

BASES BIOQUÍMICAS DA ATIVIDADE PLAQUETÁRIA NA HEMOSTASIA E NA TROMBOGÊNESE. PARTE I

PEDRO JOSÉ DE ALMEIDA, JOSÉ GUILHERME PINHEIRO PIRES *

A ativação das plaquetas circulantes por lesões vasculares com exposição do colágeno subendotelial constitui um dos primeiros passos para a formação do trombo ou do tampão hemostático. Assim, hemostasia e trombogênese, embora com repercussões e significados diferentes, são processos cujos mecanismos apresentam muitas similaridades. A formação do tampão hemostático, esquematicamente representado na figura 1, serve para ressaltar a participação das plaquetas em ambos os processos. A ativação plaquetária, um processo que ocorre dentro de apenas 15 segundos, envolve uma série de modificações morfológicas e bioquímicas durante as quais a plaqueta perde a sua forma discoide inicial, tornando-se esférica, com contornos irregulares, apresentando espículas ou filopódios. Acompanhando essa mudança de forma, as plaquetas secretam o conteúdo de seus grânulos, “expõem” os receptores para várias moléculas (incluindo o fibrinogênio e outros fatores da coagulação) e agregam-se. Após a agregação, as plaquetas condensam-se, retraindo os filopódios, o que provoca a retração da rede de fibrina inicialmente frouxa que se forma no coágulo, tornando-o mais consistente e aderente ao vaso lesado. O recrutamento de plaquetas adicionais circulantes nas vizinhanças do aglomerado inicial faz-se às custas de substâncias ativadas localmente (como a trombina), secretadas dos grânulos (como o ADP e a trombospondina) ou sintetizadas pela própria plaqueta (como o tromboxane-A₂)¹⁻¹⁰. A prostaciclina (PGI₂) produzida na parede vascular, apesar de ter uma meia-vida biológica extremamente curta (cerca de 3 minutos) é um dos principais fatores locais limitantes (reguladores) do processo^{4,5}.

Achados recentes, especialmente os que dizem respeito às proteínas da membrana e aos detalhes ultra-estruturais do citoesqueleto (CK) plaquetário, constituem as bases para a compreensão das interações dos agonistas com os receptores da membrana e das subseqüentes modificações envolvidas na resposta funcional plaquetária¹. Nesta primeira parte, especial atenção será dada à íntima associação entre as glicoproteínas (GPs) da membrana e

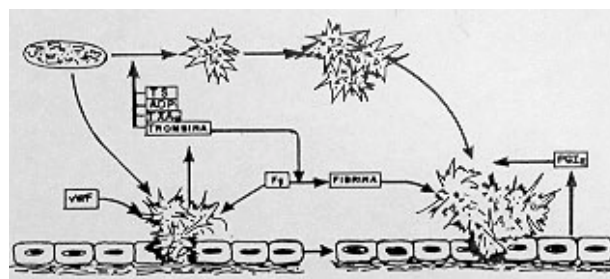


Fig. 1 - Formação do tampão hemostático. A lesão endotelial representada no lado direito da figura inicia a aderência de plaquetas ao colágeno exposto, tendo como cofator indispensável o vWF. A liberação de substâncias contidas nos grânulos (como o ADP e a TS), ativadas localmente (como a trombina) ou sintetizadas pelas plaquetas (como a TXA₂), promovem a ativação e o recrutamento de plaquetas adicionais circulantes nas vizinhanças do aglomerado inicial, aumentando a massa plaquetária que constitui o tampão hemostático (lado esquerdo da figura). TS = trombospondina; ADP = difosfato de adenosina; TXA₂ = tromboxane A₂; vWF = fator de von Willenbrand; Fg = fibrinogênio; PGI₂ = prostaciclina.

as proteínas do CK, uma evidência direta da interação entre receptores da superfície e a principal estrutura interna responsável pela metamorfose que a plaqueta experimenta ao ser ativada.

PROTEÍNAS DA MEMBRANA PLASMÁTICA PLAQUETÁRIA

Seguindo o modelo do mosaico fluido para a membrana plasmática, as proteínas a ela associadas são classificadas em proteínas integrais, que se encontram total ou quase totalmente incluídas na matriz lipídica, e proteínas periféricas, que se encontram mais frouxamente ligadas à membrana, podendo ser removidas por agentes quelantes ou por modificações da força iônica do meio. Na membrana plaquetária, as glicoproteínas (GPs) constituem-se no grupo mais estudado. A nomenclatura atualmente em uso adota a abreviação GP para a designação genérica de glicoproteína. A individualidade de cada GP é sugerida pelo acréscimo de um numeral romano seguido de uma letra minúscula (p ex.: GP Ib). Quando a GP é composta de mais de uma subunidade (ou

* Departamento de Ciências Fisiológicas, Centro Biomédico da UFES, Vitória, ES.

cadeia), acrescentam-se letras do alfabeto grego (p. ex.: GP Iba e GP Ibb)^{12,13}.

Por dificuldades técnicas, poucos estudos têm sido realizados com proteínas altamente purificadas da membrana plaquetária. A maior parte das informações atualmente disponíveis acerca das GPs individuais foram obtidas em estudos com misturas de proteínas de homogeneizados totais de plaquetas ou de membranas¹⁴⁻¹⁶. A tabela I resume algumas destas informações.

Deficiências específicas de GPs têm sido detectadas em alguns distúrbios hemostáticos, como os da síndrome de Bernard-Soulier e da trombostenia de Glanzmann^{17,19}. Alguns comentários adicionais para cada GP em particular são pertinentes aos objetivos deste trabalho.

TABELA I - Algumas características moleculares e funcionais das glicoproteínas da membrana plaquetária^{14-16, 20-22}.

Glicoproteína	Subunidade	Peso molecular	Interação funcional	Ausência ou diminuição em
GP Ia	1 cadeia	167.000	Colágeno plaqueta	Desconhecido
GP Ib	e	143.000	Receptor p/ vWF(*) e Trombina	Síndrome de Bernard-Soulier
GP Ic	e	22.000		
GP Ic	e	134.000	Nenhuma	Desconhecido
GP Ic	e	27.000		
GP IIa	1 cadeia	157.000	Nenhuma	Desconhecido
GP IIb	e	132.000	Receptor p/ Fg(**) e vWP. quando em complexo c/ GP IIIa	Trombastenia de Glanzmann
GP IIIa	1 cadeia	114.000	ver GP IIb	Trombastenia de Glanzmann
GP V	1 cadeia	82.000	Receptor (substrato p/ bina	(subs- Síndrome de trom- Bernard-Soulier
GP IX	1 cadeia	17.000	Afinidade p/ GP Ib	Síndrome de Bernard-Soulier
GP IX	1 cadeia	22.000		

(*) - Fator de von willebrand; (**) - Fibrinogênio.

GP Ia - É uma GP exposta na superfície. Estudo recente revela uma acentuada redução da GP Ia em pacientes com deficiente interação colágeno-plaqueta, o que sugere que esta GP pode estar envolvida na ativação plaquetária mediada pelo colágeno¹².

GP Ib - Ao que parece, urna ou ambas as subunidades estão incluídas em toda a extensão da camada lipídica dupla (proteína integral), podendo interagir com estruturas do CK plaquetário subjacente. A glicocalicina (GPS), um produto oriundo da proteólise da subunidade de cadeia a da GP Ib, representa a parte da molécula que é exposta para o exterior da membrana^{20,22}. Acredita-se que seja esta a região da molécula que se liga à trombina e, provavelmente, também o fator de von Willebrand

(vWF)²³. Essa última ligação é considerada de grande importância na adesividade das plaquetas às estruturas subendoteliais da parede vascular lesada²⁴. Pelo fato de o vWF ligar-se também ao complexo GP IIb IIIa, torna-se evidente que a GP Ib não é o seu único receptor plaquetário. Cabe lembrar que na presença do antibiótico ristocetina o vWF liga-se predominantemente à GP Ib^{19,25}. Acredita-se que essa seja a razão de o vWF ser considerado o cofator plasmático indispensável à agregação plaquetária induzida pela ristocetina. Além disso, a GP Ib parece tomar parte na interação normal com a trombina, apesar de não ser absolutamente necessária para a resposta funcional¹² (ver adiante, GP V).

GP Ic - É uma proteína periférica, cuja função não foi ainda esclarecida.

GP IIa - Igualmente, sua função não foi ainda elucidada.

GP IIb - É uma proteína integral com alta antigenicidade, particularmente quando em complexo com a GP IIIa. Tem sido encontrada em associação com o CK plaquetário. O complexo GP IIb/IIIa é considerado o receptor plaquetário do fibrinogênio (Fg)^{3,26,27}.

GP IIIa - É também uma proteína integral com alta antigenicidade, encontrada em complexo com a alta antigenicidade, encontrada no complexo com a GP IIb. Pode ser encontrada ligada ao CX plaquetário²⁰.

Complexo GP IIb/IIIa - Acredita-se que as GP IIb e IIIa coexistam na membrana plaquetária à maneira de um complexo^{20,28}. A primeira evidência dessa afirmativa é que ambas estão ausentes ou diminuídas nas plaquetas da trombostenia de Glanzmann³⁰. Além disso, ambas são encontradas no mesmo imunoprecipitado em imunoeletoforese cruzada de extratos de plaquetas normais. Sob condições apropriadas, em que o pH do meio é importante, o complexo GP IIb/IIIa pode ser separado por agentes quelantes, resultando nas GPs individuais¹³. Uma vez que esse complexo se associa com elementos do CK, tem-se atribuído a essa associação a denominação de "trombonexus", em analogia ao termo "fibrinexus", usado para descrever a ligação de superfície do CK com a fibronectina (FN) em cultura de células¹¹. Deve-se salientar que tanto a GP IIb como a GP IIIa contêm sítios de ligação para o cálcio e o complexo é estabilizado por cátions divalentes^{3,26,31}. Isto tem levado à suposição de que a "exposição" ou "ativação" dos receptores do Fg seria equivalente à formação do complexo GP IIb IIIa cátion dependente a partir das GPs individuais^{1,26}. Outra hipótese é a da existência de um complexo GP IIb/IIIa "pré-formado", isto é, já existente na membrana da plaqueta não-ativada. Nesse caso, a ativação seria urna alteração (conformacional ou outra) do complexo transformando-o no receptor do Fg^{12,26,32}.

GPs IIIb a IX - As GPs IV, V, VI, VII, VIII e IX, originalmente definidas pelos estudos de eletroforese em gel unidimensional de extratos de

plaquetas, foram definidas e reagrupadas a partir de estudos em sistemas bidimensionais. Destas, a GP V e a GP IX têm particular interesse, sendo que as demais (a GP IIIb corresponde à GP IV) são ainda pouco conhecidas¹².

GP V - Tem sido caracterizada como uma proteína periférica^{33,34}, muito embora haja a suposição de que esta GP possa estar simplesmente absorvida à membrana, via GP Ib, o que explicaria a sua freqüente perda durante os procedimentos de preparação e isolamento³³. Pelo fato de ser um substrato da trombina (assim como de outras proteases), a GP V é atualmente considerada como um receptor desta protease^{33,34}. Cabe ressaltar que, além da GP V e da GP Ib, outro(s) receptor(es) da trombina parece(em) existir, sobretudo pelo fato de que plaquetas de paciente com síndrome de Bernard-Soulier agregam-se por ação da trombina, mesmo nos casos em que as plaquetas não se aglutinam na presença de vWF.

GP IX - Corresponde à GP 17 (ou GP 17^{5,8-6,5}) da antiga nomenclatura. Assim como a GP Ib e a GP V, está ausente nas plaquetas de pacientes com a síndrome de Bernard-Soulier¹².

PROTEÍNAS DE MEMBRANAS INTRACELULARES

Os estudos têm sido dirigidos especialmente para a membrana do grânulo alfa. Uma característica marcante, desta membrana é o baixo teor de colesterol, (o que está em acordo com o conceito geral de membrana intracelular) e a elevada relação proteína,/fosfolípide, o que se deve à existência de proteínas periféricamente absorvidas, com grande afinidade para a membrana deste grânulo. Certas diferenças na composição da membrana do grânulo alfa em comparação com a da membrana plasmática têm sido assinaladas. Assim, enquanto as GPs Ia, Ib e IIIb, além da b2 - microglobulina e da actina, parecem ser específicas da membrana plasmática, pelo menos dois antígenos, denominados G8 e G18, foram observados apenas na membrana do grânulo alfa¹⁵.

CONSIDERAÇÕES SOBRE O CITOESQUELETO PLAQUETÁRIO

Usando o detergente não-iônico Triton X-100 (octil-fenoxi-polietoxietanol) em determinadas condições de pH e força iônica, Yu e col.³⁵ extraíram de glóbulos vermelhos, um resíduo insolúvel; essencialmente, o arcabouço estrutural sobre o qual, na célula intacta, a membrana plasmática se apoia para manter uma determinada forma. Os estudos pioneiros nortearam as idéias acerca da organização e isolamento do CK de outros tipos de células, de tal maneira que o termo citoesqueleto é atualmente empregado para designar o resíduo insolúvel extraído com aquela metodologia¹¹.

Várias classes de filamentos subjacentes à membrana, incluindo microfilamentos de actina, filamentos grossos de miosina, filamentos intermediários, além dos microtúbulos (preservados sob determinadas condições de preparação), integram o CK, o qual faz parte de uma matriz citoplasmática visualizada como um entrelaçado microtubular à microscopia eletrônica de alta voltagem³⁶.

A ultra-estrutura do CK das plaquetas merece especial atenção, sobretudo pelas profundas alterações morfológicas que experimenta quando as plaquetas são ativadas por agonistas, como a trombina. A ultra-estrutura e o conteúdo microfilamentar do CK de plaquetas não-ativadas têm sido descritos de maneira ainda conflitante, essencialmente pelos diferentes métodos empregados na preparação. O CK plaquetário é uma estrutura dinâmica que pode modificar-se rapidamente de uma forma altamente desorganizada (na plaqueta não-ativada) para uma estrutura altamente organizada (na plaqueta ativada), passível de contração. A figura 2 é uma representação esquemática das modificações estruturais do CK de plaquetas ativadas pela trombina¹¹. Pode-se observar que, na plaqueta não-ativada, o CK aparece como uma malha fina de microfilamentos dispostos na periferia, estendendo-se pelo citoplasma e envolvendo organelas como os grânulos plaquetários^{11,37}. Na plaqueta ativada, o CK apresenta-se como uma estrutura mais densa, que parece ser constituída de feixes de microfilamentos enovelados e interligados, mais numerosos centralmente. Estados intermediários de organização e distribuição do CY têm sido obtidos na dependência do grau de ativação plaquetária.

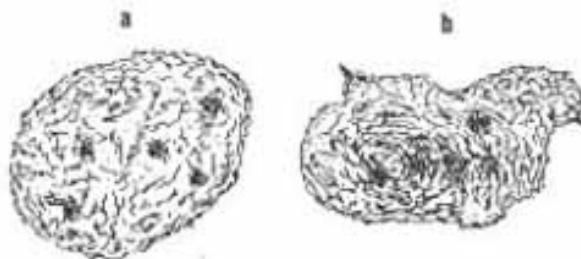


Fig. 2 - Representação esquemática do arcabouço estrutural que constitui o citoesqueleto numa plaqueta não-ativada (a), na qual a fina malha de filamentos e feixes de filamentos dispõem-se periféricamente, delimitando o contorno arredondado e formando aglomerados mais densos nos locais onde se encontram as organelas e grânulos. Na plaqueta ativada (b), o mesmo arcabouço apresenta irregularidades no contorno externo, com tendência à centralização dos aglomerados mais densos.

Particularmente interessantes têm sido os estudos que evidenciam modificações na actina e proteínas (citoplasmáticas) a ela associadas, em relação com a ativação induzida pela trombina. Naturalmente, as considerações que se seguem podem ser úteis para a compreensão de modificações induzidas por outros agonistas. Assim, uma das mais profundas modificações observadas com a ativação

é a polimerização da actina, que passa de sua forma monomérica (G Actina) para a forma filamentar (F-Actina). Realmente, tem-se estimado que 40-50% da actina em plaquetas não-ativadas encontra-se sob a forma polimerizada, a qual sofre um acréscimo adicional de 20 40%, quando a plaqueta é ativada³⁸. Além disso, outras modificações têm sido observadas como consequência da ativação pela trombina. Entre elas, ressaltam-se a fosforilação da miosina, o aumento de proteína ligadora de actina (A-BP, de "Actin Binding Protein" fosforilada, o aumento da alfa-actinina e outras. A tabela II relaciona a actina e as principais proteínas do CX a ela associada em plaquetas ativadas^{11,37}.

TABELA II - Actina e principais proteínas a ela associadas no citoesqueleto (CK) plaquetário^{11,37,40}.

Proteína	Peso molecular	Função
Actina	45.000	Formação de microfilamentos. Principal proteína estrutural do citoesqueleto. Essencial na contratilidade e motilidade.
Proteína ligadora de actina (fosforilada)	250.000	Ligação cruzada com filamentos de actina. Acelera a nucleação da actina.
Miosina (fosforilada)	500.000	Interação com a actina, levando à contração.
Alfa actinina	105.000	Formação de gel, com a F-actina, promovendo a sua polimerização
Tropomiosina	28.000	Liga-se à F-actina Regula a contração. Ligação dos feixes de filamentos.

ASSOCIAÇÃO DE GLICOPROTEÍNAS DA MEMBRANA COMO CITOESQUELETO PLAQUETÁRIO

Estudos efetuados em células isoladas (células cultivadas e glóbulos brancos) têm demonstrado a presença de vários receptores de superfícies, tais como os receptores para imunoglobulinas, concanavalina A (Con A) e FN e antígenos de histocompatibilidade, em íntima aposição, aos filamentos subcelulares de actina do CK¹¹. Conforme já foi dito, em fibroblastos têm-se descrito o "fibrinexus", uma área de contato entre os filamentos de actina subcelulares e a FN ligada à superfície externa³⁹.

Nas plaquetas, pelo menos o complexo GP IIb/ IIIa e as GPs Ia e Ib ligadas à membrana plasmática têm sido encontradas em associação com o CK¹¹. Realmente, o CK obtido de plaquetas agregadas com potentes agonistas (tais como a trombina e a Con A), apresentam o complexo GP IIb/IIIa associado, o que não ocorre quando as plaquetas são agregadas por agonistas fracos (como o ADP). Entretanto, mesmo em plaquetas não-ativadas, tem sido demonstrado que a GP Ib forma um complexo com a A-BP através de uma ligação transmembrana^{11,26}. Pelo menos para o complexo IIb/IIIa, a ligação GP-CX parece ser mais forte para alguns agonistas e é reforçada pelo

contato plaqueta-plaqueta que ocorre durante a agregação. Ao que parece, a associação do complexo GP IIb e IIIa ao CK depende de uma incorporação prévia de alguns dos componentes do CK, tais como os filamentos de actina, A-BP e alfa-actina^{37,40}. Essa incorporação dependeria do agonista usado na preparação do CK e se processaria em estágios. Assim, no estágio final em que o CX está altamente condensado é que se daria a sua associação com os receptores (GPs) da superfície. Neste estágio seria formado o "trombonexus", isto é, a condensação de proteínas e macromoléculas que serviriam como elo de ligação entre o CK e os receptores da superfície. Algumas proteínas dos grânulos alfa, tais como o fator V, o Fg, o fator Plaquetário-4 (PF-4), a FN e a trombospondina (TS), entre outras, têm sido encontradas na constituição do "trombonexus"¹¹.

O RECEPTOR DO FIBRINOGENÍO

O complexo GP IIb/IIIa, além de receptor para o Fg, pode também servir de receptor para outras moléculas, como o vWF, a TS e a FN^{3,41}. A ligação com o vWF parece não ter significado fisiológico, pois estudos de ligação competitiva entre concentrações fisiológicas desse fator e do Fg demonstraram que o complexo GP IIb/IIIa é ocupado predominantemente pelo Fg⁴². A ligação com a TS é cálcio-dependente e parece ter importância na agregação secundária, quando essa macromolécula é liberada dos grânulos alfa^{6,7,9}. Quanto à FN, apesar de sua capacidade de ligação com o complexo GP IIb/IIIa, não induz agregação plaquetária^{3,41}, sendo, ao contrário, capaz de inibir a agregação induzida pelo ADP e pelo colágeno⁴³.

Além de fato do complexo GP IIb/IIIa ser o receptor do Fg, essa interação tem grande importância fisiológica, pois desde os primeiros estudos tem-se estabelecido que o Fg é um importante cofator na agregação plaquetária^{3,4,26}. Pacientes com afibrinogenemia têm tempos de sangramento aumentados e agregação plaquetária normal, com grande similaridade com os achados na trombostenia de Glanzmann, uma condição em que há ausência ou acentuada diminuição das GPs IIb e IIIa na membrana plaquetária^{3,30}.

Estudos de cinética de ligação do Fg (em níveis de saturação) a plaquetas estimuladas pelo ADP têm permitido estimar que entre 16.000-80.000 moléculas de Fg ligam-se a cada plaqueta. Não existe ainda total concordância em relação a vários parâmetros cinéticos, tais como a quantidade de Fg exógeno necessário à saturação, o curso temporal da ligação Fg-plaqueta até o equilíbrio e a geometria dos gráficos obtidos. Alguns estudos indicam a existência de apenas uma classe de receptor, com uma constante de dissociação (Kd) da ordem de 10⁻⁷M, com cooperatividade negativa entre estes, enquanto que outros sugerem a presença de dois tipos de receptores:

um de alta ($K_d = 10^{-7}M$) e outro de baixa ($K_d = 1-5,6 \times 10^{-6}M$) afinidade^{3,26}.

Em condições fisiológicas, a melhoria dos receptores das plaquetas não-ativadas parece inacessível (ou não - disponível) ao Fg plasmático. Quando as plaquetas são ativadas por agonistas como o ADP, adrenalina, trombina, colágeno, endoperóxidos e ácido araquidônico, esses receptores tornam-se acessíveis (ou disponíveis) para a ligação com o Fg^{3,26,27}. Tem sido proposto que a exposição dos receptores do Fg é um mecanismo comum na regulação das funções plaquetárias. Este mecanismo envolve um aumento da concentração do cálcio livre do citoplasma e pode ser regulado pelo AMP cíclico³⁹. Essas postulações são apoiadas pelo achado indireto de que o cálcio-ionóforo A23187 é capaz de agir como agonista plaquetário⁴². Além disso, estudos efetuados com marcadores de cálcio (tais como a quin-2 e a aequorina) têm permitido estabelecer a concentração limiar aproximada de cálcio intracelular necessária à mudança de forma, agregação e secreção (reação de liberação). Deve ser ressaltado que, embora a ligação do Fg e a mudança de forma ocorram quase simultaneamente durante os estágios iniciais da agregação, tais processos são independentes. Realmente, baixas doses de citocalasina B, que inibem a polimerização da actina e a mudança de forma induzida pelo ADP, não inibem a ligação do Fg. Além disso, plaquetas tratadas com aspirina e estimuladas com adrenalina (provavelmente o único agonista que induz agregação sem induzir mudança de forma) ligam o Fg³.

Tem-se atualmente a idéia de que, após a estimulação, os receptores do Fg (complexos GP IIb/ IIIa) sofrem uma modificação conformacional (ou exposição) na intimidade da camada lipídica dupla da membrana plaquetária, passando a interagir com o Fg Plasmático. Essa interação parece dar-se tanto com uma parte da molécula do Fg localizada na porção carboxi-terminal da cadeia Y com a porção COOH terminal da cadeia Aa. É interessante ressaltar que a porção com terminal da cadeia Y contém sítios de ligação para o cálcio, o qual é também importante para a estabilidade do complexo GP IIb/ IIIa da membrana plaquetária^{3,26}. Estudos com plaquetas estimuladas com ADP e quimi tripsina revelaram também a importância do cálcio para a ligação do Fg ao receptor GP IIb/IIIa plaquetário²⁶.

A conversão do Fg em fragmento X (por ação da plasmina) resulta em perda parcial da capacidade de manter a agregação plaquetária^{3,26}. Como a cadeia Y permanece intacta no fragmento X, a porção exposta (à ação da plasmina) da cadeia Aa do Fg contém sítios de ligação com o receptor GP II/IIIa. Cadelas Aa, Bb e Y purificadas comportam-se de maneira diferente quanto à capacidade de sustentar a agregação plaquetária, quando comparadas com o Fg intacto: múltímeros da cadeia Y têm comportamentos similar, enquanto que os da cadeia Aa apresentam apenas

20 25% de atividade. Os múltímeros da cadeia BP são completamente inativos²⁹. Essas observações sugerem que a molécula do Fg pode conter dois sítios de ligação: um de alta afinidade, localizado na cadeia Y e um de baixa afinidade, na cadeia a^{3,26}.

Evidências recentes sugerem que um tripeptídeo com a seqüência Arg-Gly-Asp, presente na cadeia a do Fg, constitui o seu sítio de adesão ao receptor GP IIb/IIIa plaquetário. Essa mesma seqüência é encontrada nas moléculas da FN e da vitronectina (VN), constituindo-se no ponto de adesão de fibroblastos em cultura a estas proteínas⁴¹. Ao que parece, o receptor GP IIb/IIIa plaquetário tem a capacidade de reconhecer a seqüência Arg-Gly-Asp numa ampla variedade de proteínas adesivas, incluindo o Fg, a FN e a VN, diferindo do receptor dos fibroblastos que reconhece apenas as duas últimas proteínas. Por sua capacidade de ligar-se ao receptor GP IIb/IIIa, o Fg poderia formar pontes entre plaquetas adjacentes^{3, 26,41}. Por outro lado, tem-se demonstrado que o Fg é também um receptor para a TS endógena secretada pelas plaquetas ativadas^{6,7}. Isso favorece a idéia de que, durante a agregação, as plaquetas interagem entre si através de pontes de TS ancoradas nas moléculas do Fg ligadas ao receptor GP IIb/IIIa plaquetário. Entre outras, as seguintes evidências são favoráveis a essa hipótese:

a) Em ensaios de aglutinação de plaquetas fixadas pré-tratadas com trombina, tanto a TS como o Fg (um em presença de excesso do outro) agem como inibidores. Isto equivale a dizer que o excesso de Fg livre reage com a TS bloqueando a sua interação com o Fg ligado ao receptor GP IIb/IIIa. O mesmo raciocínio aplica-se quando há excesso de TS⁷.

b) Ensaios de hemaglutinação com hemácias de carneiro têm permitido conclusões similares⁷.

c) Estudos com outras proteínas liberadas dos grânulos alfa revelaram que nem a beta-tromboglobulina (B-TG), nem o fator de crescimento (mitogênico) derivado de plaquetas (PDGF), têm propriedades adesivas. Por outro lado, o fator plaquetário-4 (PF-4) possui propriedade aglutinante que difere da atividade adesiva da TS e da apresentada pelas plaquetas estimuladas pela trombina⁷.

d) Plaquetas de pacientes com a síndrome das plaquetas pardas ("gray platelet syndrome"), na qual há ausência de grânulos alfa e de seus constituintes (incluindo a TS), são deficientes em agregar-se por ação do ADP, trombina e colágeno⁴⁴.

Cabe salientar que a ligação do Fg ao receptor GP IIb/IIIa é tempo-dependente, e a fluidez da membrana, embora necessária, não parece ser o principal fator²⁶. Estudos com ¹²⁵I-Fg revelaram que a ligação inicial pode ser desfeita com EDTA ou com excesso de Fg não-marcado. Por outro lado, a ligação irreversível requer a participação de um CK ativo sendo que, mesmo neste caso, a molécula do Fg

é acessível à digestão pela plasmina, indicando que ela não é interiorizada^{3,26}. Finalmente, deve-se ressaltar que, embora a liberação de ADP (dos grânulos densos), TS e Fg (dos grânulos alfa), entre outros, sejam importantes na agregação secundária, a ligação irreversível do Fg ao receptor plaquetário independe da reação de liberação.

Das observações anteriores, pode-se concluir que a interação do Fg com o receptor GP IIb/IIIa desempenha um papel central na agregação plaquetária. Sendo um dímero (de 3 subunidades), a molécula do Fg pode formar pontes entre plaquetas adjacentes²⁶, além de servir de ponte de ancoramento para a TS liberada dos grânulos alfa das plaquetas ativadas. A TS, com um peso molecular de 450 kd é constituída de 3 subunidades (cada uma com peso molecular de 160 kd) ligadas por pontes dissulfeto. Sendo uma molécula multivalente, é capaz de ligar-se tanto ao Fg como ao seu receptor plaquetário (complexo GP IIb/IIIa), contribuindo para a formação de pontes assimétricas interplaquetárias. A figura 3 é uma representação esquemática de interações plaqueta-plaqueta envolvendo as moléculas do Fg e da TS.

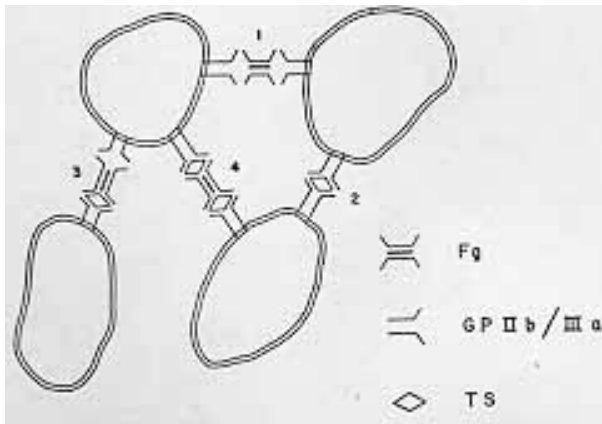


Fig. 3 - Representação esquemática de possíveis ligações do fibrinogênio (Fg) e trombospondina (TS) com receptor GP IIb/IIIa da superfície, na interação plaqueta-plaqueta (agregação).

INTERAÇÃO RECEPTOR DE MEMBRANA-CITOESQUELETO PLAQUETÁRIO

A explosiva organização do CX durante a ativação plaquetária, tem como elemento central a polimerização da actina, com a formação de microfilamentos e feixes de filamentos. Neste processo tomam parte, além das moléculas da própria actina, outras moléculas a ela associadas, tais como a A-BP, a alfa actina e a tropomiosina. A interação dos filamentos de actina com os de miosina previamente fosforilada resulta na contração dos elementos do CK³. A incorporação de várias proteínas dos grânulos alfa, tais como a FN, a TS e o PF-4, assim como de proteínas e lipídios de membrana (tais como Fg/fibrina, com plexo protrombinase e as GPs IIb, IIIa e Ib) ao CK parece fundamental para o desempenho das funções

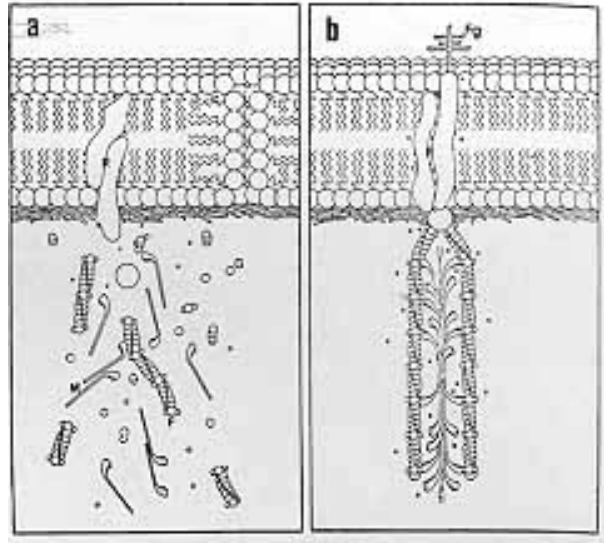


Fig. 4 - Representação esquemática da explosiva organização molecular que ocorre com os principais elementos do citoesqueleto (CK) quando a plaqueta passa da forma não ativada (a) para a forma ativada (b). Tal organização ocorre após a ação de um agonista, como a trombina, sob o qual o receptor GP IIb/IIIa (R) se torna acessível para a ligação com o fibrinogênio (Fg). A transdução do estímulo aos elementos do CK subjacente à membrana faz com que se forme uma ligação transmembrana que se conhece como "trombonexus", originando as estruturas filamentosas passíveis de contração. Tais estruturas basicamente resultam da organização das formas monoméricas de G - actina (G) em formas filamentosas de F-actina (F), assim como da formação de filamentos a partir das moléculas de miosina (M). Moléculas de outras proteínas, como a proteína da cabeça dos filamentos ("Filament Capping Protein"), que normalmente limita a polimerização da actina na plaqueta não-ativada, acham-se representadas.

hemostáticas. Baseado no modelo proposto por Tuszynski e col.^{11,12}, é possível uma visualização esquemática da interação entre o receptor do Fg e o CK (fig. 4). Após a ativação pela trombina, opera-se a modificação conformacional do complexo GP IIb/IIIa, tornando-o adequado à ligação com a molécula do Fg. Segue-se a transdução do estímulo aos elementos do CK subjacente, que se organizam a partir de uma ligação transmembrana "trombonexus" Fg-receptor CK, originando as estruturas filamentosas passíveis de contração. Várias questões básicas, tais como a própria exposição dos receptores do Fg, a ligação física das plaquetas nos agregados e a interação entre as plaquetas e as cadeias do Fg permanecem ainda sem resposta. Entretanto, com a disponibilidade de novas técnicas, especialmente as de visualização direta da topografia da membrana plaquetária e as técnicas imunológicas, tais questões podem ser resolvidas e novos dados incorporados ao modelo atual.

REFERÊNCIAS

1. Hemker, H. C.; van Rijn, J. L.; Rosing, J; van Dieijen. G.; Bevers, E. M.; Zwaal, R. F. A. - Platelet membrane Involvement in blood coagulation. *Blood Cells*, 9: 103, 1983.
2. Zucker, M. B. - The functioning of blood platelets. *Sci. Am.* 242: 86, 1980.
3. Peerschke, E. I. B. - The platelet fibrinogen receptor. *Sem Hematol.* 22: 241, 1985.

4. Wintrobe, M. M. - *Clinical Hematology*, 8th ed. Philadelphia. Lea & Febiger, 1981. p. 355.
5. Plow, E. F.; Ginsberg, M. H. - Specific and saturable binding of plasma fibronectin to thrombin stimulated platelets. *J. Biol. Chem.* 256: 9477, 1981.
6. Ginsberg, M. H.; Wolff, R.; Marguerie, G.; Collier, B.; McEver, R.; Plow, E. F. - Thrombospondin binding to thrombin-stimulated platelets: Evidence for a common protein binding mechanism. *Clin. Res.* 32: 308A, 1984.
7. Jaffe, E. A.; Leung, L. L. K.; Nachman, R. L.; Levin, R. I.; Mosher, D. D. - Thrombospondin is the endogenous lectin of human platelets. *Nature*, 295: 246, 1982.
8. Kaplan, K. L.; Brockman, M. J.; Chernoff, A. et al. - Platelet alpha granule proteins: Studies on release and subcellular localization. *Blood*, 53: 604, 1979.
9. Leung, L. L. K.; Polley, M.; Nachman, R. L. - The role of thrombospondin in platelet aggregation. *Blood*, 62: 261a, 1983.
10. Harlan, J. M.; Harker, I. A. - Hemostasis, thrombosis and thromboembolic disorders. *Med. Clin. N. Am.* 65: 855, 1981.
11. Tuszyński, G. P.; Daniel, J. L.; Stewart, G. - Association of proteins with the platelet cytoskeleton. *Sem Hematol*, 22: 303, 1985.
12. Solum, N. O. - Platelet membrane proteins. *Sem Hematol*. 22: 289, 1985.
13. Tuszyński, G. P.; Kornecki, E.; Clerniewski, C. S. et al. - Association of fibrin with the platelet cytoskeleton. *J. Biol. Chem.* 259: 5247, 1984.
14. Barber, A. J.; Jamieson, G. A. - Isolation and characterization of plasma membranes from human blood platelets. *J. Biol. Chem.* 245: 6357, 1970.
15. Gogstade, G. O.; Krutnes, M. B.; Hetland, O. et al. - Comparison of protein and lipid composition of the human platelet a - granule membranes and glycerol lysis membranes. *Biochem. Biophys. Acta*, 732: 519, 1983.
16. George, J. N.; Morgan, R. K.; Lewis, P. C. - Studies on platelet plasma membranes. IV. Quantitative analysis of platelet membrane glycoproteins by (¹²⁵I)- diazotized dilodiosulfanilic acid labeling and SDS-popyacrilamide gel electrophoresis. *J. Lab. Clin. Med.* 92: 430, 1978.
17. Ganguly, P. - Binding of thrombin to functionally defective platelets: A hypothesis on the nature of the thrombin receptor. *Br. J. Hematol.* 37: 17, 1977.
18. Jamieson, G. A.; Okumura, T. - Reduced thrombin binding and aggregation in Bernard-Soulier platelets. *J. Clin. Invest.* 61: 861, 1978.
19. Jenkis, C. S. P.; Phillips, D. R.; Clemetson, K. J. et al. -Platelet membranes glycoproteins implicated in ristocetin-induced aggregation. Studies of the proteins on platelets from patients with Bernard-Soulier Syndrome and von Willebrand's disease. *J. Clin. Invest.* 57: 112, 1976.
20. Phillips, D. R.; Poh Agin, P. - Platelet plasma membrane glycoproteins. Evidence for the presence of nonequivalent disulfide bonds using nonreduced-reduced two-dimensional gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 252: 2121, 1977.
21. Marchesi, S. L.; Chasis, J. A. - Isolation of human platelet glycoproteins. *Biochim. Biophys. Acta*, 555: 442, 1979.
22. Solum, N. O.; Olsen, T. M. - Glycoprotein Ib in the triton - insoluble (cytoskeletal) fraction of blood platelets. *Biochim. Biophys. Acta*, 799: 209, 1984.
23. Furlan, M. - Factor VIII/von Willebrand factor: a multivalent ligand binding to platelets and collagen. *Blut*, 52: 329, 1986.
24. Bolhuis, P. A.; Sakariassen, K. S.; Sander, H. J. et al. - Binding of factor VIII-von Willebrand factor to human arterial subendothelium precedes increased platelet adhesion and enhances platelet spreading. *J. Lab. Clin. Med.* 97: 668, 1981.
25. Houdijk, W. P. M.; Schiphorst, M. E.; Sixma, J. J. - Identification and functional domains on von Willebrand factor by binding of tryptic fragments to collagen and to platelets in the presence of ristocetin. *Blood*, 67: 1498, 1986.
26. Niewiarowski, S.; Kornecki, E.; Budzynskii, A. Z. et al. - Fibrinogen interaction with platelet receptors. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 408: 536, 1983.
27. Peerschke, E. I.; Zucker, M. B.; Grant, R. A.; Egan, J. J.; Johnson, M. M. - Correlation between fibrinogen binding to human platelets and platelet aggregability. *Blood*, 55: 841, 1980.
28. Bennet, J. S.; Villaire, G.; Cines, D. B. - Identification of the fibrinogen receptor on human platelets by photoaffinity labeling. *J. Biol. Chem.* 257: 8049, 1982.
29. Hawiger, J.; Timmons, S.; Kloczewrak, M. et al. - Gamma and alpha chains of human fibrinogen possess sites reactive with human platelet receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 79: 2068, 1982.
30. Nurden, A. T.; Caen, J. P. - An abnormal platelet glycoprotein patterns in three cases of Glanzmann's thrombasthenia. *Br. J. Haematol.* 28: 253, 1974.
31. Gogstad, G. O.; Krutnes, M. B.; Solum, N. O. - Calcium binding proteins from human platelets. A study using crossed immunoelectrophoresis and ⁴⁵Ca²⁺. *Eur. J. Biochem.* 133: 193, 1983.
32. Pidard, D.; Montgomery, R. R.; Bennett, J. S. et al. - Interaction of AP-2, a monoclonal antibody specific for the human platelet glycoprotein IIb/IIIa complex, with intact platelets. *J. Biol. Chem.* 258: 12582, 1983.
33. Berndt, M. C.; Phillips, D. R. - Purification and preliminary physicochemical characterization of human platelet membrane glycoprotein V. *J. Bio. Chem.* 256: 59, 1981.
34. Berndt, M. C.; Phillips, D. R. - Interaction of thrombin with platelets: Purification of the thrombin substrate. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 270: 87, 1981.
35. Yu, J.; Fischman, D. A.; Steak, T. L. - Selective solubilization of proteins and phospholipids of blood cell membranes by nonionic detergents. *J. Supramol. Struct.* 1: 233, 1973.
36. Wolosewick, J. J.; Porter, K. R. - Microtubular lattice of the cytoplasmic ground substance. *J. Cell. Biol.* 82: 114, 1979.
37. Fox, J. E. B.; Boyles, J. K.; Reynolds, C. C.; Phillips, D. R. - Actin filament content and organization in unstimulated platelets. *J. Cell Biol.* 98: 1985, 1984.
38. Pribluda, V.; Potman, A. - The state of actin in activated human platelets. *Eur. J. Biochem.* 116: 293, 1981.
39. Singer, I. I. - The fibronexus. A transmembrane association of fibronectin-containing fibers and bundles of 5nm microfilaments in hamster and human fibroblasts. *Cell*, 16: 675, 1979.
40. Fox, J. E. B.; Phillips, D. R. - Polymerization and organization of actin filaments within platelets. *Sern Hematol.* 20: 243, 1983.
41. Pytela, R.; Pierschbacher, M. D.; Ginsberg, M. H.; Plow, E. F.; Ruoslahti, E. - Platelet membrane glycoprotein IIb/ IIIa: Member of a family of Arg-Gly-Asp-specific adhesion receptors. *Science*, 231: 1559, 1986.
42. Pieter, G.; Cherel, G.; Marguerie, G. et al. - Inhibition of von Willebrand factor-platelet interaction by fibrinogen. *Nature*, 308: 648, 1984.
43. Moon, D. G.; Kaplan, G. E. - Plasma fibronectin inhibition of collagen and ADP-induced aggregation. *Fed. Proc.* 40: 768a, 1981.
44. Gerrard, J. M.; Phillips, D. R.; Rao, G. H. R.; Plow, E. F.; Walz, D. A.; Ross, R.; Harker, L. A.; White, J. G. - Biochemical studies of two patients with the gray platelet syndrome. *J. Clin. Invest.* 66: 102, 1980.