

## BASES BIOQUÍMICAS DA ATIVIDADE PLAQUETÁRIA NA HEMOSTASIA E NA TROMBOGÊNESE. PARTE III

PEDRO JOSÉ DE ALMEIDA \*, JOSÉ GUILHERME PINHEIRO PIRES \*, ADÉRCIO JOÃO MARQUEZINI \*

Vários aspectos bioquímicos básicos da atividade plaquetária foram discutidos nas duas partes anteriores deste trabalho<sup>1,2</sup>. Nessa parte procuramos revisar em bases bioquímicas alguns aspectos das respostas funcionais, abrangendo a adesividade, peculiaridades da agregação induzida por diferentes agonistas e as interações plaquetárias com moléculas de outros sistemas que particularmente interessem à farmacologia molecular.

### ADESIVIDADE COMO PROCESSO DE INTERAÇÃO PLAQUETA-VASO

Pela técnica de Baumgartner e col., foi possível demonstrar que, no endotélio da aorta de coelho exposto a sangue total anticoagulado, a adesividade inicial das plaquetas às fibras colágenas pode ser claramente diferenciada das interações “plaqueta-plaqueta” subseqüentes que contribuem para a formação do tampão hemostático, ponto central da hemostasia primária<sup>3,4</sup>. Vários estudos desde então foram dirigidos no sentido de definir os elementos do colágeno bruto que seriam essenciais para a adesividade das plaquetas ao subendotélio. É interessante salientar que, se por um lado alguns elementos do colágeno bruto favorecem a adesividade, por outro, alguns componentes parecem atuar em sentido oposto. Realmente, um nonapeptídeo sintético originalmente derivado do colágeno tipo III (característico do subendotélio arterial) exerce moderada inibição sobre a adesividade, inibindo especialmente também a agregação e a secreção induzidas pelo colágeno natural do mesmo tipo.

Múltiplos problemas surgem quando a adesividade é examinada “in vitro”. A complexidade da matriz extracelular, com a possibilidade de várias proteínas estarem envolvidas no processo, é apenas um dos itens que têm dificultado a análise das interações bioquímicas<sup>6</sup>. Outras dificuldades são acrescidas pela falta de uniformização quanto à origem e condições do colágeno (ou de seus extratos fibrilares e microfibrilares) utilizado na experimentação<sup>7</sup>. Apesar disso, muitos fatos parecem já estabelecidos. Assim é que, enquanto a eficácia do colágeno (ou de seus extratos) insolúvel

(de forma natural ou por meios químicos) é incontestável, os resultados com as preocupações solúveis são conflitantes. Por exemplo, altas concentrações de gelatina ou de formas monoméricas de colágenos tipo I solubilizado pela pepsina, são incapazes de iniciar a agregação plaquetária (a adesividade seria a primeira etapa da agregação) como também inibem a sua indução por pequenas quantidades (12 µg/ml) de colágeno fibrilar tipo I insolúvel. Essas observações parecem também concordar com o fato de que microfibrilas extraídas da placenta humana e de aorta bovina promovem ativação plaquetária quando incubadas e sonicadas sob condições padronizadas. Tais microfibrilas são altamente insolúveis (formando aglomerados em soluções aquosas) sendo que o recurso de sonicação é usado para mantê-las dispersas. É interessante lembrar que as microfibrilas, incluindo aquelas associadas à elastina, assim como várias outras proteínas microfibrilares, são amplamente distribuídas em muitos órgãos e tecidos, integrando o tecido conjuntivo frouxo, como aquele encontrado na placenta. Elas têm um diâmetro médio de 12 nm, não apresentam o padrão repetitivo de estriações transversais (a cada 67 nm), e são resistentes à ação da collagenase. Por outro lado, as microfibrilas extraídas da aorta contêm poucos resíduos de hidroxiprolina (cerca de 0,7%) e apresentam uma glicoproteína resistente à collagenase (GP 128), possivelmente envolvida em sua interação com as plaquetas<sup>8</sup>. É interessante ressaltar que essa GP tem similaridade estrutural com a trombospondina (TS).

Outro fato estabelecido é o de que a adesividade de plaquetas ao endotélio lesado quer a presença do fator de von Willebrand (vWF). Realmente, o vWF é essencial para a adesividade plaquetária ao subendotélio, ao colágeno purificado e às microfibrilas. Para condições de altas taxas de fluxo laminar, a importância do vWF para a adesividade tem sido particularmente ressaltada<sup>9</sup>. Como a quantidade de microfibrilas é particularmente maior nos pequenos vasos, onde as maiores taxas de fluxo laminar se verificam, tem-se sugerido que a interação plaquetas-microfibrilas seja especialmente importante na microcirculação, do mesmo modo que a interação plaqueta-colágeno seja prevalente nos grandes vasos<sup>10</sup>.

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

O vWF é uma macromolécula glicoprotéica multimérica (presente no plasma normal onde forma com plexo com o fator VIII), com peso molecular que varia de 1 a 15 x 10<sup>6</sup> daltons, constituída de vários dímeros (de cadeias de peso molecular aproximado de 250.000), ligados por pontes dissulfeto. Sua síntese dá-se nas células endotéliais e nos megacariócitos, sendo encontrado no plasma, nas plaquetas (nos grânulos alfa ou absorvidos à superfície) e no colágeno subendotelial exposto<sup>10-12</sup>. A importância relativa do vWF encontrado nesses locais para a adesividade ainda não foi definida<sup>13, 14</sup>. Conforme foi salientado em trabalho anterior, o vWF liga-se à glicoproteína (GP) Ib (na presença de ristocetina) e ao complexo GP IIB/IIIa, sendo que o eixo GP Ib plaquetário vWF do subendotélio tem sido postulado como o mais importante na adesividade. Ao que parece, a ligação do vWF ao subendotélio precede a adesão das plaquetas, indicando que essa ocorre através do vWF ligado. Por um lado, o vWF liga-se às plaquetas através da GP Ib (ausente na síndrome de Bernard-Soulier), por outro liga-se ao colágeno ou ao subendotélio, funcionando assim como um mediador da interação plaqueta vaso<sup>14</sup>.

As tentativas de identificação e caracterização dos domínios da molécula multimérica do vWF implicadas nessas interações estão atualmente em estado avançado. Através da digestão triptica da molécula, combinado com o uso de anticorpos específicos capazes de inibir a ligação do vWF às plaquetas (em presença de ristocetina) ou ao colágeno, foi possível a identificação de dois tipos de fragmentos: um de 116 kdaltons que se liga a plaquetas em presença de ristocetina, e outro de 48 kdaltons, que se liga a fibrilas do colágeno tipo III<sup>14</sup>. Por outro lado, estudos de clivagem da molécula do vWF pela protease V 8 do *S.aureus* levou à obtenção de dois fragmentos diméricos complementares: o fragmento III (SP III), compreendendo a porção N-terminal da subunidade do vWF, com um peso molecular de 320 kdaltons, o qual se liga à GP Ib na presença de ristocetina, e o fragmento II (SP II) compreendendo a extremidade C terminal da subunidade, com peso molecular de 215 kdaltons, o qual se liga à GP IIB/IIIa, na presença de trombina. Em situação experimental na qual se empregaram altas taxas de fluxo laminar, o fragmento SP III atuou como mediador da adesão de plaquetas ao colágeno (de maneira similar à da molécula do vWF intacta), enquanto que o fragmento SP II não teve efeito<sup>13</sup>. Portanto, ao que parece, o fragmento SP III contém tanto o domínio para a ligação com a GP Ib da membrana plaquetária como o domínio para a ligação com o colágeno, sendo que ambos os domínios parecem ser indispensáveis para a interação plaqueta-colágenos em condições de altas taxas de fluxo laminar.

#### PECULIARIDADES DA AGREGAÇÃO INDUZIDA POR DIFERENTES AGONISTAS

A adesividade, vista como um processo fisiológico da interação plaqueta vaso, pode ser considerada a

primeira de várias etapas simultâneas e/ou rapidamente sucessivas que se conhece pela denominação de agregação plaquetária. Entretanto, em sentido estrito, essa deve ser utilizada para designar apenas as etapas envolvidas na interação plaqueta-plaqueta.

Diferentes agonistas induzem agregação por mecanismos diversos, muitos dos quais ainda não totalmente esclarecidos. Praticamente todos os agonistas agregantes aumentam a concentração intracelular de íons cálcio, seja por aumento do influxo transmembrana, seja por liberação do íon de seus estoques intraplaquetários<sup>15,16</sup>. Presume-se assim que o cálcio citoplasmático tenha um papel regulador da ativação plaquetária (análogo à regulação da contração muscular), embora a ativação não seja normalmente precedida de um influxo de cálcio extracelular. Vários estudos parecem indicar que os grânulos (densos) de estoques constituem o principal "pool" de cálcio intraplaquetário. Estima-se que cerca de 60-70% desse cálcio fisiologicamente seqüestrado sejam liberados em resposta a vários agonistas<sup>15</sup>. Por outro lado, estudo recente parece indicar que as glicosaminoglicanas que revestem a membrana plaquetária funcionam como verdadeiro "pool" externo de cálcio, que pode ser mobilizado na ausência de cálcio extracelular<sup>16</sup>, assegurando a concentração intraplaquetária do íon necessária à agregação. Estudos de cinética de mobilização do cálcio dos estoques intraplaquetários induzida por diferentes agonistas revelaram diferenças marcantes, especialmente em relação ao curso temporal<sup>17</sup>.

Cabe ainda ressaltar que a agregação envolve várias vias de ativação plaquetária (fig. 1). Além disso, as interações entre as várias vias durante a estimulação plaquetária são complexas e cada via pode ter graus variáveis de importância não só em si mesma, mas também em relação à disponibilidade das outras.

**Colágeno** - É talvez o mais importante agonista fisiológico. Diferenças acentuadas existem em relação às condições e ao tipo de colágeno utilizado como agonista na agregação. Ressaltamos aqui algumas características da agregação induzida por microfibrilas oriundas de placenta e aorta em comparação com a induzida pelo colágeno fibrilar tipo III<sup>7</sup>. O curso temporal da agregação induzida por estes três agonistas, especialmente os tempos de latência e de agregação completa, acham-se sumarizados na tabela I. Pode-se notar que a agregação por microfibrilas; (especialmente as oriundas de placenta) ocorre de modo muito rápido. Tal agregação é cálcio-dependente, além de ser vinculada à liberação de ADP plaquetário e à ativação da via da ciclooxigenase com produção final de tromboxane-A (TXA<sub>2</sub>), pois é abolida respectivamente pelo EDTA, pelo sistema depletor de ADP e pela aspirina<sup>8</sup>. Em relação à secreção, tanto as microfibrilas como o colágeno liberam cerca de 60% de beta-tromboglobulina (BTG) e ADP (comparado com 100% obtidos quando as plaquetas são lisadas pelo Triton X 100 a 1%) em cerca de 3 minutos. Entretanto, a cinética da

secreção induzida por microfibrilas é diferente da do colágeno; as primeiras têm efeito muito mais rápido. Achados cinéticos similares foram observados para a formação do tromboxane-B<sub>2</sub> (TXB<sub>2</sub>), um metabólito do TXA<sub>2</sub><sup>8</sup>.

Fortes argumentos existem em favor da participação do fator de von Willebrand (vWF) na interação das plaquetas com as microfibrilas, entre eles, o fato de que plaquetas normais suspensas em plasmas pobres em plaquetas oriundo de pacientes com a forma grave da doença de von Willebrand, não se agregam pelas microfibrilas, porém isso ocorre após alguns minutos da transfusão do crioprecipitado ao paciente<sup>18</sup>.

**Trombina** - A importância fisiológica da trombina como agonista da agregação plaquetária reside especialmente em sua capacidade de atuar por diversos mecanismos interdependentes. Apesar de interagir com a glicoproteína (GP) Ib e com a GP V na membrana plaquetária, outros receptores para essa protease parecem existir, sobretudo pelo fato de que plaquetas de pacientes com a síndrome de Bernard- Sou-

lier (na qual há deficiência de GP Ib, GP V e GP IX) agregam se, por ação da trombina, mesmo nos casos em que essas não se aglutinam na presença de vWF<sup>1</sup>. A ativação da fosfolipase C (PLC), com produção de diacilglicerol (DAG) e 1, 4, 5-inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>) pela hidrólise do fosfatidil inositol-4,5 bifosfato (PIP<sub>2</sub>), é um dos possíveis meios pelos quais a trombina induz agregação (fig. 2). Por outro lado, o IP<sub>3</sub>, o ácido lisofosfatídico e o ácido fosfatídico são os prováveis mensageiros intraplaquetários, mobilizando o Ca<sup>++</sup> dos seus sítios de estoque, aumentando assim o Ca<sup>++</sup> livre e induzindo à contração do CK com liberação do conteúdo dos grânulos, indispensável à agregação secundária irreversível). Além disso, a partir do fosfatidil inositol, a ativação da PLC também leva à produção de DAG (fig. 2), o qual, além de ser fosforilado (por ação da DAG quinase) originando o ácido fosfatídico, é por si mesmo, o ativador da proteína quinase C. Essa última, quando ativada, age fosforilando o par de cadeias leves de 20 kd da miosina (MLC 20kd), num sítio diferente daquele que é normalmente fosforilado por ação da quinase específica (MLC 20kd quinase).

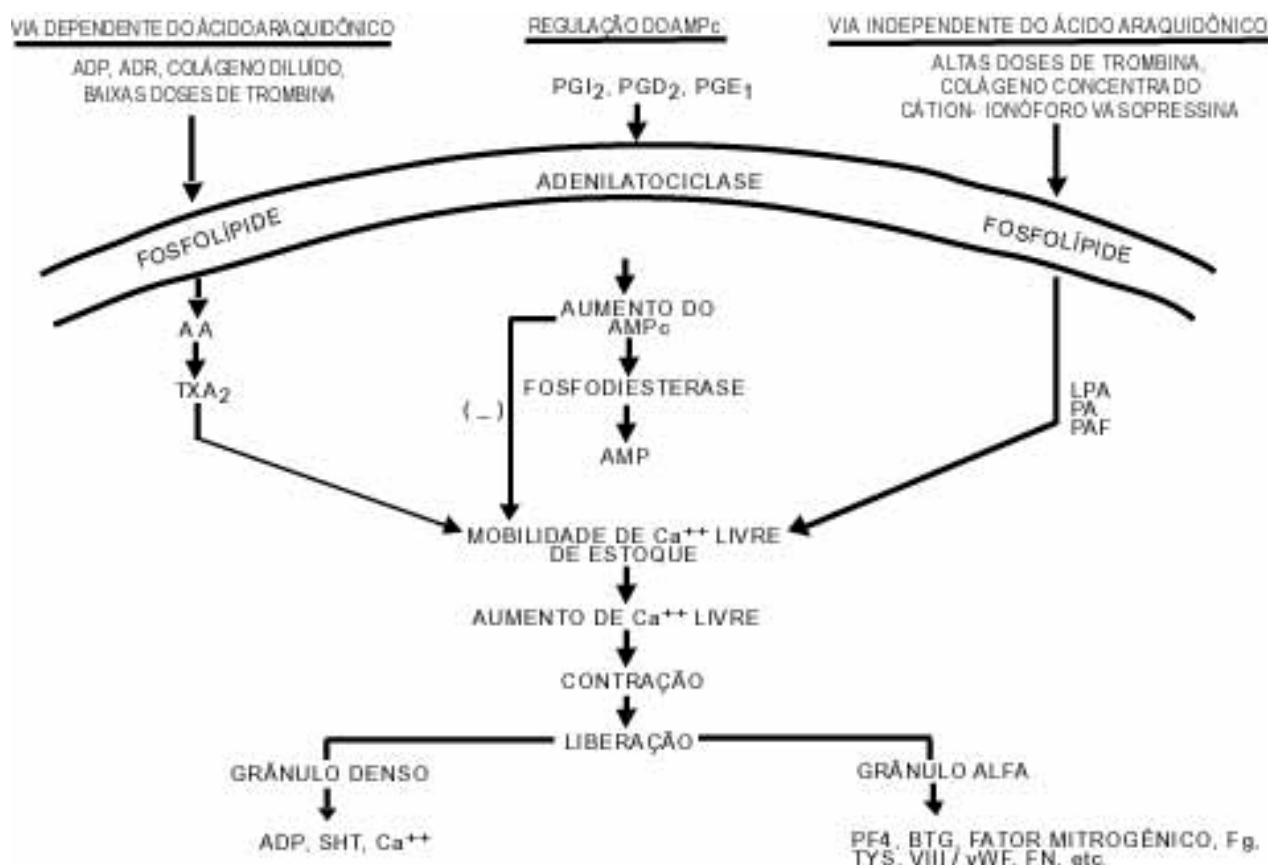


Fig. 1 - Mecanismos ou vias de agregação (e liberação) plaquetária. Pela via dependente do ácido araquidônico (AA) a estimulação plaquetária por alguns agonistas (ADP, adrenalina, colágeno diluído e baixas doses de trombina), através da ativação das fosfolipases da membrana, levam à liberação do AA e à formação de tromboxane A (TXA<sub>2</sub>). O TXA<sub>2</sub> mobiliza Ca<sup>++</sup> de seus sítios de estoque (grânulos densos), aumentando o Ca<sup>++</sup> livre que desencadeia a contração do citoesqueleto, iniciando a liberação. Por outro lado, o aumento de Ca<sup>++</sup> livre estimula a atividade fosfolipásica, amplificando o processo (não representado na figura). Por uma via independente do AA, outros agonistas (trombina em altas doses,

colágeno concentrado, cátion-ionóforos e vasopressina) desencadeiam a mobilização de Ca<sup>++</sup>, envolvendo outros produtos oriundos da ativação das fosfolipases (tais como ácido lisofosfatídico (LPA), o ácido fosfatídico (PA) e o fator ativador plaquetário (PAF). A elevação do AMPc oriundo da ativação da adenilato ciclase por agonistas, como as prostaglandinas PGI<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub> e PGE<sub>1</sub>, inibe a mobilização de Ca<sup>++</sup> dos seus sítios de estoque. Para maiores detalhes sobre as vias ou mecanismos aqui representados, ver também as figuras 2,3 e 5.

A miosina fosforilada, com sua atividade ATP-ásica, libera energia pela hidrólise do ATP, que é utilizada na interação actina-miosina, resultando na contração do citoesqueleto (CK) (fig. 2). Adicionalmente, a ativação da fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) pela trombina aciona tanto a conversão do ácido fosfatídico em ácido lisofosfatídico (esse com maior atividade mobilizadora de cálcio e agregante do que o primeiro), como também origina o ácido araquidônico (AA), a partir da fosfatidil-etanolamina e da fosfatidil-colina (fig. 3). O AA constitui-se no substrato da ciclooxygenase para a produção de endoperóxidos (PGG<sub>2</sub>, PGH<sub>2</sub>) e TXA<sub>2</sub>.

Vê-se, assim, a grande interdependência e complexidade dos mecanismos envolvidos na agregação induzida pela trombina. Isso concorda com os achados de que, na dependência de um escalonamento adequado de doses, a trombina pode ativar as plaquetas de

modo a se obter desde uma resposta de mudança de forma, até uma resposta de agregação completa irreversível, passando por respostas reversíveis intermediárias (fig. 4). Por outro lado, esses achados parecem também concordar com a idéia de que, na dependência da dose, a trombina poderia atuar tanto por via dependente, como por via independente do AA (fig. 1).

**TABELA I - Tempos de latência e de agregação completa induzida por microfibrilas (de placenta e aorta) e colágeno tipo III (8).**

| Material                  | Latência (s) | Agregação completa (s) |
|---------------------------|--------------|------------------------|
| Microfibrilas de placenta | 30           | 75                     |
| Microfibrilas de aorta.   | 60           | 90                     |
| Colágeno tipo III         | 90           | 150                    |

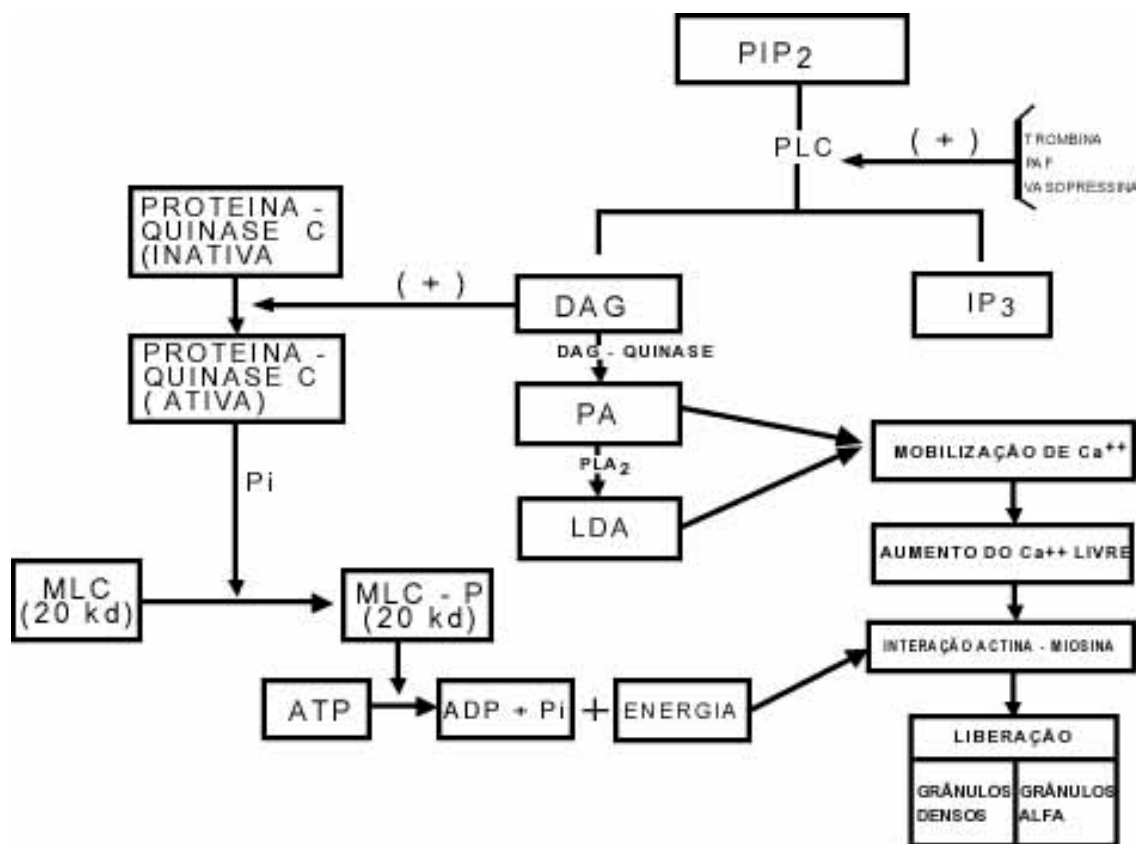


Fig. 2 - Alguns dos possíveis mecanismos envolvidos na agregação induzida pela trombina (assim como pelo fator ativador plaquetário (PAF) e pela vasopressina). Abreviaturas (retirar da tabela geral de abreviaturas). Para detalhes, ver o texto e a figura 3.

Tais considerações são úteis na interpretação de alguns achados experimentais que dizem respeito à ação da trombina: a) independe da liberação de ADP; b) não é afetada pela inibição da ciclooxygenase; c) age mesmo na ausência de fibrinogênio exógeno; d) não depende de Ca<sup>++</sup> externo<sup>19</sup> e, e) desloca o equilí-

brio G-actina ↔ F-actina na direção dessa última, de maneira abrupta e fugaz, mesmo antes de iniciar a agregação<sup>19,20</sup>

Merece ainda algum comentário o papel do cálcio e da alcalinização citoplasmática como fatores reguladores da atividade da PLA<sub>2</sub> induzida por alguns agonistas, inclusive a trombina. Evidências de que a PLA<sub>2</sub> tem um pH ótimo de atividade em pH alcalino e que é ativada, em plaquetas intactas, pelo ionóforo

A23187, concordam com os achados de que a alcalinização citoplasmática (seja por ativação do intercâmbio  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  ou pelo tratamento com metilamina) aumenta a sensibilidade de PLA à ação do A23187, sugerindo que a presença de  $\text{Ca}^{++}$  e a mudança de pH podem agir sinergicamente na atividade da enzima ativação da PLA (e da PLC) pela trombina faz-se mesmo quando o intercâmbio  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  é bloqueado. Deve-se ressaltar que ativação da PLC precede a da PLA em plaquetas estimuladas pela trombina. Tem-se, assim, a sugestão de que doses altas de trombina, determinando mobilização suficiente de  $\text{Ca}^{++}$  (pelas ações do DAG e do IP, oriundos da atividade da PLC), ativariam a PLA mesmo na ausência de um pH ótimo. Tal ação seria ainda favorecida pela função ativadora do DAG sobre o intercâmbio  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ . Por outro lado, a ativação plaquetária por baixas doses de trombina necessitaria de alcalinização apropriada proporcionada por um intercâmbio  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  ativo<sup>21</sup>.

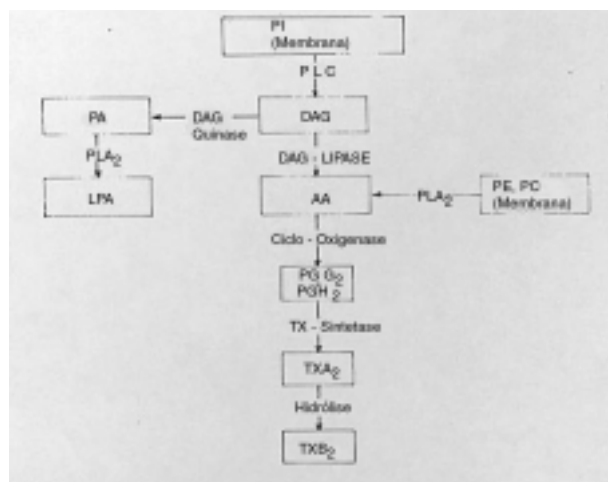


Fig. 3 - Vias de liberação do ácido araquidônico (AA), ácido fosfatídico (PA) e ácido lisofosfatídico (LPA), a partir do fosfatidil inositol (PI), fosfatidiletanolamina (PE) e fosfatidilcolina (PC) da membrana, através da ativação das fosfolipases C (PLC) e A (PLA) envolvendo outros sistemas enzimáticos tais como o da DAG quinase, DAG lipase, ciclooxigenase e tromboxane (TX) sintetase, com produção final de  $\text{TXA}_2$ , o mais potente agregante conhecido. A hidrólise (não enzimática) do  $\text{TXA}_2$  leva ao metabólito inativo  $\text{TXB}_2$ .

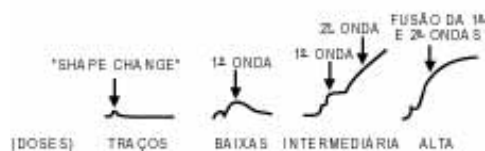


Fig. 4 - Características da agregação induzida pela trombina em doses escalonadas, desde traços até altas doses (passando por doses baixas e intermediárias)<sup>24</sup>. A agregação primária (reversível) é obtida até o limite das doses baixas. A partir das doses intermediárias, a primeira onda (agregação primária ou reversível) é seguida da segunda (agregação secundária ou irreversível), sendo que ambas as ondas se acham fundidas em altas doses.

**Difosfato de adenosina (ADP)** - Comparado à trombina e ao colágeno, o ADP pode ser considerado

um agonista fisiológico de baixa potência. Age através de um receptor de membrana, possivelmente uma variedade de receptor purinérgico diferente dos receptores de trifosfato de adenosina (ATP) e de adenosina<sup>22</sup>. A interação ADP-receptor mobiliza os sítios de ligação do Fg (receptor GP IIb/IIIa), levando à formação de pontes interplaquetárias que dependem da presença de  $\text{Ca}^{++}$ . O ADP ativa também a PLA, pela qual há a síntese de  $\text{TXA}_2$ , além de determinar um rápido influxo de  $\text{Ca}^{++}$  (possivelmente por ativação de um canal operado por receptor), seguido de uma mobilização interna de  $\text{Ca}^{++}$  dos seus sítios de estoque. Esses dois mecanismos contribuem para a elevação do  $\text{Ca}^{++}$  livre citoplasmático<sup>17</sup>, o que é favorecido por uma ação redutora dos níveis de AMPc pelo ADP. Essa última não parece depender de qualquer ação do ADP sobre a atividade da adenilato ciclase ou da fosfodiesterase<sup>11</sup> (fig. 5). Se, por um lado, o influxo de  $\text{Ca}^{++}$  transmembrana determinado pelo ADP é cerca de 12 vezes mais rápido do que o determinado pela trombina<sup>17</sup>, por outro, a mobilização de actina (da forma G actina - F-actina) determinada pelo ADP, é mais lenta do que a determinada pela trombina; porém, com ambos os agonistas, a mobilização de actina sempre precede a secreção e a agregação<sup>19</sup>.

**Fator Ativador Plaquetário (PAF)** - O PAF, ou acetil gliceril-éster-fosforilcolina (AGEPC), é um produto do metabolismo do AA. A agregação plaquetária por ele induzida está primordialmente relacionada à ativação da PLC, com a conseqüente produção de DAG e  $\text{IP}_3$  (ver figura 2). Adicionalmente, a agregação primária reversível induzida pelo PAF (em doses liminares) pode ser potencializada por doses liminares de ADP. Isto sugere que o ADP endógeno é um mediador de amplificação da resposta primária do PAF, levando à agregação secundária (irreversível). Este papel amplificador do ADP é modulado pela disponibilidade de metabólitos da via da ciclooxigenase<sup>23</sup>.

**Adrenalina** - Induz à agregação plaquetária por ação sobre receptores do subtipo alfa - adrenérgico (ver adiante). Essa interação adrenalina-receptor induz agregação reversível mediada pelo ADP, que "expõe" os receptores do Fg, levando à formação de pontes interplaquetárias,<sup>1,24</sup>. A adrenalina também produz uma redução dos níveis de AMPc (fig. 5). É um dos únicos agonistas capazes de induzir agregação sem provocar mudança de forma. A concentração de adrenalina necessária para produzir agregação "in vitro" é muito maior do que aquela encontrada normalmente na circulação. Entretanto, ela poderia agir "in vivo" sinergicamente com outros agonistas<sup>24</sup>.

**Forbol-Ésteres** - Algumas peculiaridades dos forbol-ésteres, especialmente as do 12-O-tetradecanoilphorbol 13-acetado (TPA) e de alguns 12-deoxi análogos merecem ser mencionadas. Admite-se que o TPA atue mimetizando o DAG como ativador fisiológico da proteína quinase C, responsável pela fosforilação da MLC-20kd, em um sítio distinto daquele que



é fosforilado pela MLC quinase. Realmente, o TPA distingue-se dos outros agonistas por induzir liberação dos grânulos densos sem elevação do  $Ca^{++}$  livre intracelular. Embora atue sinergicamente com o ionóforo A23187 produzindo uma agregação semelhante à induzida pela trombina, o TPA pode bloquear a elevação do  $Ca^{++}$  livre, o metabolismo dos fosfoinosi-

titios e a liberação de 5 hidroxitriptamina (serotonina) induzida por outros agonistas. Isto tem levado à suposição de que a proteína quinase C seja o agente modulador dos fluxos de  $Ca^{++}$  operados por receptores nas plaquetas humanas<sup>25</sup>. Assim, essa enzima atuaria tanto iniciando, como limitando a ativação plaquetária.

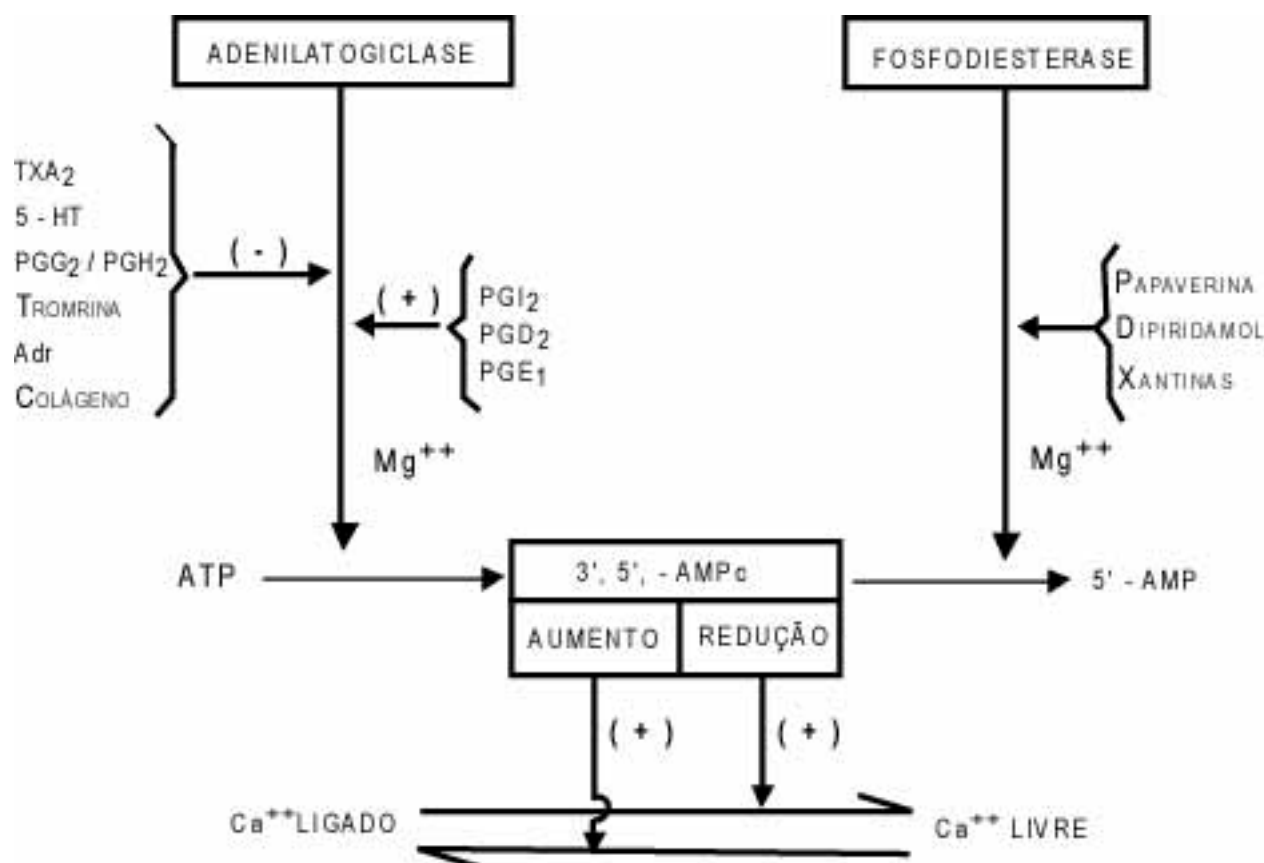


Fig. 5 - Mecanismos envolvidos na liberação do  $Ca^{++}$  plaquetário envolvendo a produção do AMPc. O aumento do AMPc ser verificado pela ativação do sistema da adenilato ciclase Mg-dependente por agonistas como as prostaglandinas PGI<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub> e PGE<sub>1</sub>. Aumento do AMPc também se verifica por ação de agentes inibidores da fósodiesterase (tais como a papaverina, o dipiradamol e as xantinas), enzima normalmente encarregada da metabolização do 3',5'-AMPc. Por outro lado, agentes capazes de inibir o sistema da adenilato ciclase (tais como o tromboxano A (TXA<sub>2</sub>), 5-hidroxitriptamina (5-HT), PGG<sub>2</sub>/PGH<sub>2</sub>, trombina, adrenalina e colágeno), reduzem o conteúdo de AMPc, o que contribui para o aumento de  $Ca^{++}$  ligado em seus sítios de estoque.

### PARTE III

Abreviaturas Usadas no Texto

AA = Ácido araquidônico

ADP = Difosfato de adenosina

Adr = Adrenalina

AGEPC = Acetil gliceril éster fosforil colina

AMPc = 3', 5'- monofosfato de adenosina (AMP cíclico)

ATP = Trifosfato de adenosina

BTG = beta-tromboglobulina

CK = Citoesqueleto

DAG = Diacil glicerol

Fg = Fibrinogênio

GP = Glicoproteína

HDL = lipoproteína de alta densidade

HMWK = Cininogênio de alto peso molecular

5-HT = 5- hidroxitriptamina (serotonina)

IP = 1,4,5-inositol trifosfato

kd = Kilodaltons (1.000 daltons)

LDL = Lipoproteína de baixas densidade

LPA = Ácido lisofosfatídico

MDA = Dialdeído malônico

MCL-20 kd = Cadeira leve da miosina de 20.000 daltons

PA = Ácido fosfatídico

PAF = Platelet Activating Factor (Fator ativador plaquetário)

PGG<sub>2</sub>, PGH<sub>2</sub> = endoperóxidos

PGI<sub>2</sub> = Prostagliclina

PIP<sub>2</sub> = Fosfatidil inositol-4, 5-bifosfato

PLA = Fosfolipase A

PLC = Fosfolipase C

TPA = 12-O-tetradecanoilforbol-13acetato

TS = Trombospondina

TXA<sub>2</sub> = Tromboxano-A

TXB<sub>2</sub> = Tromboxano B

vWF = Fator de von Willebrand

**Ácido araquidônico e eicosanóides** - O AA induz à agregação independente ("by pass") da ativação da PLA, levando, como substrato da ciclooxigenase, à produção de endoperóxidos e de TXA<sub>2</sub>. A agregação

pelo AA é assim inibida pelos inibidores da ciclooxigenase. Por outro lado, os endoperóxidos (PGG / PGH ) também induzem à agregação não-bloqueada pelos inibidores da ciclooxigenase, mas inibida pelos inibidores da TX-sintetase <sup>24</sup>.

#### SÍTIOS PLAQUETÁRIOS DE LIGAÇÃO PARA MOLÉCULAS DE VÁRIOS SISTEMAS

**Coagulação fibrinolise** - Vários elos de ligação da atividade plaquetária com o sistema de coagulação sanguínea foram ressaltados nos parágrafos precedentes. Cabe aqui ressaltar algumas interações, especialmente as do fator XI (e XIA), do fator Xa e do plasminogênio com as plaquetas.

A ativação do fator XI, envolvendo o fator XII, a pré-caliceína (pré-K) e o cininogênio de alto peso molecular (H - IWI), tem sido objeto de intensiva investigação. Além do endotélio; propôs-se que a superfície das plaquetas ativadas pode servir como sítio de ativação do fator XI pelo sistema de contato. Experimentos usando fatores altamente purificados e plaquetas lavadas têm demonstrado a ativação do fator XII pela caliceína (K) plasmática, e a do fator XI pelo XIIa, na presença de plaquetas ativadas. Por outro lado, uma ligação de alta afinidade foi descrita entre o HMWK e plaquetas ativadas, para a qual a presença de íons zinco é indispensável. As evidências atuais são consistentes com um modelo no qual o fator XI liga-se ao HMWK que, por outro lado, se liga a receptores da superfície plaquetária. Em bases experimentais, acredita-se que o Ca<sup>++</sup> e o HMWK atuem sinergicamente no sentido, de favorecer a ligação do fator XI em concentrações fisiológicas de íons zinco. Esses dados favorecem a idéia de que a superfície da plaqueta ativada (uma superfície negativamente carregada) sirva como sítio para a formação e ativação do complexo fator contato, primeiro passo da ativação da via intrínseca da coagulação sanguínea <sup>26</sup>.

Certo paralelismo pode ser notado entre a ligação dos fatores XI e Xa às plaquetas- A ligação do fator Xa é favorecida pela presença do fator Va, um cofator não enzimático da ativação da protrombina pelo fator Xa, do mesmo modo que o HMWK seria para a ativação do fator -XI-pelo fator XIIa. Assim as plaquetas contribuem também como sítio de formação e ativação do complexo protombinase.

A íntima relação entre plaquetas e fibrina no interior de um trombo, aliada às evidências de interação do plasminogênio com as plaquetas, sugere a possibilidade de participação dessas na fibrinolise. A interação específica da forma nativa do plasminogênio com Plaquetas humanas não ativadas tem sido demonstrada. Tal ligação é quantitativamente aumentada cinco vezes quando as plaquetas são ativadas pela trombina. Estudo recente, analisando a ligação do plasminogênio a plaquetas de pacientes com afibrino-genemia, síndrome de plaquetas cinzentas e variante Cam de trombostenia

(uma forma de trombostenia com valores quase normais de GP IIB/IIIa) mostrou apenas um discreto aumento da ligação sob estimulação com trombina, ao lado de ligação inalterada em plaquetas não-estimuladas. Esse estudo parece indicar que a formação de fibrina na superfície plaquetária é necessária para a ligação do plasminogênio.

A grande redução da ligação a plaquetas trombostênicas, tanto estimuladas como não-estimuladas, leva à suposição de que o complexo GP IIB/IIIa pode ser o sítio de ligação para o plasminogênio. Em meio isento de cálcio, ou contendo EDTA, a ligação do plasminogênio a plaquetas não-estimuladas praticamente não se modifica, mas diminui a ligação a plaquetas estimuladas pela trombina. Isso sugere que a dissociação do complexo GP/ IIIa não interfere na ligação do plasminogênio às plaquetas não-estimuladas. Desses estudos pode-se deduzir que as plaquetas têm o potencial de facilitar a fibrinolise, posicionando o plasminogênio na intimidade do trombo, favorecendo sua ativação<sup>27</sup>.

**Sistema adrenérgico** - Preparações de membranas de plaquetas têm sido muito utilizadas para o estudo da densidade e propriedades de receptores adrenérgicos<sup>28</sup>. Com o advento de métodos diretos, envolvendo o uso de drogas marcadas com isótopos radioativos, foi possível caracterizar a afinidade, o número e os subtipos dos receptores alfa-adrenérgicos plaquetários. Usando a <sup>3</sup> H-dihidroergocriptina (<sup>3</sup> HDHE), um antagonista alfa com igual afinidade para ambos os subtipos (alfa<sup>1</sup> e alfa<sup>2</sup>), em competição com os antagonistas específicos, prazosin (alfa<sup>1</sup>) e ioimbina (alfa<sup>2</sup>) e o inespecífico fentolamina (alfa<sup>1</sup> e alfa<sup>2</sup>), foi possível demonstrar que a membrana plaquetária possui uma única classe homogênea de receptores alfa. Pelo fato de a ioimbina ser muito mais potente do que o prazosin no deslocamento competitivo da <sup>3</sup>HDHE, os receptores plaquetários foram identificados como do subtipo alfa<sup>2</sup>. Estudo recente <sup>28</sup>, usando a <sup>3</sup>H-ioimbina em competição com vários antagonistas não-marcados, confirma esse achado e demonstra a seguinte ordem de potência na inibição da droga marcada: ioimbina > fentolamina > fenoxibenzamina > corinantina > prazosin. Essa mesma ordem de potência foi verificada em relação à inibição da agregação induzida pela adrenalina (previamente incubada com ADP) em plaquetas de cão. Com o uso de isômeros da adrenalina, demonstrou-se que a ligação da <sup>3</sup> H-ioimbina ao receptor alfa, é estereoespecífica, uma vez que o levo-isômero é cerca de 6 vezes mais potente do que o dextro-isômero. Além disso, pelo fato de as curvas de competição (ou deslocamento da 3H-ioim bina) com agonistas diversos serem desviadas para a direita (no sentido das menores concentrações), em presença de nucleotídeos da adenina, supõe-se que tais substâncias tenham um papel regulador na função do receptor alfa, adrenérgico plaquetário.

Estas considerações, somadas aos achados de hipersensibilidade plaquetária à adrenalina em pacien-

tes com angina variante<sup>30</sup> e ao fato de que a fentolamina reverte o espasmo coronário durante estudos angiográficos<sup>31</sup>, parecem estabelecer um elo de ligação entre a atividade plaquetária e a cardiopatia isquêmica, especialmente a angina vasoespástica.

Evidências experimentais indicam que os receptores beta-adrenérgicos são irrelevantes para a atividade plaquetária. Por outro lado, alguns bloqueadores beta-adrenérgicos, como o labetalol (que além da atividade beta<sub>1</sub> e beta<sub>2</sub>, possui atividade alfa), o pindolol e o propranolol (que atuam em receptores beta<sub>1</sub> e beta<sub>2</sub>), inibem a agregação plaquetária e a produção de tromboxane-A<sub>2</sub> induzidas pelo colágeno, porém não interferem nesses mesmos fenômenos quando induzidos pelo AA.

As conclusões que parecem óbvias dos estudos com essas drogas são<sup>32</sup>: a) os efeitos inibitórios independem do bloqueio beta-adrenérgico, pois os dois isômeros do propranolol apresentam a mesma eficácia. Além disso, outras drogas como timolol, atenol, metoprolol e prazosin, que de certa forma atuam sobre os mesmos receptores, não têm efeitos inibitórios; b) os efeitos inibitórios parecem não depender das propriedades clássicas (atividade estabilizadora de membrana, atividade simpaticomimética intrínseca e lipossolubilidade) desses agentes; c) os efeitos inibitórios podem ser devidos à(s) ação(ões) dessas drogas sobre a atividade da fosfolipase A<sub>2</sub> na membrana plaquetária.

**Lipoproteínas plasmáticas** - Interações entre lipoproteínas e receptores plaquetários têm sido objeto de investigações nos últimos anos. Ligações de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e de lipoproteínas de alta densidade (HDL) em plaquetas isoladas têm sido descritas. Embora haja a hipótese da existência de sítios de alta e de baixa afinidade para as LDL, estudo recente sugere a presença de uma única classe de receptores para ambas as lipoproteínas. Ao que parece, somente as lipoproteínas intactas são capazes da interação, o que se faz independentemente da presença de cálcio e outros cátions divalentes<sup>33</sup>. Por outro lado, a significância dessas observações reside em achados de que as lipoproteínas endógenas modulam a formação dos metabólitos TXB<sub>2</sub> e dialdeído malônico (MDA), induzida tanto pela tromboxina (TXB<sub>2</sub>) e MDA como pelo endoperoxídeo PGH<sub>2</sub> (TXB<sub>2</sub>), sendo que as LDL estimulam e as HDL inibem. Assim, uma correlação positiva entre os níveis plasmáticos de LDL e a formação de TXB<sub>2</sub> e uma correlação negativa entre a concentração plasmática de HDL e a formação do metabólito pode favorecer a concepção do papel aterogênico das LDL e antiaterogênico das HDL<sup>34</sup>. Além disso, a inibição da produção de prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) pelas LDL e a sua ativação pelas HDL parecem convergir no mesmo sentido<sup>35</sup>.

## REFERÊNCIAS

- Almeida, P. J.; Pires, J. G. P. - Bases bioquímicas da atividade plaquetária na hemostasia e na trombogênese. Parte I. Arq. Bras. Cardiol. 48: , 1987
- Almeida, P. J.; Pires, J. G. P.; Marquezini, A. J. - Bases bioquímicas da atividade plaquetária na hemostasia e na trombogênese. Parte II Arq. Bras. Cardiol. 48: , 1987.
- Baumgartner, H. R. - Morphometric quantitation of adherence of platelets to an artificial surface and components of connective tissue. Thromb Diath Haemorrh (Suppl.) 59:60: 39, 1974.
- Baumgartner, H. R. - Platelet interaction with collagen fibrils in flowing blood Thromb. Haemostas 37: 1 1977
- Legrand, Y. J.; Karniguian, A.; Fauvel, F. - Nonapeptide du collagène leurre les plaquettes. Presse Med 12: 2327, 1983
- Kotite, N. J.; Conningham, L. W. - Specific adsorption of a platelet membrane glycoprotein by human insoluble collagen. J. Biol. Chem. 261: 8342, 1986
- Miller, E. J. - Biochemical characteristics and biological significance of the genetical-distinct collagens. Mol. Cell. Biochem. 13: 165, 1976.
- Legrand, Y. J.; Fauvel, F.; Arbeille, B.; Leger, D.; Mouhli, H.; Gutman, N.; Muh, J. P. - Activation of platelets by microfibrils and collagen. A comparative study Lab. Invest. 54: 566, 1986.
- Baumgartner, H. R.; Tschopp, T. B.; Meyer, D. - Shear rate dependent inhibition of platelet adhesion and aggregation on collagenous surface by antibodies to human factor VIII/von Willebrand factor. Br. J. Haematol, 44: 127, 1980.
- Girma, J. P.; Kalafatis, M.; Pietu, G.; Lavergne, J. M.; Chopek, M. W.; Edginton, T. S.; Meyer, D. . Mapping of distinct von Willebrand factor domains interacting with platelet GP Ib and GP IIb/IIIa and with collagen using monoclonal antibodies. Blood 67:1356,1986.
- Wintrobe, M.M. - Clinical Hematology, 8<sup>th</sup> ed. Philadelphia, Lea & Febiger, 1981. p. 357. .
- Furlan, M. - Factor VIII/von Willebrand factor: A multivalent ligand binding to platelets and collagen, Blut, 52: 329, 1986.
- Sakariassen, K. S.; Fressinaud, E.; Girmae .T. P.; Baumgartner, H. R.; Meyer, D. . Mediation of platelet adhesion to fibrillar collagen in flowing blood by a proteolytic fragment of human von Willebrand factor. Blood, 67: 1515, 1986.
- Houdijk, W. P. M.; Schiphorst, M. E.; Sixma, J. J. . Identification of 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.
- Murer, E. H. . The role of platelet calcium. Sem. Hematol. 22: 313, 1985.
- Steiner, M. - Role of glycosaminoglycans in calcium metabolism of human platelets. Biochem. Biophys Acta, 886: 406, 1986.
- Sage, S. O.; Rink, T. J. . Kinetic differences between thrombin induced and ADP-induced calcium influx and release from internal stores in fura-2-loaded human platelets. Biochem Biophys. Res. Comun. 136: 1124, 1986
- Legrand, Y. J.; Fauvel, F.; Gutman, N e Muh, J. P.; Tobelem, G.; Souchon, H.; Karniguian, A.; Caen, J. P. - Microfibrils (MF) platelet interaction: requirement of von Willebrand factor. Thromb. Res. 19: 737, 1980.
- Pribluda, V.; Laub, F.; Rotman, A. - The state of actin in activated human platelets. Eur. J. Biochem. 116: 293, 1981.
- Lebowitz, E. A.; Cooke, R. - Contractile properties of actomyosin from human blood platelets. J. Biol. Chem. 253: 5443 1978.
- Sweatt, J. D.; Connolly, T. M.; Cragoe, E. J.; Limbird, L. E. -. Evidence that Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange regulates receptor-mediated phospholipase A<sub>2</sub> activation in human platelets. J. Biol. Chem. 261:8667,1986.
- Antonio, A.; Pires, J. G. P. - Receptores purinérgicos. Rev. Medicina HCFMRP-USP 17: 203,1984.
- Lauri, D.; Cerletti, C.; De Gaetano, G. . Contribution of ADP to the amplification of primary platelet aggregation by platelet activating factor (PAF): modulatory role of aspirin. Agents Actions, 17: 506, 1985.
- Harlan, J. M.; Harker, L. A. . Hemostasis, thrombosis and thromboembolic disorders. Med. Clin. N. Am. 65: 855, 1981.



25. Poll, C.; Westwick, J. - Phorbol esters modulate thrombin operated calcium mobilization and dense granule release in human platelets, *Biochem. Biophys. Acta*, 886: 434, 1986.
26. Greengard, J. S.; Heeb, M. J.; Ersdal, E.; Walsh, P. N.; Griffin, J. H. - Binding of coagulation factor XI to washed human platelets, *Biochemistry*, 25: 3884, 1986
27. Miles, L. A.; Ginsberg, M. H.; White, J. G.; Plow, E. F. - Plasminogen interacts with human platelets through two distinct mechanisms *J. Clin. Invest.* 77: 2001, 1986.
28. O'Hara, N.; Yokota, S.; Kouchi, Y.; Ono, H. - Alfa-adrenergic receptors on canine platelet membranes characterized by  $^3\text{H}$ yoimbine binding *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharm* 52: 179, 1986.
29. Hoffman, B. B.; Lefkowitz, R. J. - Alfa-adrenergic receptor subtypes. *N Engl. Med J. Med.* 302: 1390, 1980
30. Yokoyama, M.; Kawashima, S.; Sakamoto, S.; Akita, H.; Okada, T.; Mizutani, T.; Fukuzaki, H. - Platelet reactivity and its dependence on alfa-adrenergic receptor function in patients with ischaemic heart disease. *Br. Heart. J.* 49: 20, 1983.
31. Levene, D. L.; Freeman, M. R. - Alfa-adrenoceptor-mediated coronary artery spasm. *JAMA*, 236, 1018, 1976
32. Greer, I. A.; Walker, J. J.; McLaren, M.; Calder, A. A.; Forbes, C. D. - A comparative study of the effects of adrenoceptor antagonists on platelet aggregation and thromboxane generation, *Thromb. Haemost* 54: 480, 1985.
33. Koller, E. - Lipoprotein binding proteins in the human platelet plasma membrane. *FEBS Lett*, 200: 97, 1986
34. Beitz, J.; Bloock, H. U.; Beitz, A.; Muller, G.; Winkler, L.; Dargel, R.; Mest, H. J. - Endogenous lipoproteins modify the thromboxane formation capacity of platelets. *Atherosclerosis*, 60: 95, 1986
35. Beitz, J.; Forster, W. - Influence of human low density and high density lipoprotein cholesterol on the in vitro prostaglandin  $\text{I}_2$  synthetase activity. *Biochem. Biophys. Acta*, 620: 352, 1980.