducing a new article category called "Spotlight articles". These articles are invited and are essentially mini-reviews based around a single defined subject matter (often a single molecule or family of molecules), and also based around a single 'poster-style' figure. They should be limited to no more than 1500 words and the review should be summarised in the central figure. This poster style figure should contain more information than for a standard figure, and may also contain boxes within the figure. The number of references should be minimal, with a maximum of 20 key references. These should be limited to resources for further reading (reviews, etc.) rather than comprehensive citations. It is envisaged the poster style figure will be something readers can print out and pin on their notice boards for example, as well as being ideal for teaching purposes. Some of you may recognise this as being similar to the Journal of Cell Science 'At-a-Glance' series articles.

General Guidelines

Please write clearly and concisely, stating your objectives clearly and defining your terms. Your arguments should be substantiated with well reasoned supporting evidence.

In writing your paper, you are encouraged to review articles in the area you are addressing which have been previously published in the Journal, and where you feel appropriate, to reference them. This will enhance context, coherence, and continuity for our readers.

Authors should include telephone and fax numbers as well as e-mail addresses on the cover page of manuscripts.

Articles should be written in English. Authors whose native language is not English are requested to have their manuscript checked for linguistic correctness before submission. For a list of resources we recommend for language editing please [click here](#).

Submissions should include, where appropriate, a formal statement that ethical consent for the work to be carried out has been given.

Submission Guidelines

All submissions should be made online at *Platelets'* ScholarOne Manuscripts site:

<http://mc.manuscriptcentral.com/cpla>

New users should first create an account. Once a user is logged onto the site, submissions should be

made via the Author Centre. If you are a new author but have previously reviewed for the Journal through the online system, you should use your existing reviewer username and password to log in as an author.

If you experience any problems with your submission or with the site, please contact ScholarOne support through the 'get help now' link.

Hard copies of micrographs may be mailed to the Editor, provided they are labelled appropriately.

Ethical Review

The Journal supports the principles of the Declaration of Helsinki, and expect that the authors of papers submitted to the Journal will have obtained ethical consent and followed those legal and regulatory requirements for human experimentation with drugs, including informed consent, according to procedures which apply in their institution and country. The Code of Ethics of the World Medical Association ([Declaration of Helsinki](#)) represents a minimal requirement. Please click on [Ethics and Consent](#) for further information.

Preparation of Manuscripts

Manuscripts are preferred in Microsoft Word format (.doc files). All manuscripts must be typed in 12pt font and in double space with margins of at least 2.5 cm. Charts and tables are considered textual and should also be supplied in a format compatible with Microsoft Word. All figures (illustrations, diagrams, photographs) need to be submitted as separate files in jpg, tiff or eps format.

References should be given in Council of Science Editors (CSE) Citation & Sequence format (see [References](#) section for examples).

Structure of Manuscripts

In general, manuscripts should be divided into sections with the headings: Title page, Abstract, Introduction, Methods, Results, Discussion, Acknowledgements, Declaration of Interest statement, References, Tables and Figures. A Conclusion section is optional. Each section should begin on a new sheet and be identified with the shoulder heading. Other subsection headings within the main headings may be used but should be limited.

Title Page

A title page should be provided comprising the article title plus the full names and affiliations of all authors involved in the preparation of the manuscript. One author should be clearly designated as the corresponding author and full contact information, including phone number and email address, provided for this person. A short title not exceeding 50 characters (including spaces) and Keywords (2-6) should also be included on the title page. The keywords will assist indexers in cross indexing your article.

Abstract

Authors submitting papers should note that abstracts (unstructured and between 150-400 words) are required. These should outline the questions investigated, the design, essential findings and main conclusions of the study.

Acknowledgments and Declaration of Interests

Acknowledgments and Declaration of interest sections are different, and each has a specific purpose. The Acknowledgments section details special thanks, personal assistance, and dedications.

Contributions from individuals who do not qualify for authorship should also be acknowledged here. Declarations of interest, however, refer to statements of financial support and/or statements of potential conflict of interest. Within this section also belongs disclosure of scientific writing assistance (use of an agency or agency/ freelance writer), grant support and numbers, and statements of employment, if applicable.

Acknowledgments section

Any acknowledgments authors wish to make should be included in a separate headed section at the end of the manuscript preceding any appendices, and before the references section. Please do not incorporate acknowledgments into notes or biographical notes.

Declaration of Interest section

All declarations of interest must be outlined under the subheading "Declaration of interest". If authors have no declarations of interest to report, this must be explicitly stated. The suggested, but not mandatory, wording in such an instance is: *The authors report no declarations of interest*. When submitting a paper via ScholarOne Manuscripts, the "Declaration of interest" field is compulsory (authors must either state the disclosures or report that there are none). If this section is left empty authors will not be able to progress with the submission.

Please note: for NIH/Wellcome-funded papers, the grant number(s) must be included in the Declaration of Interest statement.

[Click here to view our full Declaration of Interest Policy.](#)

References

References should follow the Council of Science Editors (CSE) Citation & Sequence format. Only works actually cited in the text should be included in the references. Indicate in the text with Arabic numbers inside square brackets. Spelling in the reference list should follow the original. References should then be listed in numerical order at the end of the article.

Examples are provided as follows:

Journal article: [1] Steiner U, Klein J, Eiser E, Budkowski A, Fetters LJ. Complete wetting from polymer mixtures. *Science* 1992;258:1122-1129.

Book chapter: [2] Kuret JA, Murad F. Adenohypophyseal hormones and related substances. In: Gilman AG, Rall TW, Nies AS, Taylor P, editors. *The pharmacological basis of therapeutics*. 8th ed. New York: Pergamon; 1990. p. 1334-1360.

Conference proceedings: [3] Irvin AD, Cunningham MP, Young AS, editors. *Advances in the control of Theileriosis*. International Conference held at the International Laboratory for Research on Animal Diseases; 1981 Feb 9-13; Nairobi. Boston: Martinus Nijhoff Publishers; 1981. 427 p.

Dissertations or Thesis: [4] Mangle ED. *A comparative study of the perceptions of illness in New Kingdom Egypt and Mesopotamia of the early first millennium* [dissertation]. Akron (OH): University of Akron; 1991. 160 p. Available from: University Microfilms, Ann Arbor MI; AAG9203425.

Journal Article on internet: [5] Loker WM. "Campesinos" and the crisis of modernization in Latin America. *Jour of Pol Ecol* [serial online] 1996; 3(1). Available: http://www.library.arizona.edu/ej/jpe/volume_3/ascii-lokeriso.txt via the INTERNET. Accessed 1996 Aug 11.

Webpage: [6] *British Medical Journal* [Internet]. Stanford, CA: Stanford, CA: Stanford Univ; 2004 July

10- [cited 2004 Aug 12]; Available from: <http://bmj.bmjournals.com/>

Internet databases: [7] Prevention News Update Database [Internet]. Rockville (MD): Centers for Disease Control and Prevention (US), National Prevention Information Network. 1988 Jun - [cited 2001 Apr 12]. Available from: <http://www.cdcnpin.org/>

Further examples and information can be found in *The CSE Manual for Authors, Editors, and Publishers*, Seventh Edition. Periodical abbreviations should follow the style given by Index Medicus.

Tables and Figures

Tables and figures should be referred to in text as follows: Figure 1, Figure 2; Table I, Table II. The place at which a table or figure is to be inserted in the printed text should be indicated clearly on the manuscript. Each table and/or figure must have a legend that explains its purpose without reference to the text. Each table and/or figure must be uploaded separately from the main document. Charts and tables are considered textual and should also be supplied in a format compatible with Microsoft Word.

Hard copies of micrographs submitted for publication will not be returned and will be destroyed after publication, unless otherwise requested.

Tables: should be used only when they can present information more efficiently than running text. Care should be taken to avoid any arrangement that unduly increases the depth of a table, and the column heads should be made as brief as possible, using abbreviations liberally. Tables should be submitted on separate sheets, numbered in Roman numerals, and their position indicated in the text (e.g., Table I). Each table should have a short, self-explanatory title. Vertical rules should not be used to separate columns. Units should appear in parentheses in the column heading but not in the body of the table. Any explanatory notes should be given as a footnote at the bottom of the table.

Figures: All illustrations (including photographs, graphs and diagrams) should be referred to as Figures and their position indicated in the text (e.g., Figure 3). The captions of all figures should be submitted on a separate sheet, should include keys to symbols, and should make interpretation possible without reference to the text. Figures should ideally be professionally drawn and designed with the format of the journal in mind and should be capable of reduction.

Colour Figures: Avoid the use of colour and tints for purely aesthetic reasons. Any figure submitted as a colour original will appear in colour in the journal's online edition free of charge and can be downloaded. Paper copy colour reproduction will only be considered on condition that authors contribute to the associated costs. Charges are: US\$500 per article, a 15% service fee will be applied by Rightslink. (Color costs will be waived for invited articles).

Method Section Articles

1. Follow general formatting instructions above
2. Title page must include "Method Article"
3. As a guideline the total article length should be between 3,000 to 5,000 words, but flexibility may be applied at the discretion of the Editor
4. An abstract should be included
5. Key words (5 to 6) should be included

Best Paper Awards

Each year, Best Paper Awards are presented to lead authors of the two best papers published in the Journal's previous volume. Please contact the Editor-in-Chief for further information.

Disclaimer

Informa Healthcare makes every effort to ensure the accuracy of all the information (the "Content") contained in its publications. However, Informa Healthcare and its agents and licensors make no representations or warranties whatsoever as to the accuracy, completeness, or suitability for any purpose of the Content and disclaim all such representations and warranties whether express or implied to the maximum extent permitted by law. Any views expressed in the Journal are the views of the authors and are not the views of Informa Healthcare.