Marcelo Larami Santoro

Contribuição à investigação das alterações hemostáticas
induzidas pelo veneno da serpente *Bothrops jararaca* em coelhos:
estudo das glicoproteínas da membrana, função, secreção e
sobrevivência plaquetárias

São Paulo
2002

Marcelo Larami Santoro

Contribuição à investigação das alterações hemostáticas
induzidas pelo veneno da serpente *Bothrops jararaca* em coelhos:
estudo das glicoproteínas da membrana, função, secreção e
sobrevivência plaquetárias

Tese apresentada ao Instituto de Biociências da
Universidade de São Paulo, para a obtenção de
Título de Doutor em Ciências, na Área de
Fisiologia Geral.

Orientadora: Dra. Ida Sigueko Sano-Martins

São Paulo
2002

Santoro, Marcelo Larami

Contribuição à investigação das alterações hemostáticas induzidas pelo veneno da serpente *Bothrops jararaca* em coelhos: estudo das glicoproteínas da membrana, função, secreção e sobrevivência plaquetárias.

194 p.

Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Fisiologia.

1. Hematologia; 2. Plaquetas; 3. Envenenamento ofídico. I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Fisiologia.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Profa. Dra. Ida Sigueko Sano-Martins
Orientadora

*Ao Prof. Dr. Eduardo de Almeida Navarro, pelo carinho e
terna amizade de todos os instantes*

À amiga inominável, KCB, por tanto

Ao Sr. Waldecy Gonçalves, pelo incentivo e amizade

VERAE AMICITIAE SEMPITERNAE SVNT

Cícero, De Amicitia 9,32

*Aos meus pais, pelo amor que nos alimenta e nos
transcende*

Agradecimentos

À Dra. Ida Sigueko Sano-Martins pela confiança em meu trabalho, mas sobretudo pela amizade de todos os dias e momentos: meu reconhecimento e admiração;

Aos meus caros colegas do Laboratório de Fisiopatologia, Alice da Silva Almeida, Ângela de Moraes Ferreira, Flávio Pires Corrêa (*in memoriam*), Iracema Severo Luiz, Neusa Tadeu Penas Picon, Neucely C. Oliveira e Silvana Pinho de Oliveira pela dedicação e eficiência com que sempre me auxiliaram e sem cuja assistência este estudo não poderia ter sido realizado;

Aos demais colegas pesquisadores e estagiários do Laboratório de Fisiopatologia pela amizade e convivência diária, que fazem de nosso ambiente de trabalho um lugar fraternal e prazeroso de estar;

Ao Laboratório de Imunopatologia, especialmente à Dra. Harumi Takehara, que me acolheu durante a reforma do Laboratório de Fisiopatologia e onde pude desenvolver grande parte deste trabalho;

Aos funcionários do Laboratório de Doenças Trombo-Hemorrágicas da Fundação Pró-Sangue do Hemocentro de São Paulo, em particular à Dra. Tânia Rúbia Flores da Rocha, pela terna amizade e pelo auxílio na utilização do citômetro de fluxo; gostaria também de agradecer ao Dr. Élbio Antonio D'Amico que disponibilizou as instalações deste e outros laboratórios da Fundação Pró-Sangue para que se realizasse este projeto;

Aos Dr. Guy L. Reed (Cardiovascular Biology Laboratory, Harvard School of Public Health, Boston, EUA) e Dr. Mark H. Ginsberg (Department of Vascular Biology, The Scripps Research Institute, La Jolla, EUA) pela gentil doação dos anticorpos 12A7 e antiLIBS1, respectivamente;

Aos Dr. Ricardo José Soares Torquato (Departamento de Bioquímica) e Dra. Izaura Yoshico Hirata (Departamento de Biofísica) da UNIFESP pela determinação da sequência aminoterminal do fator plaquetário 4;

Ao Sr. Itaru Sano da Granja Mizumoto, pela doação das galinhas poedeiras utilizadas para a produção de anticorpos;

Aos colegas do Laboratório de Anatomia Patológica do Instituto do Coração, HCFMUSP, em particular à Dra. Shizie Fukusawa, pelas sugestões quanto à técnica de imuno-histoquímica e pelo uso do fotomicroscópio;

À Dra. Roxane M. F. Piazza, do Laboratório Especial de Microbiologia do Instituto Butantan, por permitir o acesso ao fotomicroscópio deste laboratório;

Aos amigos Fan Hui Wen, Flávio Luís Tavares, Miriam Naomi Osawa, Sandra Mayumi Fuzi, Sylvia Mendes Carneiro e Teresa Cristina Silveira Hilst, que, de muitas maneiras, contribuíram para a realização deste trabalho;

À FAPESP pelo auxílio-pesquisa (FAPESP: 98/04188-2), sem o qual este projeto não teria sido realizado.

Lista de abreviaturas

5-HI: 5-hidroxiindóis;	PAF: fator ativador plaquetário;
A23187: cálcio ionóforo A23187;	PAI-1: inibidor do ativador do plasminogênio do tipo tissular;
ADP e ATP: 5'-difosfato e 5'-trifosfato de adenosina, respectivamente;	PAR: receptor ativado por proteases;
ATIII: antitrombina III;	PDF: produtos de degradação do fibrinogênio e da fibrina;
β TG: β -tromboglobulina;	PDW: amplitude da distribuição de plaquetas;
cAMP: 3',5'-monofosfato cíclico de adenosina (AMP cíclico);	PF4: fator plaquetário 4;
DAG: <i>sn</i> -1,2 diacilglicerol;	PG: prostaglandina;
GDP e GTP: 5'-difosfato e 5'-trifosfato de guanosina, respectivamente;	PGI ₂ : prostaciclina;
GP: glicoproteína;	PLA ₂ : fosfolipase A ₂ ;
GPIb-IX-V: complexo glicoprotéico Ib-IX-V;	PLC: fosfolipase C;
GPIIb-IIIa: complexo glicoprotéico IIb-IIIa;	PPP: plasma pobre em plaquetas;
IgG: imunoglobulina G;	PRP: plasma rico em plaquetas;
IgY: imunoglobulina Y;	tPA: ativador do plasmingoênio do tipo tissular;
IP ₃ : 1,4,5-trisfosfato de inositol;	Tx: Tromboxano;
LIBS: epítomos induzidos por ligantes;	VPM: volume plaquetário médio;
	vWF: fator de von Willebrand.

Aminoácidos

<i>Símbolo de 1 letra</i>	<i>Símbolo de 3 letras</i>	<i>Significado</i>
A	Ala	Alanina
B	Asp ou Asn	Ácido aspártico ou Asparagina
C	Cys	Cisteína
D	Asp	Ácido aspártico
E	Glu	Ácido glutâmico
F	Phe	Fenilalanina
G	Gly	Glicina
H	His	Histidina
I	Ile	Isoleucina
K	Lys	Lisina
L	Leu	Leucina
M	Met	Metionina
N	Asn	Asparagina
P	Pro	Prolina
Q	Gln	Glutamina
R	Arg	Arginina
S	Ser	Serina
T	Thr	Treonina
V	Val	Valina
W	Trp	Triptofano
X	Xxx	Não identificado
Y	Tyr	Tirosina
Z	Glu ou Gln	Ácido glutâmico ou Glutamina

Índice analítico

1. Introdução.....	3
2. Objetivos	49
3. Material e Métodos.....	54
3.1. Purificação da botrocetina	54
3.1.1. Determinação das atividades trombina-símile, pró-coagulante e aglutinante plaquetária.....	55
3.2. Coleta e processamento de plasma e plaquetas de coelho para purificação de fibrinogênio, GPIIb-IIIa e PF4	55
3.3. Purificação do fibrinogênio e das proteínas plaquetárias.....	56
3.3.1. Purificação do fibrinogênio.....	56
3.3.2. Purificação de GPIIb-IIIa e PF4 de coelho	56
3.3.2.1. Purificação de GPIIb-IIIa.....	57
3.3.2.2. Purificação do PF4	57
3.4. Imunização de animais	58
3.4.1. Imunização de cobaias contra o fibrinogênio de coelho	58
3.4.1.1. Purificação de anticorpos IgG do soro de cobaia.....	59
3.4.2. Imunização de galinhas contra GPIIb-IIIa e PF4 de coelho	59
3.4.2.1. Purificação de anticorpos IgY do ovo de galinha.....	60
3.5. Veneno para o protocolo experimental.....	60
3.6. Protocolos para a marcação <i>ex vivo</i> de plaquetas com biotina, injeção de veneno e coleta de amostras de sangue.	61
3.6.1. Marcação <i>ex vivo</i> das plaquetas com NHS-biotina	61
3.6.2. Protocolo experimental	62
3.6.3. Coleta de amostras de sangue	62
3.6.3.1. Coleta de amostra para a citometria de fluxo	62
3.6.3.2. Contagem hematológica.....	63
3.6.3.3. Coleta de amostras para a dosagem de serotonina, PF4, vWF, fibrinogênio e ATIII	63
3.7. Dosagem de serotonina intraplaquetária e 5-hidroxiindóis plasmáticos	63
3.8. ELISA para dosagem de PF4	64
3.8.1. Acoplamento do PF4 à NHS-Sepharose	65
3.8.2. Purificação de IgY antiPF4 por cromatografia de afinidade (PF4-Sepharose).....	65
3.8.3. Conjugação da IgY antiPF4, purificada por cromatografia de afinidade, com biotina.....	66
3.8.4. Caracterização por meio de <i>Western blotting</i> dos anticorpos IgY contra PF4.....	66
3.8.5. ELISA: titulação da IgY purificada em PF4-Sepharose, IgY total antiPF4 e IgY total controle.....	67
3.8.6. Protocolo de ELISA para determinação de PF4 plasmático	68
3.9. Dosagem de vWF.....	69
3.10. Dosagem de ATIII	70
3.11. Dosagem de fibrinogênio	70
3.12. Citometria de fluxo.....	71
3.12.1. Anticorpos utilizados na citometria de fluxo	71
3.12.2. Conjugação da IgY total (controle e antiGPIIb-IIIa) com fluoresceína	72

3.12.2.1. Imunofluorescência de plaquetas incubadas com IgY total (antiGPIIb-IIIa e controle) conjugada com fluoresceína	72
3.12.3. Conjugação de IgG de cobaia (antifibrinogênio de coelho e controle) com fluoresceína	73
3.12.4. Caracterização por meio de <i>Western blotting</i> dos anticorpos utilizados na citometria de fluxo	73
3.12.5. Caracterização pela citometria de fluxo dos anticorpos	74
3.12.6. Protocolos para a marcação das plaquetas com anticorpos, tiazol orange e avidina-fluoresceína	75
3.12.6.1. IgY anti GPIIb-IIIa de coelho conjugada com fluoresceína	75
3.12.6.2. IgG de cobaia antifibrinogênio de coelho conjugada com fluoresceína	75
3.12.6.3. Anticorpos monoclonais 12A7 e antiLIBS1	75
3.12.6.4. Anticorpo monoclonal P2	75
3.12.6.5. Anticorpo monoclonal MoALg1	75
3.12.6.6. Tiazol orange	76
3.12.6.7. Identificação de plaquetas marcadas com biotina	76
3.12.6.8. Determinação da autofluorescência das plaquetas	76
3.12.7. Análise das amostras no citômetro de fluxo	76
3.12.7.1. Análise da dispersão dianteira e lateral	77
3.12.7.2. Análise das reações de fluorescência com o tiazol orange	77
3.12.7.3. Análise das reações das plaquetas com a avidina-fluoresceína e cálculo da sobrevivência plaquetária	77
3.12.7.4. Análise das reações de fluorescência com os anticorpos policlonais e monoclonais	78
3.13. Agregação plaquetária e secreção de ATP em sangue total.	79
3.14. Análise histopatológica	79
3.14.1. Coloração de plaquetas e fibrina	80
3.14.2. Imuno-histoquímica para GPIIb-IIIa e fibrina	81
3.14. Análise estatística	82
4. Resultados	84
4.1. Purificação e caracterização da botrocetina	84
4.2. Purificação e caracterização do fibrinogênio de coelho	84
4.3. Purificação e caracterização da GPIIb-IIIa de coelho	84
4.4. Purificação e caracterização do PF4 de coelho	86
4.5. Anticorpos	89
4.5.1. Purificação de IgY antiPF4 por cromatografia de afinidade de PF4-Sepharose	89
4.5.2. Caracterização por meio de <i>Western blotting</i> dos anticorpos IgY antiPF4	90
4.5.3. Titulação de IgY purificada em coluna de afinidade antiPF4, IgY total antiPF4 e IgY total controle ...	91
4.5.4. Caracterização por meio de <i>Western blotting</i> dos anticorpos utilizados na citometria de fluxo	92
4.5.5. Imunofluorescência de plaquetas incubadas com IgY total (antiGPIIb-IIIa e controle) conjugada com fluoresceína	93
4.6. Envenenamento experimental	94
4.6.1. Eritrograma e contagem total de leucócitos	94
4.6.2. Valores plaquetários	96
4.6.3. Valores de serotonina intraplaquetária, 5-HI plasmáticos e PF4 plasmático	97
4.6.4. Valores plasmáticos de fibrinogênio, vWF e ATIII	98
4.6.5. Dispersão dianteira e lateral	99
4.6.6. Autofluorescência	99

4.6.7. Plaquetas reticuladas.....	100
4.6.8. Sobrevivência plaquetária	101
4.6.9. Expressão de proteínas na superfície plaquetária em condições de repouso e ativação plaquetária <i>in vitro</i>	102
4.6.10. Expressão do fibrinogênio na superfície plaquetária.....	103
4.6.11. Expressão da GPIIb-IIIa total na membrana plaquetária.....	104
4.6.12. Expressão do epítipo reconhecido pelo anticorpo P2.....	104
4.6.13. Expressão do epítipo reconhecido pelo anticorpo antiLIBS1.....	105
4.6.14. Expressão da P-selectina.....	106
4.6.15. Expressão de epítopos para o MoALg1	106
4.6.16. Agregação plaquetária em sangue total.....	107
4.6.17. Secreção de ATP em sangue total.....	107
4.6.18. Análise histopatológica	108
4.6.18.1. Análise histopatológica do pulmão.....	108
4.6.18.2. Análise histopatológica do rim.....	108
5. Discussão.....	115
6. Conclusões	152
7. Resumo.....	155
8. Abstract	156
9. Referências bibliográficas	157

Vaso ático vermelho *Stamnos*, Paris, Museu do Louvre, G413. Cerca de 450 a.C. Vide representação das figuras deste vaso na ilustração abaixo. À esquerda, altar e estátua de Crises com uma serpente em sua base. O homem próximo (Agamêmnon), vestido e com o cetro, olha a serpente. Filoctetes, imberbe e envolvido no himácio, permanece ferido no chão, cercado por dois jovens, um se curvando sobre ele e o outro (Aquiles) segurando um espeto com carne. Há ainda dois homens vestidos, um deles é Diomedes. Fonte: LIMC (1994); MÜLLER, (1994).

Entalhe em sardônica, Berlin, Museu Estadual. Cerca de 250 a.C. Filoctetes (imberbe, de clâmide, arco na mão direita) inclina-se sobre um altar, onde se aloja uma serpente que pica a sua perna. Fonte: LIMC (1994).

Entalhe em sardônica, Weimar, Museu Goethe. III século a.C. Filoctetes (de clâmide, elmo e com o escudo entre as pernas) pisa em uma pedra (?), enquanto agarra com as mãos a serpente enrolada em sua perna direita. Fonte: LIMC (1994).

Reprodução de um camafeu etrusco de cornalina, perdido, III século a.C. Filoctetes (imberbe, com um chapéu e um arco na mão esquerda) quase desmaia após ter sido picado por uma serpente (que se curva para o seu buraco). Palamedes (clâmide sobre as costas e segurando um bastão com a mão esquerda) ampara Filoctetes com a mão direita. Fonte: LIMC (1994); MÜLLER, (1994).

1. Introdução

Tróia cairia somente quando os aqueus contassem com a presença de Filoctetes e suas flechas letíferas, profetizara o oráculo. Como um dos pretendentes de Helena, Filoctetes fora convocado para a Guerra de Tróia, porém o arqueiro habilidoso não alcançou a terra de Príamo: como fora picado no pé por uma serpente na Ilha de Tênedos, de cujo ferimento exalava um odor assaz repugnante e insuportável, Odisseu convencera facilmente Agamêmnon a abandoná-lo na Ilha de Lemnos. Durante nove anos Filoctetes permaneceu em Lemnos, alimentando-se de aves abatidas por suas flechas certeiras. Iniciava-se o décimo ano da luta cruenta pela posse de Helena; Aquiles, Heitor e outros belígeros heróis já haviam falecido. Odisseu parte para Lemnos, acompanhado de Neoptólemo, filho de Aquiles, para curá-lo e trazê-lo novamente ao combate. A princípio relutante de voltar, pois estava magoado com os aqueus e, principalmente, com Agamêmnon, Filoctetes é combalido pelo engenho do ardiloso Odisseu e pela intervenção de Héracles e, dessarte, é trazido à Tróia. Assim se lê na **Iliada** de HOMERO, na tragédia **Filoctetes** de SÓFOCLES e na **Pequena Iliada** de PROCLOS. É-nos revelado, na **Pequena Iliada**, que Filoctetes fora tratado por Macáon, filho de Asclépio. Segundo uma variante do mito, Apolo, pai de Asclépio e igualmente um médico, prostra Filoctetes em sono profundo para que Macáon possa realizar a cirurgia e retirar os tecidos mortos com um punhal.

A recordação deste célebre episódio do ciclo épico grego evidencia a importância que os acidentes ofídicos sempre tiveram na história da humanidade. Se para o dito “homem civilizado” hodierno esta realidade do contato com serpentes se mostra distante, tal sentimento é falacioso. Conquanto seja difícil estimar a incidência mundial de picadas por serpentes peçonhentas, devido à escassez de dados epidemiológicos confiáveis, uma revisão recente publicada pela Organização Mundial da Saúde refere que acima de 5 milhões de casos ocorrem anualmente, sendo que 125 000 mortes e 100 000 seqüelas graves sobrevêm a estes (CHIPPAUX, 1998). Os agricultores são a população mais atingida pelas picadas de serpentes peçonhentas, cujo ambiente de trabalho lhes proporciona um contato íntimo de pés e mãos desprotegidos com uma gama bastante variada de espécies animais, inclusive os venenosos. É mister ressaltar que esta população desempenha basicamente um trabalho agrário e depende de seu corpo para a sobrevivência. No Brasil, a utilização de antivenenos para o tratamento das vítimas de acidentes ofídicos reduziu o número de óbitos (FAN & CARDOSO, 1995), porém ainda são elevadas as cifras das seqüelas decorrentes de lesões em membros. A exemplo de Filoctetes, a necrose tecidual provocada pela picada de serpentes, que contenham componentes proteolíticos em seus venenos, ainda é causa de invalidez, temporária ou permanente. Conforme os dados do Hospital Vital Brazil do Instituto Butantan, 10% dos pacientes picados pelas serpentes do gênero *Bothrops* desenvolvem necrose.

A jararaca (*Bothrops jararaca*) é uma serpente de ampla distribuição territorial na parte sudeste da América do Sul, espalhando-se desde a Bahia até o norte da Argentina. A distribuição da *B. jararaca*

no sudeste do Brasil coincide principalmente com as áreas atlânticas tropicais, evidenciando que esta serpente aparentemente é um habitante de floresta. Contudo, ela também é capaz de viver em habitats degradados e campos cultivados. A sua atividade é principalmente noturna e a maior parte dos acidentes ofídicos ocorre nos meses mais chuvosos do ano, quando a sua movimentação é mais intensa. A dieta desta espécie é diversificada, com uma preponderância de roedores na fase adulta e de sapos nos indivíduos jovens. Aliás, os indivíduos jovens utilizam a extremidade pálida de suas caudas para atrair e capturar sapos (SAZIMA, 1992). Seu veneno apresenta como atividades características a ação coagulante, hemorrágica e proteolítica (ROSENFELD, 1971).

No Brasil, jesuítas e cronistas do século XVI e XVII já se ocupavam da descrição das jararacas, cujo veneno letal produzia inúmeras vítimas entre os índios. A título de exemplo, as seguintes descrições:

“Alii vocantur jararaca, qui frequentissimi sunt in campis, nemoribus et ipsis etiam aedibus, in quibus saepe eos invenimus, quorum morsum intra viginti quatuor horarum spatium mors subsequitur, quanvis aliquando possit ei adhiberi medicina, et mors evadi. Porro id apud Indos sic habet, ut si semel icti a colubro mortem evadant, percussi deinceps non solum in discrimen vitae non veniant, sed multo etiam minus sentiant doloris, quod non semel experti sumus.”

Outras [cobras] são chamadas de jararaca, muito freqüentes nas planícies, florestas e nas próprias habitações, nas quais muitas vezes as encontramos e de cuja mordida a morte se segue dentro de um espaço de vinte e quatro horas, embora a morte algumas vezes possa ser evitada se remédios forem empregados. Ademais, isso acontece entre os índios, que escapando da morte se picados uma só vez pela cobra, em seguida não apresentam mais perigo de vida, assim como também sentem muito menos dores, o que não somente uma vez já observamos.

ANCHIETA (1560, p.215-216)

“Alem destas ha outras muitas cobras na terra doutras diuersas (q̃ aqui nam refiro por escusar prolixidade) as quaes pela mayor parte sam tam nociuas & peçonhẽtas (especialmẽte huãs a q̃ chamã Gerarácas q̃ se acertã de morder algũa pessoa de marauilha escapa, & o mais q̃ dura sam vinte & quatro horas (...))”

GÂNDAVO (1576, VI, p. 24)

“Pelos matos e ao redor das casas se criam umas cobras, a que os índios chamam gereracas; as maiores são de sete e oito palmos de comprido, e são pardas e brancacentas nas costas, as quais se põem às tardes ao longo dos caminhos esperando a gente que passa, e em lhe tocando com o pé lhe dão tal picada, que se lhe não acodem logo com algum defensivo, não dura o mordido vinte e quatro horas.”

SOUSA (1587, p. 157)

“De peçonhentas há sem conto, e de cujas mordeduras morre muita gente. A umas chamam jararacas. As mordeduras destas são mais venenosas à tarde que pola manhã, e são tão fecundas nos partos que parem até 64, de cada vez, como experimentaram os nossos Padres. São pardas, têm, pelo fio do lombo, uma cadeia preta mui galante. (...) Há outras que chamam jararacas soatinga, que quer dizer jararaca que tem a ponta do rabo branco. Os mordidos desta raramente escapam. (...) Aos que mordem fazem arrebentar o sangue por todos os meatos do corpo, com dores extraordinárias, e nenhum escapa.”

MONTEIRO (1610, p. 422)

Um outro relato, que provém desta vez do século XIX, merece também destaque:

“A jararáca, cuja casta he a mais multiplicada, e fatal: a denominada de cauda branca não tem mais d'hum palmo de comprimento, e seu veneno não tem antidoto conhecido: o vivente, a quem elle picou, fica logo em convulções, e suores de sangue, e espira em pouco tempo.”

CASAL (1817, p. 72)

Em todas as observações, faz-se menção da gravidade dos acidentes ofídicos causados pela jararaca. Consoante à observação inicial de ANCHIETA, outros cronistas relataram o intervalo de 24 horas para que a morte dos indivíduos acidentados ocorresse. Note-se ainda que os cronistas já haviam percebido a maior gravidade dos acidentes provocados pelos espécimes jovens desta serpente, cuja cauda é branca. Tal observação foi confirmada séculos mais tarde por pesquisadores que descreveram a atividade do veneno ao longo do desenvolvimento ontogenético da *B. jararaca*, demonstrando que no veneno das serpentes jovens há uma maior atividade dos componentes coagulantes (KAMIGUTI *et alii*, 1987; ROSENFELD *et alii*, 1959).

Igualmente, há a observação dos cronistas de que as vítimas da jararaca apresentavam hemorragias (“arrebentar o sangue por todos os meatos do corpo” e “suores de sangue”). CELSUS, no primeiro século

dC, já relatava no seu tratado sobre a Medicina a existência de serpentes que causavam sangramentos e os tratamentos que impediam a coagulação dos humores internos:

“At si cerastes aut dipsas aut haemorrhoids percussit (...)”

Mas se a cerastes ou a dipsas ou a hemorróis picam (...)

CELSUS, **De Medicina**, V, 27, 7

No caso desta citação, a descrição da serpente *haemorrhoids* (do grego αιμορροϊς, “propícia a fazer o sangue fluir”) demonstra que já havia na Antigüidade a noção de que algumas serpentes causavam hemorragia. Havia também a noção de que algumas delas promoviam a coagulação do sangue:

“(...) si id non est, necessarium est exsorbere potionem meri vini cum pipere, uel quidlibet aliud quod calori mouendo est, ne humorem intus coire patiatur: nam maxima pars venenorum frigore interemit.”

CELSUS, **De Medicina**, V, 27, 3e

... se ele [antídoto] não existe, é necessário beber uma poção de vinho puro com pimenta, ou qualquer outra coisa que mova pelo calor, para que não aconteça do humor coagular dentro: pois a maior parte dos venenos mata pelo frio.

É mister ressaltar que na época de CELSUS ainda não havia sido descoberta a circulação do sangue (humor), fato que ocorreria somente no século XVII por WILLIAM HARVEY. No entanto, CELSUS associava a coagulação do sangue ao enrijecimento pelo frio e por isso prescrevia a ingestão de bebidas que provocassem calor, a fim de que o sangue não se coagulasse internamente pela picada das serpentes. A importância que os distúrbios hemostáticos desempenham na fisiopatologia dos envenenamentos ofídicos também não passou despercebida de CELSUS, a qual lhe ensinou a associação entre o frio e a coagulação do sangue. Talvez esta associação não tenha sido fortuita, porquanto ARISTÓTELES (**Meteorologica**, IV, VII, 384a-384b), que viveu no século IV a.C. já a havia descrito, ao comparar a coagulação do sangue ao congelamento da água.

Todavia, a partir das observações iniciais dos antigos, o estudo do processo da hemostasia sangüínea somente ganharia novo impulso no século XVII com os estudos de MALPIGHI e no século XVIII com os estudos de HEWSON. Ambos os autores observaram que a coagulação se dava na parte líquida do sangue (na linfa, como era conhecida na época) e que não era devida à agregação das células vermelhas. A partir destas observações iniciais, o mecanismo da coagulação sangüínea começou a ser melhor compreendido, até que MORAWITZ (1905) resumisse todos os conceitos coetâneos no modelo clássico da coagulação, isto é, de que a protrombina, na presença de tromboplastina e cálcio, é ativada em trombina, que por sua vez converte o fibrinogênio em fibrina (*apud* BECK, 1968). Desde então, esta

aparentemente pequena sistematização da coagulação sangüínea impulsionou os cientistas à descoberta de novos componentes plasmáticos e celulares que contribuíam para o mecanismo de hemostasia. Atualmente, sabe-se que o mecanismo da hemostasia é bastante complexo e que ele também se inter-relaciona com outros processos fisiopatológicos, tais como a inflamação, a cicatrização, o alastramento de metástases, etc.

Os distúrbios da hemostasia estão intrinsecamente relacionados ao desenvolvimento de doenças trombo-hemorrágicas, inclusive o distúrbio hemorrágico que ocorre nos picados por serpentes peçonhentas. As muitas dificuldades para a compreensão dos mecanismos de distúrbios hemostáticos humanos têm sido superadas com a utilização de animais como modelos experimentais. De fato, não é pequeno o número de publicações que se vale desse tipo de metodologia (KISKER, 1987). Dentre as espécies animais utilizadas, o coelho tem sido utilizado freqüentemente como um modelo para o estudo da coagulação intravascular disseminada, da trombose, da aterosclerose e dos distúrbios plaquetários (PACKHAM *et alii*, 1992), devido principalmente à facilidade de obtenção de grandes volumes de sangue deste animal. Não obstante, diversos estudos têm demonstrado as semelhanças e as diferenças entre a hemostasia do coelho e do homem (DOOLITTLE & BLOMBÄCK, 1964; HE & BAHLBÄCK, 1994; KARGES *et alii*, 1994; KASE & POSPISIL, 1987; LAVERGNE *et alii*, 1993; MARVAL *et alii*, 1992; PACKHAM *et alii*, 1992; RAO & HOANG, 1989, 1991; RAPAPORT *et alii*, 1966; SANTORO & SANOMARTINS, 1993; SHEFFIELD *et alii*, 1992; WEINSTEIN *et alii*, 1990; WEINSTEIN & WALKER, 1991; ZIVELIN *et alii*, 1993).

Em condições de vigência de um processo hemostático normal, quando a monocamada de células endoteliais que recobre os vasos sangüíneos é rompida, seja fisiologicamente ou em conseqüência de uma lesão tissular, diversos processos reparatórios são iniciados. O objetivo destes processos é antes de tudo minimizar a perda de sangue, como uma estratégia para a preservação da vida, e também preservar o máximo possível a circulação de sangue para prover aos tecidos vicinais oxigênio, nutrientes e mecanismos de proteção contra o ataque de microorganismos. Este tênue balanço entre a trombose e a hemostasia – que envolve a parede vascular, as plaquetas, os fatores da coagulação, a fibrinólise e diversos inibidores – é importante para a preservação da vida (CLEMETSON & CLEMETSON, 2001).

Após a exposição da matriz subendotelial, há inicialmente o contato e a mudança de forma plaquetária. Esta mudança de forma é caracterizada pela transformação do formato discóide nativo em uma forma mais esférica, com o desenvolvimento de inúmeros pseudópodes. As plaquetas assim se aderem e se espriam sobre a matriz subendotelial, agregados plaquetários são formados e há a secreção das organelas plaquetárias de estoque. Simultaneamente à formação do tampão plaquetário, há a formação de fibrina, devido à ativação do sistema de coagulação. Esta rede de fibrina é capaz de estabilizar o agregado plaquetário, formando um tampão hemostático definitivo. No momento em que

se inicia a formação de fibrina, ocorre também a ativação do sistema fibrinolítico, que por meio da degradação desta mesma rede de fibrina, controla o crescimento do tampão hemostático.

As plaquetas são células anucleadas, engendradas a partir da fragmentação citoplasmática dos megacariócitos, que participam ativamente em diversas etapas do processo hemostático. A primeira observação da existência destas células no sangue foi feita em 1882 pelo professor GIULIO BIZZAZZO da Universidade de Turim, Itália, ao observar a circulação de vasos de pequeno calibre do omento de cobaias (DE GAETANO, 2001). Elas são os primeiros elementos sangüíneos que reagem a uma lesão endotelial, formando o tampão hemostático primário. Quatro mecanismos fundamentais estão envolvidos na expressão da atividade funcional plaquetária: a adesão, a agregação, a contração e a secreção. O conceito de adesão se refere a princípio à interação entre as plaquetas e a matriz subendotelial, enquanto que a agregação indica a associação entre plaquetas. A secreção descreve o processo pelo qual o conteúdo das organelas de secreção plaquetárias é liberado no local de lesão vascular, sem a perda de conteúdo citoplasmático. A contração é um processo crítico para o desenvolvimento do tampão hemostático, relacionando-se com a mudança de forma, a secreção e a retração plaquetárias (WHITE, 1983).

As plaquetas circulantes em indivíduos hígidos apresentam curvas de distribuição de volume plaquetário com distribuição log-normal. As plaquetas de coelho são menores que as humanas (PACKHAM *et alii*, 1992). Os valores médios relatados na literatura para o volume plaquetário do coelho variam entre 3,0 e 5,0 fL e para o homem entre 6,0 e 8,0 fL (FROJMOVIC & PANJWANI, 1976; GALVEZ *et alii*, 1986; MEYERS *et alii*, 1982). Com relação à contagem plaquetária no sangue total, os valores da literatura apresentam uma grande variação para o coelho, com valores médios aproximados entre 300 e 1000×10⁹/L (MOORE *et alii*, 2000), consideravelmente maiores que os valores de referência para o homem (150 a 400×10⁹/L) (DACIE & LEWIS, 1991).

Quando não estão ativadas e são observadas ao microscópio eletrônico de transmissão, as plaquetas apresentam normalmente uma forma discóide em transecções transversais e circular em transecções longitudinais (Figura 1). A aparência morfológica das plaquetas de coelhos e de seres humanos é similar pela microscopia eletrônica de transmissão. Ambas são células discóides, anucleadas e contêm grânulos α , corpos densos, lisossomos, mitocôndrias, grânulos de glicogênio, um sistema tubular denso, um sistema de canais abertos, microtúbulos e citoesqueleto. Talvez o único detalhe morfológico que permita diferenciar as plaquetas destas duas espécies, além do tamanho, seja exclusivamente a quantidade de corpos densos plaquetários, cujo número é superior nas plaquetas de coelho (PACKHAM *et alii*, 1992).

Figura 1 – Plaquetas quiescentes de coelhos normais, em corte longitudinal (acima) e transversal (abaixo). α - grânulo α ; **DB**- corpo denso; **DTS**- sistema tubular denso; **G**- partículas de glicogênio; **M**- mitocôndria; **MT**- microtúbulos; **OCS**- sistema de canais abertos. Barras = 0,5 μ m. Fonte: SANTORO *et alii* (1994).

WHITE (1987) descreveu quatro regiões morfológicamente distintas nas plaquetas humanas: a zona periférica, a zona sol-gel, o sistema de membranas e a zona de organelas.

A zona periférica é a região mais externa, em contato com o meio extracelular. É composta pela glicocálix, pela membrana plasmática e suas invaginações (o sistema de canais abertos) e estruturas

intimamente associadas à membrana plasmática. Devido à continuidade do sistema de canais abertos com a membrana plasmática, a zona periférica se torna uma estrutura contínua e a área de superfície exposta ao plasma é muito maior do que aquela esperada. A glicocálix, com uma espessura de 15 a 20 nm, envolve a plasmalema e é constituída principalmente de glicoproteínas (GP) que funcionam como receptores plaquetários. A camada central da zona periférica é uma unidade de membrana típica, composta de uma bicamada fosfolipídica que contém proteínas, com uma grande variedade de funções. A área imediatamente interior à bicamada fosfolipídica é o terceiro componente da zona periférica e está envolvida na transdução de sinais recebidos da superfície externa plaquetária em mensagens químicas e alterações físicas necessárias à ativação plaquetária. Esta área contém um sistema relativamente regular de elementos filamentosos, que estão obscurecidos pela matriz da zona sol-gel (WHITE, 1987).

A zona sol-gel é a matriz do citoplasma plaquetário. Os seus elementos resistentes à extração por detergentes são referidos como citoesqueleto. Ela contém vários sistemas de fibras em muitos estados de polimerização, que conferem às plaquetas quiescentes a forma discóide, e constituem um sistema contrátil relacionado com a mudança de forma, protrusão de pseudópodes, contração interna e secreção. Na matriz sol-gel também estão presentes partículas de glicogênio, agrupadas ou não. Os elementos do sistema contrátil constituem aproximadamente 30 a 50% da massa total das proteínas plaquetárias. Pelo menos três sistemas estão presentes nesta zona plaquetária: os filamentos submembranares, os microtúbulos e os microfilamentos. O mais proeminente desses três sistemas é a banda circunferente de microtúbulos, responsável pela manutenção da forma discóide plaquetária, conjuntamente com os filamentos submembranares. Os microtúbulos, nas secções transversais das plaquetas, apresentam um perfil circular, sem preenchimento, com aproximadamente 25 nm de diâmetro, formando grupamentos localizados nas extremidades polares da plaqueta discóide. Frequentemente, observam-se interligações entre os microtúbulos adjacentes, que aparentemente conferem estabilidade e rigidez a eles. Os microfilamentos, formados pela polimerização da actina, estão relacionados à mudança de forma, formação de pseudópodes, contração interna e secreção plaquetária. No citoesqueleto de plaquetas preparadas com o mínimo de ativação, os microfilamentos aparecem como uma rede frágil, em forma de fita. Em contraste, durante a ativação plaquetária, há um rápido aumento na polimerização da actina e cerca de 70% desta se torna polimerizada. O citoesqueleto dessas plaquetas ativadas forma uma massa elétron-densa altamente organizada de feixes de microfilamentos. Durante o processo de ativação plaquetária estes filamentos podem ser observados no interior dos pseudópodes e formam um anel contrátil na região central plaquetária. Após a secreção das organelas, a rede de microtúbulos e microfilamentos continua a se contrair, até que haja fratura microtubular, restando uma massa de gel contrátil na zona central. Os fragmentos dos microtúbulos são posteriormente dispersos e aparecem

freqüentemente no interior dos pseudópodes, durante o processo de contração dos agregados plaquetários e coágulos (WHITE, 1992).

O sistema de membranas é constituído pelo sistema de canais abertos e pelo sistema tubular denso, que estão distribuídos uniformemente pelo citoplasma plaquetário. A superfície do sistema de canais abertos permite que as substâncias plasmáticas alcancem o interior das plaquetas e funciona, vice-versa, como uma via de secreção do conteúdo das organelas plaquetárias. Nas plaquetas quiescentes, os canais deste sistema geralmente não apresentam qualquer conteúdo no seu interior e se diferenciam, assim, dos canais do sistema tubular denso, os quais apresentam em seu interior um conteúdo de material amorfo, de opacidade semelhante ao citoplasma em redor (WHITE, 1992). O sistema tubular denso tem origem no retículo endoplasmático liso residual dos megacariócitos, enquanto que o sistema de canais abertos é derivado da membrana plasmática dos megacariócitos (BRETON-GORIUS & GUICHARD, 1972; WHITE, 1972). Nas plaquetas humanas, o sistema tubular denso é o local de seqüestro de cálcio metabólico e onde as enzimas envolvidas na síntese de prostaglandinas (PG) estão localizadas (CUTLER *et alii*, 1978; CRAWFORD *et alii*, 1992; GERRARD *et alii*, 1976; MENASHI *et alii*, 1982). O sistema tubular denso apresenta reação citoquímica positiva para a peroxidase, enzima envolvida na síntese de PG (BRETON-GORIUS & GUICHARD, 1972; GERRARD *et alii*, 1976; WHITE, 1972). Contudo, DAIMON *et alii* (1985) mostraram que o sistema tubular denso das plaquetas de coelho não apresentava reação para esta enzima, a despeito das plaquetas desta espécie produzirem cerca de dez vezes mais tromboxano (Tx) B₂ do que as plaquetas humanas (HWANG, 1985).

A zona de organelas é constituída pelos grânulos α , corpos densos, peroxissomos, lisossomos e mitocôndrias, que estão distribuídos uniformemente no citoplasma plaquetário.

As mitocôndrias são facilmente diferenciadas das outras estruturas pela dobradura das suas membranas internas. BRETON-GORIUS & GUICHARD (1975) observaram organelas semelhantes aos peroxissomos no citoplasma de plaquetas humanas, utilizando uma técnica citoquímica para a detecção de catalase. Cada transecção apresentava 0 a 2 peroxissomos, com um diâmetro médio de 0,09 μ m.

Os lisossomos estão presentes nas plaquetas humanas sob a forma de pequenas vesículas (0,18 a 0,25 μ m) distintas dos grânulos α e contêm diversas enzimas, tais como a hidrolase, a fosfatase ácida, a α -glicuronidase, a N-acetilglicosaminidase, a arilsulfatase, as catepsinas, a heparitinase, a elastase, a collagenase, etc (BENTFELD-BARKER & BAINTON, 1982; HAWIGER, 1989; HOLMSEN & DANGELMAIER, 1989a; STENBERG & BAINTON, 1986). Os lisossomos presentes nas plaquetas são primários, e não secundários, uma vez que não apresentam fragmentos celulares ou outras evidências de atividade digestiva (BENTFELD-BARKER & BAINTON, 1982). Portanto, as enzimas lisossomais parecem ter uma função extracelular, ou seja, os substratos alvo estariam tanto no plasma como na matriz extracelular subendotelial (HAWIGER, 1989).

Os corpos densos são também conhecidos como grânulos δ . Pela microscopia eletrônica de transmissão, os corpos densos são organelas plaquetárias facilmente distinguíveis das demais por apresentarem um conteúdo interno intensamente elétron-denso, separado da membrana envoltória por um espaço elétron-lúcido (Figura 1). Não obstante, devido ao seu conteúdo de cálcio (vide abaixo), são também inerentemente elétron-densos e em preparações não coradas de plaquetas podem ser também distinguidos facilmente (DAIMON, 1992; GERRARD *et alii*, 1977) (Figura 2).

Figura 2 – Plaquetas normais de coelho (**a**, aumento 22000 $\times$) e humanas (**b**, aumento 22000 $\times$), inteiras e não coradas, observadas ao microscópio eletrônico de transmissão. As organelas elétron-densas são corpos densos (setas), porém notar como os corpos densos das plaquetas de coelho (**a**) não possuem a mesma intensidade de elétron-densidade das plaquetas humanas (**b**), devido à menor concentração de cálcio nos corpos densos daquela espécie. Notar também o menor número de corpos densos na plaqueta humana em comparação com a plaqueta de coelho. Fonte: GERRARD *et alii* (1977), modificado.

Os corpos densos contêm serotonina, histamina, um depósito não metabólico de nucleotídeos da adenina (ATP e ADP) e guanina (GTP e GDP), cálcio, magnésio e pirofosfatos (DANGELMAIER & HOLMSEN, 1983; HAWIGER, 1989; MCNICOL & ISRAELS, 1999). Este depósito não metabólico de nucleotídeos, que provavelmente está na forma de complexos insolúveis com o cálcio, é diverso dos nucleotídeos citoplasmáticos e ambos não podem ser permutados facilmente (MCNICOL & ISRAELS, 1999). À medida que há a formação dos corpos densos durante a maturação dos megacariócitos, ocorre um aumento do conteúdo de ATP e ADP não metabólicos dessas organelas; contudo, a serotonina, que não é sintetizada nos megacariócitos, somente é internalizada nos corpos densos após a liberação das plaquetas à circulação, quando há o contato e a captura da serotonina plasmática (WOJENSKI & SCHICK, 1993). A membrana dos corpos densos, semelhantemente à membrana citoplasmática, possui receptores adesivos, cujos domínios de ligação estão voltados para o lúmen dos grânulos, e que são

assim expressos somente na superfície das plaquetas ativadas. Entre os receptores já demonstrados nas membranas dos corpos densos incluem-se a GPIb, a GPIIb-IIIa, a P-selectina, o CD63 e a LAMP-2 (MCNICOL & ISRAELS, 1999).

As diferenças mais notáveis entre o conteúdo dos corpos densos de plaquetas de coelhos são uma concentração 2 vezes maior de ATP, uma concentração 4 vezes menor de ADP, uma quantidade 5 vezes menor de Ca^{+2} , uma quantidade cerca de 8 vezes maior de Mg^{+2} , uma quantidade cerca de 8 vezes maior de serotonina e uma concentração cerca de 20 vezes maior de histamina em relação às plaquetas humanas. A razão de ATP:ADP nos corpos densos do coelho é de 5:1, enquanto que no homem é de 1:1,25 (MEYERS *et alii*, 1982; PACKHAM *et alii*, 1992).

A serotonina, também denominada 5-hidroxitriptamina, é uma amina heterocíclica largamente distribuída na natureza, sendo encontrada na maioria dos vertebrados e invertebrados, no veneno de vespas e escorpiões e em vários frutos, tais como o abacate, banana, berinjela, maracujá, etc. A denominação serotonina advém da sua descoberta como um princípio vasoconstritor no soro, considerado inicialmente o agente responsável pela hipertensão arterial (KEMA *et alii*, 2000). Os seus depósitos mais importantes estão nas células cromafins da mucosa gastrointestinal, nos neurônios serotoninérgicos do cérebro, na glândula pineal e nas plaquetas (KEMA *et alii*, 2000; REIS *et alii*, 1982).

A serotonina faz parte de um grupo de compostos denominados 5-hidroxiindóis (5-HI), sintetizados a partir do aminoácido essencial triptofano (Figura 3), ingerido na dieta. Após a hidroxilação do triptofano, origina-se o 5-hidroxitriptofano, que, por sua vez, é descarboxilado pela L-aminoácido aromático descarboxilase, produzindo a serotonina. Malgrado os relatos de que as plaquetas contêm uma baixa atividade da triptofano hidrolase, o alto conteúdo de serotonina em seus corpos densos é originado da captura da serotonina secretada pelas células cromafins do trato gastrointestinal. A maior parte da serotonina é metabolizada pela monoaminoxidase, gerando-se o composto 5-hidroxiindolacetaldeído. Este pode ser oxidado em ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) ou ser reduzido em 5-hidroxitriptofol. A primeira via é a mais importante e é catalisada pela aldeído desidrogenase (KEMA *et alii*, 2000).

A maior porção da serotonina do organismo (*ca.* 80%) é encontrada nas células cromafins do trato gastrointestinal. A serotonina é liberada destas células pela acetilcolina, pela estimulação da inervação noradrenérgica, pelo aumento da pressão intraluminal e pela diminuição do pH intestinal. A serotonina liberada pode ser detectada no lúmen intestinal, no sangue portal e na circulação sistêmica (KEMA *et alii*, 2000).

Figura 3 – Vias de síntese e degradação no metabolismo da serotonina. Acrônimos: AADC, L-aminoácido aromático descarboxilase; Alc DH, álcool desidrogenase; Ald DH, aldeído desidrogenase; HIOMT, hidroxindol-*O*-metil transferase; MAO, monoaminooxidase; SAT, serotonina-*N*-acetiltransferase; *N*-Ac-5-HT, *N*-acetil-5-hidroxitriptamina, *N*-AC-5-MT, *N*-acetil-5-metoxitriptamina, melatonina; TRP, triptofano; TRP Hydr, triptofano hidrolase; 5-HIAA, ácido 5-hidroxiindolacético; 5-HT, serotonina, 5-hidroxitriptamina; 5-HTOL, 5-hidroxitriptofol; 5-HTP, 5-hidroxitriptofano. Fonte: KEMA *et alii* (2000).

A serotonina é um vasoconstritor potente e na circulação está quase inteiramente confinada nas plaquetas, sendo, outrossim, mantida funcionalmente inativa. A serotonina possui fraca atividade pró-agregante plaquetária, porém amplifica a ação de outros agonistas, como o ADP, a adrenalina e o TxA₂ (PACKHAM *et alii*, 1992). Uma vez que elevadas concentrações plasmáticas de serotonina podem ser perigosas, há de se possuir mecanismos rápidos para a sua depuração: quantidades substanciais de serotonina são removidas e metabolizadas em 5-HIAA pelo pulmão e fígado, e as plaquetas a capturam por meio de um mecanismo ativo (KEMA *et alii*, 2000). Isso faz com que a meia-vida da serotonina livre na circulação seja de no máximo 2 minutos (THOMAS & VANE, 1967).

O único 5-HI detectável nas plaquetas é a serotonina, uma vez que outros 5-HI não são capturados pela membrana plaquetária (PLETSCHER, 1968; SHUTTLEWORTH & O'BRIEN, 1981). Como já foi dito, a maior parte da serotonina plaquetária é proveniente da serotonina secretada pelas células cromafins e acumulada nos corpos densos durante o ciclo de vida plaquetário. O receptor da serotonina responsável pela agregação plaquetária (5-HT₂) difere do transportador responsável pela captura da serotonina

através da membrana plasmática, que é dependente de uma ATPase- Na^+/K^+ e é inibido pela imipramina. A captura da serotonina citoplasmática para os corpos densos é mediada por um transportador acoplado a uma ATPase- $\text{Mg}^{+2}/\text{H}^+$, que é inibida pela reserpina (PACKHAM *et alii*, 1992). Além da captura ativa, um processo passivo foi também já notado, especialmente quando as concentrações extracelulares de serotonina são muito elevadas (KEMA *et alii*, 2000).

A serotonina forma um fluoróforo com o *o*-ftalaldeído (OPT), que é facilmente detectado em concentrações tão baixas quanto 22 pmol, sob condições fluorimétricas ótimas (HOLMSEN & DANGELMAIER, 1989b). O conteúdo da serotonina plaquetária varia muito de espécie para espécie, de 300 nmol/ 10^{11} plaquetas no homem até 7000 nmol/ 10^{11} plaquetas no coelho (PACKHAM *et alii*, 1992).

Os grânulos α são as organelas mais numerosas do citoplasma plaquetário e claramente diferentes das mitocôndrias e corpos densos. Quando observados ao microscópio eletrônico têm a forma esférica ou ovóide, variando de 0,2 a 0,4 μm de diâmetro, podendo apresentar duas zonas de elétron-densidade diferentes (SUZUKI *et alii*, 1990) (Figura 1). Os grânulos α são estruturas mais heteromorfás que os corpos densos, lisossomos e peroxissomos. Também diferem quanto à eletrondensidade e pela presença de estruturas similares a microtúbulos em alguns grânulos (HARRISON *et alii*, 1990; SUZUKI *et alii*, 1990). Os grânulos α contêm dois tipos de proteínas de estoque. O primeiro deles, são proteínas quase que exclusivamente sintetizadas pelos megacariócitos, tais como o fator plaquetário 4 (PF4) e a β -tromboglobulina (βTG). O segundo tipo são proteínas idênticas àquelas presentes no plasma, mas sintetizadas em outras células, tais como a albumina, o fator V da coagulação, o fator de von Willebrand (vWF), a trombospondina, a fibronectina, o fibrinogênio, a α_2 -antitripsina, a imunoglobulina G (IgG), a α_2 -antiplasmina, a α_2 -macroglobulina, o cininogênio de alto peso molecular, o fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), o fator transformador de crescimento β , o inibidor do ativador de plasminogênio do tipo tecidual (PAI-1) e o C1-inibidor (HARRISON *et alii*, 1990; HAWIGER, 1989).

O PF4 é uma proteína com atividade anti-heparina encontrada nos grânulos α dos megacariócitos e plaquetas. Sua presença nas plaquetas foi descrita inicialmente em 1940, ao observar-se uma associação entre trombocitopenia e sensibilidade à heparina. Posteriormente, uma fração plaquetária com atividade anti-heparina foi separada por VAN CREVELD & PAULSEN em 1951, a qual foi denominada de fator plaquetário 4 por DEUTSCH *et alii* em 1955 (*apud* KAPLAN & OWEN, 1976).

O PF4 humano é uma proteína de 7,8 kDa e pI de 7,6, que contém 70 aminoácidos, duas pontes de dissulfeto e praticamente não possui resíduos de aminoácidos aromáticos (ZUCKER & KATZ, 1991) (Figura 4). O PF4 é sintetizado principalmente pelos megacariócitos mais maduros. Desta forma, uma quantidade razoável de mRNA para a síntese de PF4 pode ser encontrada nas plaquetas circulantes

(SOTTILE *et alii*, 1989). A porção carboxiterminal do PF4, que contém 2 pares de lisina, é muito importante para a sua ligação com a heparina, porquanto modificações químicas ou a substituição desses aminoácidos diminuem a afinidade pela heparina. De fato, uma isoforma do PF4, denominada PF4var1 ou PF4_{alt}, apresenta particularmente três substituições na extremidade carboxiterminal do PF4 (Pro₅₈>Leu, Lys₆₆>Glu e Leu₆₇>His), que lhe confere uma menor capacidade de se ligar à heparina (ZUCKER & KATZ, 1991).

O PF4 é secretado pelas plaquetas sob a forma de um complexo composto de 4 moléculas de PF4 e 2 moléculas de condroitina-4-sulfato; nas plaquetas, este glicosaminaglicano está presente como parte de um proteoglicano plaquetário, que pode ser secretado e combinado ao PF4. Quando o PF4 é separado da sua molécula carregadora, ele também forma tetrâmeros em força iônica e pH fisiológicos. A afinidade do PF4 pelos diversos glicosaminaglicanos é diferente, sendo maior pela heparina e diminuindo na seguinte ordem: sulfato de heparana, sulfato de dermatana, condroitina-6-sulfato e condroitina-4-sulfato. Da mesma maneira que para a condroitina-4-sulfato, duas moléculas de heparina, contendo pelo menos 8 a 10 unidades de dissacarídeos, se ligam a um tetrâmero de PF4 (ST. CHARLES *et alii*, 1989; ZUCKER & KATZ, 1991).

O PF4 tem uma homologia considerável com os derivados da proteína básica plaquetária (PBP, 94 aminoácidos), tais como a β TG (81 aminoácidos), o peptídeo ativador de tecido conjuntivo III (CTAP-III, 85 aminoácidos, também conhecido como PF4 de baixa afinidade, LA-PF4) e o peptídeo ativador de neutrófilos 2 (NAP-2, 70 aminoácidos) (Figura 4) (ZUCKER & KATZ, 1991). A PBP também é sintetizada pelos megacariócitos; no entanto, nos grânulos α das plaquetas humanas, são unicamente encontrados a PBP e o CTAP-III, possivelmente um produto da hidrólise limitada da PBP durante a maturação dos megacariócitos e das plaquetas. Em plaquetas humanas quiescentes, a forma CTAP-III representa 90% deste grupo de proteínas. Uma quantidade ínfima de β TG, a primeira variante deste grupo a ser descoberta, é encontrada nas plaquetas em repouso, a sugerir que ela provém provavelmente da proteólise limitada da PBP ou CTAP-III durante o processo de secreção plaquetária. Já o NAP-2 é gerado pela ação da catepsina G dos neutrófilos sobre a β TG (BRANDT *et alii*, 2000b). Como o PF4, o CTAP-III e a β TG apresentam atividade anti-heparina. Todavia, a atividade do PF4 é ao redor de 9 vezes maior que a da β TG e cerca de 7 vezes maior que a do CTAP-III. (RUCINSKI *et alii*, 1979).

O PF4 e os derivados da PBP são estruturalmente semelhantes à subfamília das quimiocinas CXC (CXC pois apresentam um aminoácido entre a primeira e a segunda cistinas dos quatro resíduos de cistina conservados). Todas estas proteínas são produzidas por uma família de genes denominada genes indutores pequenos ou genes de citocinas “intercrinas” (ZUCKER & KATZ, 1991). Os genes para a PBP e o PF4 humanos estão localizados no cromossomo 4, no locus 4q12-q13, onde estão agrupados junto

de outros genes de quimiocinas CXC. A relação estreita entre o PF4 e a PBP é evidenciada quer pela curta distância (menor que 7 kb) que separa os seus genes de expressão, quer pela homologia considerável de suas estruturas primárias (Figura 4) e secundárias (BRANDT *et alii*, 2000a).

Figura 4 – Comparação entre a sequência de aminoácidos do PF4 e das β-tromboglobulinas. As setas indicam o ponto de clivagem dentro do precursor. O motivo ELR está ressaltado com fundo escuro; as tarjas cinzas no PF4 indicam os pontos de homologia com o NAP-2. As pontes de dissulfeto ligam as quatro cistinas conservadas na família das quimiocinas CXC. Fonte: BRANDT *et alii* (2000b), modificado.

Indubitavelmente, o megacariócito é o local preponderante da síntese do PF4 e das proteínas derivadas da PBP; não obstante, já se demonstrou que o PF4 é também encontrado em mastócitos. A expressão de proteínas derivadas da PBP também já foi observada em monócitos, neutrófilos e linfócitos T (BRANDT *et alii*, 2000a).

O PF4 e a β-TG existem em concentrações muito baixas no plasma coletado com cuidados especiais para evitar a ativação plaquetária. A concentração do PF4 é de $18 \pm 4 \mu\text{g}/10^{11}$ plaquetas humanas. No plasma humano, em estados de hígidez, sua concentração média é baixa (*ca.* 10-20 ng/mL); no soro, devido à secreção plaquetária induzida pela trombina, chega a 5334 ng/mL. Um aumento da quantidade de PF4 ou β-TG em amostras de plasma coletadas com cuidado é observado em muitas condições clínicas e indica a ocorrência de ativação plaquetária *in vivo* (FILES *et alii*, 1981; ZUCKER & KATZ, 1991).

O PF4 foi originalmente identificado pela sua capacidade de neutralizar a atividade anticoagulante da heparina e, assim, valendo-se desta propriedade, ele pode ser purificado a partir de suspensões de plaquetas lisadas e separado do complexo que forma com a condroitina-4-sulfato em coluna de afinidade de heparina-agarose. Muitos outros compostos secretados pelas plaquetas (βTG, trombospondina, etc) também se ligam à heparina-agarose, porém são eluídos em concentrações de NaCl próximas a 0,5 M, enquanto que a eluição do PF4 se faz em concentrações de NaCl entre 1,2 a 1,4 M. Não obstante, devido à necessidade da formação de tetrâmeros para a sua ligação à heparina, o

PF4 reduzido pelo 2-mercaptoetanol se liga com menor afinidade à heparina-agarose e pode ser eluído em concentrações de NaCl entre 0,2 a 0,5 M (ZUCKER & KATZ, 1991).

A heparina suprime a coagulação sangüínea ao aumentar a velocidade de inibição da trombina pelo seu anticoagulante natural plasmático, a antitrombina III (ATIII). Ao se ligar à heparina, o PF4 inibe esta atividade da heparina. Moléculas de heparina maiores que 18 unidades de sacarídeos aumentam efetivamente a atividade inibitória da ATIII sobre a trombina; estas mesmas moléculas de heparina também aumentam a atividade inibitória da ATIII sobre o fator Xa, porém esta ação é neutralizada menos eficientemente pelo PF4. As moléculas de heparina tão pequenas quanto 8 unidades de sacarídeos aumentam a atividade inibitória da ATIII sobre o fator Xa, mas não sobre a trombina, e esta atividade não é inibida pelo PF4. Para a neutralização da atividade do fator Xa pela ATIII e pela heparina comercial, é necessário um aumento de 3 a 4 vezes na concentração de PF4, com relação à concentração que seria necessária para a inibição da trombina (ZUCKER & KATZ, 1991). Atualmente, por causar menos efeitos colaterais, o PF4 recombinante vem sendo testado como um substituto do sulfato de protamina para a inibição do efeito anticoagulante da heparina (COOK *et alii*, 1992).

O PF4 se liga também ao sulfato de heparana presente na superfície das células endoteliais e inibe, da mesma maneira, a interação da ATIII com a trombina. No homem, a injeção intravenosa de heparina resulta em um aumento de 15 a 30 vezes na concentração do PF4 circulante, porém a quantidade de PF4 intraplaquetário e a concentração plasmática de β TG se mantêm inalteradas. Este aumento na quantidade de PF4 presente no plasma corresponde a cerca de 5% da quantidade total que poderia ser potencialmente liberada pelas plaquetas ativadas. Alguns estudos demonstraram que o PF4 liberado na circulação após a administração de heparina provinha do PF4 ligado ao sulfato de heparana das células endoteliais (ZUCKER & KATZ, 1991).

A capacidade do PF4 e da β TG de ligar-se aos glicosaminoglicanos parece ter grande importância para a meia-vida na circulação de ambos. Enquanto o PF4 se liga com alta afinidade ao sulfato de heparana presente na superfície das células endoteliais e possui uma meia-vida de minutos, a β TG tem uma afinidade muito menor pelo sulfato de heparana e persiste por maiores períodos na circulação (BRANDT *et alii*, 2000a). Efetivamente, quando a heparina e o PF4 são injetados simultaneamente em coelhos, o componente rápido de depuração do PF4 desaparece e desenvolve-se uma curva de depuração menos inclinada, tendo o PF4 uma meia-vida ao redor de 30 minutos. A depuração da β -TG, no entanto, não é influenciada pela heparina (ZUCKER & KATZ, 1991).

Conquanto a β TG não tenha uma atividade anti-heparina eficiente, ela também apresenta uma atividade pró-coagulante. Para limitar a ativação plaquetária induzida pela trombina, as células endoteliais secretam a prostaciclina (PGI_2), um inibidor da agregação plaquetária. A β TG, já se

demonstrou, inibe o aumento da secreção de PGI_2 e, dessarte, coopera com o PF4 na regulação da hemostasia (BRANDT *et alii*, 2000a).

O PF4 também é capaz de inibir a ativação do fator XII induzida pelo ácido elágico, caulim ou vidro e, assim, inibe o encurtamento do tempo de tromboplastina parcial ativado (ZUCKER & KATZ, 1991). Além da sua atividade anticoagulante sobre o fator XII, o PF4 também aumenta de 4 a 25 vezes a ativação da proteína C catalisada pelo complexo trombina-trombomodulina. Aparentemente, o PF4 interage tanto com os glicosaminoglicanos da trombomodulina, como com o domínio rico em ácidos γ -carboxiglutâmicos da proteína C, e assim aumenta a afinidade do complexo trombina-trombomodulina pela proteína C (SLUNGAARD & KEY, 1994).

Dentre as outras atividades descritas para o PF4, pode-se citar a inibição da migração espontânea de células endoteliais em cultura, a potente inibição da angiogênese, a inibição da implantação de metástases, a estimulação da elastase de leucócitos, a inibição da reabsorção óssea, a estimulação da liberação de histamina de mastócitos, a indução da expressão da molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1) em células endoteliais, o aumento da espessura das fibras de fibrina, um efeito quimiotático para neutrófilos, monócitos e fibroblastos e um efeito imunomodulador *in vivo* e *in vitro* (BARONE *et alii*, 1988; MAIONE *et alii*, 1990; YOSHIMITSU *et alii*, 1995; ZUCKER & KATZ, 1991).

As plaquetas quiescentes possuem sítios de ligação para o PF4 em sua superfície e há um aumento da expressão deste receptor ao serem estimuladas pela trombina. Tampouco em concentrações elevadas (4 $\mu\text{g/mL}$), o PF4 não é capaz de induzir agregação plaquetária; todavia, em concentrações mais baixas (de 50 a 1000 ng/mL), o PF4 é capaz de potencializar a agregação e a secreção induzida por outros agonistas plaquetários. Esta potenciação da agregação é específica, visto que as porções Fab de anticorpos anti-PF4 inibem a agregação plaquetária (ZUCKER & KATZ, 1991). Com relação à trombopoese, o PF4 diminui especificamente o crescimento dos megacariócitos *in vitro* (BRANDT *et alii*, 2000a).

Se inúmeras investigações foram realizadas com o coelho para se estudar as alterações morfológicas plaquetárias em diversas condições fisiológicas e patológicas, o mesmo não pode se dizer sobre o estudo comparativo das GP plaquetárias. Atualmente, sabe-se que estas GP são os receptores de diversos agonistas e sua modificação estrutural é o primeiro passo para a geração de mensageiros intracitoplasmáticos secundários que promovem a ativação plaquetária. Os estudos pioneiros que tentaram caracterizar as GPs do coelho (BLAJCHMAN *et alii*, 1981; GEORGE *et alii*, 1976; GUCCIONE *et alii*, 1985; NURDEN *et alii*, 1977; PODOLSAK & BRUNSWING, 1976; TOOR *et alii*, 1982) não tiveram continuidade. Considerando-se a imensa quantidade de informações disponíveis sobre a fisiologia plaquetária do coelho, um hiato ocorreu em relação ao estudo de suas GPs. Não obstante a pressuposta

similaridade mostrada pelos estudos pioneiros, os trabalhos científicos mais recentes têm mostrado que esta suposição não é verdadeira (CHEN *et alii*, 1995; CONNOLLY *et alii*, 1994; DERIAN *et alii*, 1995; HARFENIST *et alii*, 1988; HOFFMANN *et alii*, 1997; JENNINGS *et alii*, 1995; KINLOUGH-RATHBONE *et alii*, 1993; KURATA *et alii*, 1995; PACKHAM *et alii*, 1992; RAND *et alii*, 1999; SUZUKI *et alii*, 1994)

Os métodos usuais para a identificação das GPs se baseiam na marcação de suas regiões extracelulares com marcadores radioativos. É condição *sine qua non* que esses marcadores radioativos não atravessem a membrana citoplasmática e, dessarte, apenas as proteínas expostas ao meio extracelular possam ser marcadas. Os elementos químicos radioativos utilizados para tal marcação são o iodo (^{125}I ou ^{131}I) ou o trítio (^3H), utilizando, respectivamente, as técnicas de iodinação catalisada pela lactoperoxidase e a marcação com o periodato de sódio e o hidreto (^3H) de boro (PHILLIPS, 1992). Recentemente, com a introdução da técnica de marcação das GPs com a N-hidróxi-succinimida-biotina (NHS-biotina) – que se liga covalentemente aos grupos aminas livres (especialmente aos resíduos de lisina) das proteínas da superfície celular – as pesquisas relacionadas a essas proteínas se tornaram mais acessíveis e sem os inconvenientes do trabalho com elementos radioativos (FLESCH *et alii*, 1995). Por não atravessar a membrana celular, essa substância pode ser utilizada para marcar diretamente as plaquetas (DALE *et alii*, 1995; DALE & NORENBURG, 1990; FRANCO *et alii*, 1994; PENG *et alii*, 1994). Essas GPs podem ser assim identificadas pela avidina (cuja afinidade pela biotina é alta, $K_d \sim 10^{-15}\text{M}$) ligada a um fluorocromo (*e.g.*, fluoresceína). Utilizando a metodologia de citometria de fluxo, a fluorescência emitida pelo fluorocromo será proporcional à porcentagem de plaquetas circulantes marcadas com biotina e, assim, pode-se calcular precisamente a sobrevivência plaquetária (FRANCO *et alii*, 1994; HEILMANN *et alii*, 1993; MANNING *et alii*, 1996).

Além disso, a determinação quantitativa das GPs em plaquetas quiescentes e ativadas pode ainda ser feita de maneira precisa e específica pela citometria de fluxo, utilizando-se anticorpos marcados com fluorocromos específicos para as GPs (ABRAMS & SHATTIL, 1991; MICHELSON, 1996; MICHELSON & FURMAN, 1999; SCHMITZ *et alii*, 1998). Devido à alta sensibilidade da citometria de fluxo, esta técnica consegue diferenciar até 0,8% de plaquetas ativadas em uma população de plaquetas (SHATTIL *et alii*, 1987).

O citômetro de fluxo é um instrumento capaz de quantificar rápida e precisamente grandes números de células, ao movê-las individualmente em uma coluna de fluxo esquadrihada por um feixe de luz laser¹. Ao serem atingidas pelo feixe de laser, as células dispersam a luz, que é captada e analisada por sensores específicos (Figura 5). A luz dispersa adiante do feixe de laser é denominada dispersão dianteira, e a luz dispersa em ângulo reto é conhecida como dispersão lateral. A dispersão dianteira é

¹ Os citômetros de fluxo utilizados no laboratório clínico possuem um laser de íon argônio que emite luz no comprimento de onda de 488 nm (cor azul a azul-esverdeado).

proporcional ao tamanho celular, enquanto que a dispersão lateral reflete a estrutura interna da célula e se correlaciona com a granulação celular. As células podem ser também marcadas com fluorocromos, que absorvem a luz do laser (excitação) e a emitem em comprimentos de onda maiores (emissão), fenômeno conhecido como fluorescência. A luz que é emitida pelos fluorocromos ligado às células é separada por uma combinação de filtros que deixam passar determinados comprimentos de onda e refletem outros para os sensores de cores (verde, FL1; amarelo, FL2; laranja, FL3; vermelho, FL4) (Figura 5). Por exemplo, quando o isotiocianato de fluoresceína e o tiazol orange são excitados a 488 nm, eles emitem suas máximas de emissão ao redor de 520 nm e 533 nm, respectivamente, e suas fluorescências são analisadas pelo sensor FL1 (PARASKEVAS, 1999).

Figura 5 – Configuração básica do citômetro de fluxo, mostrando quatro sensores de fluorescência. A dispersão lateral e a luz fluorescente são coletadas conjuntamente e então separadas por uma série de filtros e lentes. A luz incidente (488 nm) é direcionada por um filtro dicróico ao sensor de dispersão lateral e subseqüentemente a luz fluorescente é separada por uma combinação de filtros em seus componentes individuais, correspondentes aos comprimentos de ondas da luz emitida pelos fluorocromos utilizados. Fonte: PARASKEVAS (1999).

A citometria de fluxo também tornou possível definir e quantificar um fenômeno previamente desconhecido, i.e., a fragmentação das plaquetas em determinadas situações de ativação plaquetária. A formação destas microvesículas plaquetárias – que são substancialmente menores que as plaquetas íntegras, mas que expressam marcadores específicos plaquetários, tais como os complexos GPIIb-IIIa e GPIb-IX-V – foi demonstrada claramente *in vitro* e ocorre em uma série de condições patológicas (AULT, 2001). As microvesículas plaquetárias são altamente trombogênicas quando comparadas às plaquetas íntegras, devido à exposição de fosfolípidios ácidos na superfície plaquetária e a conseqüente ativação da cascata de coagulação. A importância relativa das microvesículas nos processos ateroscleróticos e tromboembólicos não é ainda bem compreendida, como também a própria definição do que é uma microvesícula, porquanto as plaquetas ativadas freqüentemente demonstram uma

diminuição das suas propriedades de dispersão de luz, que o citômetro de fluxo registra como uma diminuição de tamanho plaquetário (AULT, 2001).

A citometria também pode ser utilizada para a avaliação não invasiva da trombopoese, por meio da determinação do número de plaquetas reticuladas circulantes. As plaquetas reticuladas foram descritas inicialmente por INGRAM & COOPERSMITH (1969) e, em analogia aos reticulócitos, foram consideradas plaquetas jovens. Somente 20 anos após é que se demonstrou que as plaquetas reticuladas continham uma quantidade elevada de RNA e podiam ser detectadas com corantes específicos para ácidos nucleicos, como o tiazol orange, utilizados para identificar os reticulócitos. Os estudos subsequentes demonstraram que estas plaquetas reticuladas são realmente as plaquetas mais jovens na circulação (DALE *et alii*, 1995) e que seus níveis aumentam quando a trombopoese é estimulada pela trombopoetina e diminuem em casos de hipoplasia medular (AULT, 2001; AULT *et alii*, 1992; KIENAST & SCHMITZ, 1990). Os estudos mais recentes têm demonstrado que a dosagem de trombopoetina e a quantificação das plaquetas reticuladas circulantes são os métodos mais sensíveis e específicos para distinguir as trombocitopenias hipoplásicas das hiperdestrutivas (KURATA *et alii*, 2001).

Dentre as mudanças na superfície plaquetária, devidas à ativação plaquetária, avaliadas pela citometria de fluxo, pode-se citar:

- A diminuição da densidade do complexo GPIb-IX-V, que é redistribuído para dentro do sistema de canais abertos plaquetários (GEORGE *et alii*, 1986; HOURDILLÉ *et alii*, 1990, 1992; MICHELSON *et alii*, 1994; RAO *et alii*, 1997);
- O aumento da densidade de GPIIb-IIIa na superfície plaquetária devido à redistribuição da GPIIb-IIIa presente nos reservatórios internos plaquetários (membranas internas das organelas de secreção) (WENCEL-DRAKE, 1990; WENCEL-DRAKE *et alii*, 1986; WOODS JR. *et alii*, 1986);
- O aumento da capacidade de ligação da GPIIb-IIIa ao fibrinogênio, avaliada por anticorpos monoclonais que reconhecem tanto o sítio ativo da GPIIb-IIIa onde o fibrinogênio se liga (*e.g.*, o anticorpo monoclonal PAC1), como os epítomos induzidos pela união de algum ligante (LIBS) à GPIIb-IIIa (por exemplo, o anticorpo monoclonal antiLIBS1) (GINSBERG *et alii*, 1990);
- A exposição na superfície plaquetária de glicoproteínas presentes na membrana interna das organelas de secreção. Dentre estas glicoproteínas, pode-se destacar a P-selectina (grânulos α), o CD63 (lisossomos), LAMP-1 (lisossomos) e o CD154 (HENN *et alii*, 1998; MICHELSON & FURMAN, 1999; SCHMITZ *et alii*, 1998);
- A ligação à membrana de proteínas solúveis liberadas dos grânulos durante a secreção plaquetária, como a trombospondina e a multimerina (MICHELSON & FURMAN, 1999);

- A expressão tanto nas plaquetas, como nas microvesículas, de uma superfície pró-coagulante como resultado do mecanismo de “flip-flop” de fosfolipídios ácidos (especialmente a fosfatidilserina) da parte interna para a externa da bicamada lipídica, que forma um substrato propício ao acoplamento da Xase e da protrombinase. Esta mudança pode ser detectada pela ligação de anticorpos anti-VIIIa e anti-Va, respectivamente, e pela ligação de anexina V aos fosfolipídios ácidos (DACHARY-PRIGENT *et alii*, 1993; SCHMITZ *et alii*, 1998; SIMS & WIEDMER, 2001; SIMS *et alii*, 1989).

Devido às suas importâncias fisiológicas, os complexos glicoprotéicos GPIb-IX-V e GPIIb-IIIa são indiscutivelmente os receptores plaquetários mais bem estudados.

Durante uma lesão endotelial, em condições de alta força de cisalhamento (*shear rate*) (como ocorre, por exemplo, na microcirculação), a GPIb é o receptor responsável pela adesão plaquetária e início da formação do tampão plaquetário. A GPIb forma com as glicoproteínas IX e V um complexo na membrana plaquetária, na razão de 2:2:1, respectivamente. A adesão plaquetária sob altas forças de cisalhamento é mediada pelo vWF, uma proteína plasmática que é capaz de se ligar à GPIb e ao colágeno da matriz subendotelial exposta (ANDREWS *et alii*, 1997). A GPIb apresenta sítios em sua porção extracelular que são facilmente hidrolisados pela tripsina e plasmina, além de outras proteases (GREENBERG *et alii*, 1979a,b; GUCCIONE *et alii*, 1985; MICHELSON & BARNARD, 1990).

O ligante fisiológico mais importante conhecido da GPIb-IX-V é o vWF, uma grande glicoproteína multimérica existente no plasma, nos grânulos α plaquetários e nos corpos de WEIBEL-PALADE das células endoteliais. A subunidade mínima do vWF maduro possui 2050 aminoácidos, que é ligada por pontes dissulfeto com outras subunidades, formando multímeros de até 20 000 kDa. O vWF contém três domínios A homólogos sequenciais, com aproximadamente 200 aminoácidos, que regulam a adesão plaquetária à matriz subendotelial. Os domínios A1 e A3 se ligam a diferentes tipos de colágeno, enquanto que o domínio A1 contém o sítio de ligação ao complexo GPIb. O vWF é ativado *in vitro* a se ligar ao complexo GPIb-IX-V por moduladores não fisiológicos, como a ristocetina (um antibiótico semelhante à vancomicina) e a botrocetina (uma lectina presente no veneno da *B. jararaca*). Ambos se ligam a regiões diferentes do domínio A1 do vWF, porém induzem uma modificação estrutural do vWF que o torna capaz de se ligar à GPIb e promover a aglutinação plaquetária (BERNDT *et alii*, 2001).

As glicoproteínas IIb (136 kDa) e IIIa (92 kDa) são as mais abundantes proteínas da membrana plasmática plaquetária humana (3% das proteínas plaquetárias totais e cerca de 17% da massa das proteínas da membrana plaquetária). A GPIIb (CD41) e a GPIIIa (CD61) formam um complexo estequiométrico de 1:1 dependente de Ca^{+2} , não covalentemente associado na membrana plaquetária.

Sua estabilidade depende da presença de uma concentração micromolar de cálcio extracelular. A formação de um complexo entre as duas glicoproteínas é mister para a expressão da sua capacidade de ligação ao fibrinogênio (BENNETT, 2001; CALVETE, 1994). A GPIIb e a GPIIIa são sintetizadas como precursores, aos quais são adicionados oligossacarídeos ricos em manose durante a tradução no retículo endoplasmático. Após a montagem e arranjo do complexo heterodimérico, este é rapidamente transportado para o aparelho de GOLGI, onde as cadeias de oligossacarídeos da pré-GPIIb e da pré-GPIIIa crescem e se tornam mais complexas. No complexo de GOLGI, a pré-GPIIb humana sofre clivagens proteolíticas, que a transforma na forma madura da GPIIb (136 kDa), composta de uma cadeia pesada (GPIIbH, 114 kDa) e outra leve (GPIIbL, 22 kDa), ambas ligadas por uma ponte de dissulfeto (CALVETE, 1995).

A GPIIIa humana é uma proteína rica em pontes dissulfeto, constituída de uma única cadeia polipeptídica com 5 domínios: um domínio citoplasmático, um domínio transmembrânico e um domínio extracelular, sendo que este contém uma região de ligação ao RGD e um sítio de estabilização do bolso de ligação ao fibrinogênio (CALVETE, 1994) (Figura 6).

1. Peptídeo sinalizador

COE -26 MRARARPRPL WAAVLALGAL AGVGVG
 HUM -26 MRARARPRPL WVTVLALGAL AGVGVG
 CAM -25 MRAQW-PGQL WAALLALGAL AGVVVG
 CÃO -22 MRA-----RPL WAAVLLLGAL AGTGVG
 SUÍ -22 MRA-----RPL WAAVLVVGAL AGVGVG

2. Domínio extracelular (sítio de ligação ao RGD binding; Sítio estabilizador do bolso do fibrinogênio)

COE 1 GPNI CTRGV SSCQCLAVS PMCAWCSDEA LPVGSRCPL RENLLDNCA PESI EFPVSE AQI LEARPLS DKSGDSSQV IQVSPQRI AL RLRPDDSKTF
 HUM 1 GPNI CTRGV SSCQCLAVS PMCAWCSDEA LPVGSRCPL KENLLKDNCA PESI EFPVSE ARVLEDRPLS DKSGDSSQV IQVSPQRI AL RLRPDDSKNF
 CAM 1 ESNI CTRGV NSCQCLAVS PVCACWSD E LSGGSPRCNL KENLLKDNCA PESI EFPVSE AQI LEARPLS SKGSGSSAQI TOVSPQRI VL RLRPDDSKI F
 CÃO 1 VSNI CTRGV HSCQCLAVS PVCACWSD E LSGGSPRCNL KENLLKDNCA LESI EFPVSE VRI LEARPLS NKSGDSSQI TOVSPQRI AL RLRPDDSKNF
 SUÍ 1 GPNI CATRGV SSCQCLAVS PMCAWCSDEA LPLGTPRCNL EENLLNDHCN PKYI EFPVSE ARI LEARPLS DKSGDSSQI TOVSPQRI LL RLRPDDSKSF
 RAT 1 L KKNLLKDKCS PESI EFPVSE AQI LEALPLS SKGSGDSSAQI TOVSPQRI AL RLRPDDAKI F

COE 101 SI QVRQVEDY PVDI YYLMDL SYSMKDDLRS I QNLGTLKAS QMRKLTSLNR I GFAGFVDKP VSPYMYI SPP EALRNP CYDM KTTCLPMFGY KHVLTLDQV
 HUM 101 SI QVRQVEDY PVDI YYLMDL SYSMKDDLRS I QNLGTLKAT QMRKLTSLNR I GFAGFVDKP VSPYMYI SPP EALRNP CYDM KTTCLPMFGY KHVLTLDQV
 CAM 101 SI QVRQVEDY PVDI YYLMDL SYSMKDDLRS I QNLGTLKAS QMRKLTSLNR I GFAGFVDKP VSPYMYI SPP QAI KNP CYNM KNACLP MFGY KHVLTLDQV
 CÃO 101 SI QVRQVEDY PVDI YYLMDL SYSMKDDLRS I QNLGTLKAS QMRKLTSLNR I GFAGFVDKP VSPYMYI SPP EALRNP CYDM KTTCLPMFGY KHVLTLDQV
 SUÍ 101 SI QVRQVEDY PVDI YYLMDL SYSMKDDLRS I QNLGTLKAS QMRKLTSLNR I GFAGFVDKP VSPYMYI SPP QALKNP CYDM KTTCLPMFGY KHVLTLDQV
 RAT 62 SI QVRQVEDY PVDI YYLMDL SYSMKDDLRS I QNLGTLKAS QMRKLTSLNR I GFAGFVDKP VSPYMYI SPP QAI KNP CYTM KSTCLPMFGY KHVLTLDQV

COE 201 TRFNEEVKKQ NVSRNRDAPE GGFDAI MQAT VCDEKI GWRN DASHLLVFTT DAKTHI ALDG RLAGI VRPN D GQCHI GGDNH YSASTTMDYP SLGLMTEKLS
 HUM 201 TRFNEEVKKQ NVSRNRDAPE GGFDAI MQAT VCDEKI GWRN DASHLLVFTT DAKTHI ALDG RLAGI VOPND GQCHVGSNDH YSASTTMDYP SLGLMTEKLS
 CAM 201 SRFNEEVKKQ NVSRNRDAPE GGFDAI MQAT VCDEKI GWRN DASHLLVFTT DAKTHI ALDG RLAGI VLPND GHCHI GTDNH YSASTTMDYP SLGLMTEKLS
 CÃO 201 TRFNEEVKKQ NVSRNRDAPE GGFDAI MQAT VCDEKI GWRN DASHLLVFTT DAKTHI ALDG RLAGI VOPND GQCHI GSDNH YSASTTMDYP SLGLMTEKLS
 SUÍ 201 TRFNEEVKKQ NVSRNRDAPE GGFDAI MQAT VCDEKI GWRN DASHLLVFTT DAKTHI ALDG RLAGI VOPND GQCHVGSNDH YSASTTMDYP SLGLI TEKLS
 RAT 162 TRFNEEVKKQ NVSRNRDAPE GGFDAI MQAT VCDEKI GWRN DASHLLVFTT DAKTHI ALDG RLAGI VLPND GRCHI GPDNH YSASTTMDYP SLGLMTEKLS

COE 301 QKNI NLI FAV TENVFNLYQN YSELI PGTTV GVLSTNSSNI LQLI VDAYGK I RSKVELEVR DLPEELSLSF NATCLNNEVI PGLKSCVGLK I GDTVFSFI E
 HUM 301 QKNI NLI FAV TENVFNLYQN YSELI PGTTV GVLSDSSNV LQLI VDAYGK I RSKVELEVR DLPEELSLSF NATCLNNEVI PGLKSCMGLK I GDTVFSFI E
 CAM 301 QKNI NLI FAV TENVFNLYQN YSELI PGTTV GVLSDSSNV LQLI VDAYGK I RSKVELEVR DLPEELSLSF NATCLNNEVI PGLKSCVGLK I GDTVFSFI E
 CÃO 301 QKNI NLI FAV TENVFNLYQN YSELI PGTTV GI LSTDNSSNV LQLI VDAYGK I RSKVELEVR DLPEELSLSF NATCLNNEVI PGLKSCVGLK I GDTVFSFI E
 SUÍ 301 QKNI NLI FAV TEGVFNLYQN YSELI PGTTV GVLSDSSNV LQLI VDAYGK I RSKVELEVR DLPEELSLSF NATCLNNEVI PGLKSCVGLK I GDTVFSFI E
 RAT 262 QKNI NLI FAV TENVFNLYQN YSELI PGTTV GVLSDSSNV LQLI VDAYGK I RYKVELEVR DLPEELSLSF NATCLNNEVI PGLKSCVGLK I GDTVFSFI E

COE 401 AKVRGCPQEK EKSFTI KPVG FKDSLTVQVT FDCDCACQAH AEPHSHRCNN NGTFECGVC RCGPGWLGSO CECSEEDYSP SQDDQCSPE GQPI CSORGE
 HUM 401 AKVRGCPQEK EKSFTI KPVG FKDSLTVQVT FDCDCACQAH AEPNSHRCNN NGTFECGVC RCGPGWLGSO CECSEEDYSP SQDDQCSPE GQPVCSORGE
 CAM 401 AKVRGCPQEK EKSFTI KPVG FKDSLTVQVT FDCDCACQAH AQPSSPRCNC NGTFECGVC RCGPGWLGSM CECSEEDYSP SQDDQCSPE GQPI CSORGE
 CÃO 401 AKVRGCPQEK EKSFTI KPVG FKDSLTVQVT FDCDCACQAH AEPSSHRCNN NGTFECGVC RCGPGWLGSO CECSEEDYSP SQDDQCSPE GQPVCSORGE
 SUÍ 401 AKVRGCPQEK EKSFTI KPVG FKDSLTVQVT FDCDCACQAH AEPSPRCNC NGTFECGVC RCGPGWLGSO CECSEEDYSP SQDDQCSPE GQPI CSORGE
 RAT 362 AKVRGCPQEK EKSFTI KPVG FKDSLTVQVT FDCDCACQAH AQPSPRCNC NGTFECGVC RCGPGWLGSM CECSEEDYSP SQDDQCSPE GQPI CSORGE

COE 501 CLCGQCVCHS SDFGKI TGKY CECDDFSCVR YKGEKSGHG QCSGDCDCLD SDWTGYCNC TTRTDTCMSS NGLLCSGRGK CECGSCVCI Q PGSYGDTCEK
 HUM 501 CLCGQCVCHS SDFGKI TGKY CECDDFSCVR YKGEKSGHG QCSGDCDCLD SDWTGYCNC TTRTDTCMSS NGLLCSGRGK CECGSCVCI Q PGSYGDTCEK
 CAM 501 CLCGQCVCHS SDFGKI TGKY CECDDFSCVR YKGEKSGHG QCSGDCDCLD SDWTGYCNC TTRTDTCMST NGLLCSGRGN CECGSCVCI Q PGSYGDTCEK
 CÃO 501 CLCGQCVCHS SDFGKI TGKY CECDDFSCVR YKGEKSGHG QCSGDCDCLD SDWTGYCNC TTRTDTCMSS NGLLCSGRGK CECGSCVCI Q PGSYGDTCEK
 SUÍ 501 CLCGQCVCHS SDFGKI TGKY CECDDFSCVR YKGEKSGHG QCSGDCDCLD SDWTGYCNC TTRTDTCLSS NGLLCSGRGN CECGSCVCI Q PGSYGDTCEK
 RAT 462 CLCGQCVCHS SDFGKI TGKY CECDDFSCVR YKGEKSGHG QCSGDCDCLD SDWTGYCNC TTRTDTCMST NGLLCSGRGN CECGSCVCI Q PGSYGDTCEK

COE 601 CPTCPDACTF KKECCECKKF ERGVLHEENT CSRYCRDEME SVKELRDTGK DAVNCTYKNE DDCVVRFOYY EDSSGKSI LY VVEEPEC PKG PD
 HUM 601 CPTCPDACTF KKECCECKKF DRGALHEENT CNRYCRDEI E SVKELKDTGK DAVNCTYKNE DDCVVRFOYY EDSSGKSI LY VVEEPEC PKG PD
 CAM 601 CPTCPDACS F KKECCECKKF NRGTLEHEENT CSRYCRDDI E QVKELTDTGK NAVNCTYKNE DDCVVRFOYY EDTSGRVLY VVEEPEC PKG PD
 CÃO 601 CPTCPDACTF KKECCECKKF DRGTLHDDNT CNRYCRDEI E SVKELKDTGK DAVNCTYKNE DDCVVRFOYY EDSSGKSI LY VVEEPEC PKG PD
 SUÍ 601 CPTCPDACTF KKECCECKKF NRGSLEYANT CNRYCRDEI E SVKELQDSGK NAVNCTYKNE DDCVVRFOYY EDSSGKSI LY VVEEPEC PKG PD
 RAT 562 CPTCPDACS F KKECCECKKF NRGSYMENN CNRFRDDI E LVKELTDTGK NAVNCTYKNE DDCVVRFOYY EDSSGRVLY VVEEPEC PKG PD

3. Domínio transmembrânico

COE 693 I LVLLSVMG AI LLI GFALL LI WKLLI TI
 HUM 693 I LVLLSVMG AI LLI GLAAL LI WKLLI TI
 CAM 693 I LVLLSVMG AI LLI GLATL LI WKLLI TI
 CÃO 693 I LVLLSVMG AI LLI GLATL LI WKLLI TI
 SUÍ 693 I LVLLSVMG AI LLI GLATL LI WKLLI TI
 RAT 654 I LVLLSVMG AI LLI GLATL LI WKLLI TI

4. Domínio citoplasmático

COE 722 HDRKEFAKFE EERARAKWDT ANNPLYKEAT STFTNI TYRG T
 HUM 722 HDRKEFAKFE EERARAKWDT ANNPLYKEAT STFTNI TYRG T
 CAM 722 HDRKEFAKFE EERARAKWDT ANNPLYKEAT STFTNI TYRG T
 CÃO 722 HDRKEFAKFE EERARAKWDT ANNPLYKEAT STFTNI TYRG T
 SUÍ 722 HDRKEFAKFE EERARAKWDT ANNPLYKEAT STFTNI TYRG T
 RAT 683 HDRKEFAKFE EERARAKWDT ANNPLYKEAT STFTNI TYRG T

Figura 6 – Homologia de aminoácidos entre a GPIIIa de coelho (COE, TAO & PARRILLA, 1999a) e de outras espécies. HUM – homem (FRACHET *et alii*, 1990); CAM – camundongo (MCHUGH *et alii*, 2001); CÃO (LIPSCOMB *et alii*, 1999); SUI – suíno (JIMENEZ-MARIN *et alii*, 2001); RAT – rato, (CIEUTAT *et alii*, 1993, sequência parcial). Os resíduos de aminoácidos hidrofóbicos estão representados em azul, os ácidos em vermelho e os básicos em verde. O traço (-) indica ausência de um resíduo de aminoácido. A tarja representa sítios de glicosilação, a tarja de fosforilação de tirosina e a tarja o resíduo N-terminal da proteína madura.

A homologia é alta entre as sequências da GPIIIa das diversas espécies, sendo que a homologia total entre o coelho e o homem chega a 89%. Da mesma maneira, as homologias entre o homem e o coelho são altas para o peptídeo sinalizador (88%), para os domínios extracelular (93%), transmembrânico (97%) e citoplasmático (100%), para a região de ligação ao RGD (97%) e para o sítio estabilizador do

bolso de ligação ao fibrinogênio (92%) da GPIIIa. O domínio citoplasmático é altamente conservado entre as espécies, inclusive as regiões de fosforilação da tirosina, serina e treonina envolvidas na sinalização de dentro para fora e de fora para dentro (PHILLIPS *et alii*, 2001).

A GPIIb possui sete domínios: o domínio extracelular, o transmembrânico, o citoplasmático e quatro domínios de ligação ao cálcio. A cadeia leve (GPIIbL) contém os domínios citoplasmático, transmembrânico e um curto segmento do domínio extracelular. A cadeia pesada, GPIIbH, contém a maior parte do domínio extracelular, incluindo os 4 domínios de ligação ao cálcio, cujas afinidades por este elemento são diversas (Figura 7). O segundo domínio ligante de cálcio também é a região da GPIIb (GPIIbH 294-314) de ligação ao dodecapeptídeo carboxiterminal da cadeia γ do fibrinogênio (CALVETE, 1994; LIPSCOMB *et alii*, 2001).

De uma maneira geral, as homologias entre os domínios da GPIIb do homem e do coelho são menores do que aquelas para a GPIIIa. A homologia entre as seqüências totais da GPIIb do homem e do coelho é de 83%. Para o peptídeo sinalizador (77%) e os domínios extracelular (84%), transmembrânico (88%) e citoplasmático (80%), as homologias são também menores. Contudo, para o primeiro (92%), segundo (100%), terceiro (100%) e quarto (100%) sítios ligantes de cálcio, como também para o sítio de ligação do dodecapeptídeo da cadeia γ do fibrinogênio (96%), as homologias são altas entre as duas espécies.

O complexo GPIIb-IIIa pertence à superfamília das integrinas, que representam uma grande família de receptores expressos na superfície de todas as células. Os sinais mediados pelas integrinas regulam a interação célula-célula e célula-matriz, eventos importantes em uma grande variedade de fenômenos biológicos. As integrinas são receptores heterodiméricos, constituídos de uma subunidade α (de 120 a 180 kDa) associada de forma não covalente a uma subunidade β (de 90-110 kDa). No caso da GPIIb-IIIa, a subunidade α é a GPIIb (α_{IIB}) e a β a GPIIIa (β_3), formando a integrina $\alpha_{IIB}\beta_3$. Esta mesma subunidade β_3 também está presente no receptor de vitronectina (integrina $\alpha_v\beta_3$). No entanto, a subunidade α_{IIB} é expressa normalmente somente nas plaquetas e nos megacariócitos. Embora a $\alpha_v\beta_3$ e a GPIIb-IIIa sejam sintetizadas por um mecanismo comum, a cadeia da GPIIIa é glicosilada de modo diverso para ser expressa no complexo com a GPIIb nas plaquetas ou com a α_v nas células endoteliais (BENNETT, 2001; CALVETE, 1994, 1999).

1. Peptídeo sinalizador

COE -31 MARALGPLPA FWFLEWALLL LGPGAGPPAW A
 HUM -31 MARALCPLOA LWLLEWVLLL LGPCAAPPAA A
 CAM -31 MARASCAWHS LWLLQWTPLF LGPSAVPPVW A
 CÃO -31 MARAVCPUNA LWLLEWVQLF LGPGAIPLGW A
 SUÍ -31 MARALCLLHA LWLLEWVQLL LGPGAAPPTW A
 RAT -31 MARASCAWNT LWLLQWTPLF LGPSAAPPAA A

2. Domínio extracelular (1°, 2°, 3° e 4° sítios ligantes de cálcio)

COE 1 LNLDPVQLTI YTGNGSHFG FSLDFYKDSH GSAVI VVGAP RTLGLGQKET GGVFLCPWKA EGSPCSLLSF NLSDEYRKTS SOLFQTFRFR QGLGASVVSU
 HUM 1 LNLDPVQLTI YAGPNSQFQ FSLDFHKDSH GRVAI VVGAP RTLGPSEET GGVFLCPWRA EGGQCPSLLF DLRLDETRNVG SOTLQTFKAR QGLGASVVSU
 CAM 1 LNLDSKFSV YAGPNSHFG FSVDFHKDSH GSVSI VVGAP RALNASQEET GAVFLCPWKA NGGKCNPLLF DLRLDETRNLG FOI FQTFKGT QGLGASVVSU
 CÃO 1 LNLDPVQLTI YTGNGSHFG FSLDFYKDSH GRVAFVVGAP RTLGRSQEET GGVFLCPWRA EGGQCTSLPF DLNDETRHI G SHTFQTFKSR QGLGASVVSU
 SUÍ 1 LNLDPVHLTI YTGPNHSHFG FSLDFYKDSH GSVSI VVGAP RTLGRNLEET GGVFLCPWKA KSVQCVALSF NLDDDETRNVG AQTQTFKAR QGLGASVLTW
 RAT 1 LNLDPVKFSV YTGPNHSHFG FSVDFHKDSH GSVSI VVGAP RALNANQEET GGVFLCPWKA NNGTCTSLLF DLRLDETRKLS FQTFQTFKGT QGLGASVLSW

COE 101 NDVI VACAPW QHNVLEKAE EAEKTPVGGC FVAHLPSGRG AEYSPCRGNT MSHVYKMYL R-DLRSCAEG FSSVI TQEGE LVLGAPGGY YLGLVRAPI
 HUM 101 SDVI VACAPW QHNVLEKTE EAEKTPVGGC FLAQPESSGR AEYSPCRGNT LSRI YVENDF SWDKRYCEAG FSSVTOAGE LVLGAPGGY FLGLLAQAPV
 CAM 101 NDVI VACAPW QHNVLEKRD EAEKTPVGGC FLAQQLSGGR AEYSPCRANT MSSVYAES-F RGDKRYCEAG FSLAVTQAGE LVLGAPGGY FLGLLARVPI
 CÃO 101 RDNVVACAPW QHNVLEKTE EAEKTPVGGC FVAQLQNSGR AEYSPCRANT MSSVYKMYL N-DKRYCEAG FSAAVTQAGV LVLGAPGGY FLGLLVRTPI
 SUÍ 101 RDNVVACAPW QHNVLEKTE EAEKTPVGGC FVAQLQNSGR AEYSPCRANT MSSVYKMYL N-DKRYCEAG FSAAVTQAGE LVLGAPGGY FLGLMARAPI
 RAT 101 NDVI VACAPW QHNVLEKTE EAEKTPVGGC FVAELQSGGR AEYSPCRANT MSSVYKMYL N-DKRYCEAG FSLAVTQAGE LVLGAPGGY FLGLLVRVPI

COE 200 ANI I SSYSPG VLLWTPVQND FTFDYSNRKY FDGYRGYSVA VGEFDGLST TEYVLGAPTW SWTMGAVEI L DSYFYRLHRL QGEQMASYFG HSAVAVTDVNG
 HUM 201 ADI FSSYRPG I LLLWHVSSQS LSFSSSNPEY FDGYRGYSVA VGEFDGLST TEYVLGAPTW SWTMGAVEI L DSYFYRLHRL QGEQMASYFG HSAVAVTDVNG
 CAM 200 ENI I STYRPG TLLWHVSSQS FTYDNSNPVF FTYDNSNPVF TEYVLGAPTW SWTMGAVEI L DSYFYRLHRL QGEQMASYFG HSAVAVTDVNG
 CÃO 201 DNI I SSYRPG TLLWHVSSQS FTYDYSKPEY YDGYRGYSVA VGEFDGLST TEYVLGAPTW SWTMGAVEI L DSYFYRLHRL QGEQMASYFG HSAVAVTDVNG
 SUÍ 200 ADI I SSYRPG TLLWHVPTQK LTFDSDLEPEY YESYLGYSVA VGEFDGLST TEYVLGAPTW SWTMGAVEI L DSYFYRLHRL QGEQMASYFG HSAVAVTDVNG
 RAT 200 ENI I STYRPG TLLWHVSNQR FSYDSSNPVY FHGYRGYSVA VGEFDGLST TEYI FGAPTW SWTMGAVEI L DSYFYRLHRL QGEQMASYFG HSAVAVTDVNG

COE 300 DGRHDLVGA PLFMASADH KLAIEVGRVYL FLQQLGPHLL GAPSLLLTGT QLYGRFGSAI APLGLDNRDG YNDVAVAAPY GGPSGRGQVL VYLGQSEGLN
 HUM 300 DGRHDLVGA PLYMESRADR KLAIEVGRVYL FLQPRGPHAL GAPSLLLTGT QLYGRFGSAI APLGLDNRDG YNDI AVAAPY GGPSGRGQVL VYLGQSEGLN
 CAM 300 DGRHDLVGA PLYMESRADR KLAIEVGRVYL FLQPRGPHAL STPTLLLTGT QLYGRFGSAI APLGLDNRDG YNDI AVAAPY GGPSGRGQVL VYLGQSEGLN
 CÃO 301 DGRHDLVGA PLFMESRADR KLAIEVGRVYL FLQPRGPHAL GAPSLLLTGT QLYGRFGSAI APLGLDNRDG YNDI AVAAPY GGPSGRGQVL VYLGQSEGLN
 SUÍ 300 DGRHDLVGA PLYMESRADH KLAIEVGRVYL FLQPRGPHAL STPTLLLTGT QLYGRFGSAI APLGLDNRDG YNDVAVAAPY GGPSGRGQVL VYLGQSEGLN
 RAT 300 DGRHDLVGA PLYMESRADR KLAIEVGRVYL FLQPRGPHAL STPTLLLTGT QLYGRFGSAI APLGLDNRDG YNDVAVAAPY GGPSGRGQVL VYLGQSEGLN

COE 400 PHPSQVLDSP FPAGSAGFGC LRGAVDI DDN GYPDLVGA GADKVVVYRA QPVVMDVQL LVQDSLNPV KNCVLHQTNT PVSCFNI QMC VGTGTHNI PQ
 HUM 401 SRPSQVLDSP FPGTSGFGFS LRGAVDI DDN GYPDLVGA GANOVAVYRA QPVVMDVQL LVQDSLNPV KNCVLHQTNT PVSCFNI QMC VGTGTHNI PQ
 CAM 400 SRPSQVLDSP FPGTSGFGFS LRGAVDI DDN GYPDLVGA WASKVAVYRA QPVVMDVQL LVQDSLNPV KNCVLHQTNT PVSCFNI QMC VGTGTHNI PQ
 CÃO 401 SRPSQVLDSP FPGTSGFGFS LRGAVDI DDN GYPDLVGA GASKVAVYRA QPVVMDVQL LVQDSLNPV KNCVLHQTNT PVSCFNI QMC VGTGTHNI PQ
 SUÍ 400 SRPSQVLDSP FPGTSGFGFS LRGAVDI DDN GYPDLVGA GADKVVVYRA QPVVMDVQL LVQDSLNPV KNCVLHQTNT PVSCFNI QMC VGTGTHNI PQ
 RAT 400 SRPSQVLDSP FPGTSGFGFS LRGAVDI DDN GYPDLVGA GASKVAVYRA QPVVMDVQL LVQDSLNPV KNCVLHQTNT PVSCFNI QMC VGTGTHNI PQ

COE 500 GLYLQAEQL DROKPRQGR VLLLSQAS TLLSMDLGR QSRCHNTTA FLRDEADFRD KLSPI VLSFN VSLQPKAEGV APAVVLHGNT HVQEQTRI I L
 HUM 501 KLSLNAELQL DROKPRQGR VLLLSQAS TLLSMDLGR HSP1 CHTTTA FLRDEADFRD KLSPI VLSFN VSLQPKAEGV APAVVLHGNT HVQEQTRI I L
 CAM 500 KLSLNAELQL DROKPRQGR VLLLSQAS TLLSMDLGR DKPI CHTTTA FLRDEADFRD KLSPI VLSFN VSLQPKAEGV APAVVLHGNT HVQEQTRI I L
 CÃO 501 QLPLNAELQL DROKPRQGR VLLLSQAS TLLSMDLGR HSP1 CHTTTA FLRDEADFRD KLSPI VLSFN VSLQPKAEGV APAVVLHGNT HVQEQTRI I L
 SUÍ 500 KLSLNAELQL DROKPHOSRR VLLLSQAS TLLSMDLGR QSPCHNTTA FLRDEADFRD KLSPI VLSFN VSLQPKAEGV APAVVLHGNT HVQEQTRI I L
 RAT 500 KLSLNAELQL DROKPRQGR VLLLSQAS TLLSMDLGR NKPI CHTI KA FLRDEADFRD KLSPI VLSFN VSLQPKAEGV APAVVLHGNT HVQEQTRI I L

COE 600 ECGEDDVCVP QLHLTASLKG SPILLI GADNV LELQMDAANE GEGAYEAEVL VHLPLGAHYM RAVSTMEGLE RLI CNQKKN ETRVVLCELG NPMK-QARI G
 HUM 601 ECGEDDVCVP QLHLTASLKG SPILLI GADNV LELQMDAANE GEGAYEAEVL VHLPLGAHYM RALSNVEGFE RLI CNQKKN ETRVVLCELG NPMKKNQAI G
 CAM 600 DCGEDDVCVP QLRLTATAGD SPILLI GADNV LELKI EAAND GEGAYEAEVL VHLPPGAHYM RALSN EGF ERLVCTQKKN ESRVALCELG NPMKKTTRI G
 CÃO 601 DCGEDDVCVP QLRLTATAGD SPILLI GADNV LELQMDAANE GEGAYEAEVL VHLPPGAHYM RALSN EGF ERLVCTQKKN ETRVVLCELG NPMKKNQAI G
 SUÍ 600 DCGEDDVCVP QLRLTATAGD SPILLI GADNV LELHVAANE GEGAYEAEVL VHLPPGAHYM QALSNKTSFE RLI CTQKKN ETKVVLCELG NPMKKTTRI G
 RAT 600 DCGEDDVCVP QLRLTATAGD SPILLI GADNV LELKVNASND GEGAYEAEVL VHLPPGAHYM RALSNVEGFE RLI CTQKKN ETRVVLCELG NPMKKTTRI G

COE 699 I TMLVSVGNL EDAGESVSFQ LQI RSKNSQN PNSEAVLLAV PVRAAAQVEL RGNSFPASLV LA-EEGDQEQ NSLD-L--KV EHTYELHNNG PGTVRLHLLT
 HUM 701 I TMLVSVGNL EDAGESVSFQ LQI RSKNSQN PNSEAVLLAV PVRAAAQVEL RGNSFPASLV VAAEEGDEQ NSLD-L--KV EHTYELHNNG PGTVRLHLLT
 CAM 700 I TMLVSVGNL EDAGESVSFQ LQI RSKNSQN PNSEAVLLAV PVRAAAQVEL RGNSFPASLV VAAEEGDEQ NSLD-L--KV EHTYELHNNG PGTVRLHLLT
 CÃO 701 I TMLVSVGNL EDAGESVSFQ LQI RSKNSQN PNSEAVLLAV PVRAAAQVEL RGNSFPASLV VAAEEGDEQ NSLD-L--KV EHTYELHNNG PGTVRLHLLT
 SUÍ 700 I TMLVSVGNL EDAGESVSFQ LQI RSKNSQN PNSEAVLLAV PVRAAAQVEL RGNSFPASLV VAAEEGDEQ NSLD-L--KV EHTYELHNNG PGTVRLHLLT
 RAT 700 I TMLVSVGNL EDAGESVSFQ LQI RSKNSQN PNSEAVLLAV PVRAAAQVEL RGNSFPASLV VAAEEGDEQ NSLD-L--KV EHTYELHNNG PGTVRLHLLT

COE 795 I HLPQOSQPS DLLYI LDI EP QGGLQCSQP SPNPLKI NWR LPTSPSPMH PGY-RRERRR ADLLEP-QPS SAAGPRDPVL VSCD-SAPCT VVQCELOEMA
 HUM 801 I HLPQOSQPS DLLYI LDI QP QGGLQCSQP SPNPLKI NWR LPTSPSPMH PGY-RRERRR ADLLEP-QPS SAAGPRDPVL VSCD-SAPCT VVQCELOEMA
 CAM 800 I HLPQOSQPS DLLYI LDI QP QGGLQCSQP SPNPLKI NWR LPTSPSPMH PGY-RRERRR ADLLEP-QPS SAAGPRDPVL VSCD-SAPCT VVQCELOEMA
 CÃO 800 LCFPGESQPS DLLYI LDI QP QGGLQCSQP SPNPLKI NWR LPTSPSPMH PGY-RRERRR ADLLEP-QPS SAAGPRDPVL VSCD-SAPCT VVQCELOEMA
 SUÍ 798 I HLPQOSQPS DLLYI LDI QP QGGLQCSQP SPNPLKI NWR LPTSPSPMH PGY-RRERRR ADLLEP-QPS SAAGPRDPVL VSCD-SAPCT VVQCELOEMA
 RAT 800 I HLPQOSQPS DLLYI LDI QP QGGLQCSQP SPNPLKI NWR LPTSPSPMH PGY-RRERRR ADLLEP-QPS SAAGPRDPVL VSCD-SAPCT VVQCELOEMA

COE 892 RGQAMVTVL AFLGLSLRQ RPLDQFVLQS QAWFNVSLLP YAVPALSPLS GEALVQTOLL RVLEEK
 HUM 897 RGQAMVTVL AFLGLSLRQ RPLDQFVLQS QAWFNVSLLP YAVPALSPLS GEALVQTOLL RALEER
 CAM 892 RGQAMVTVL AFLGLSLRQ RPLDQFVLQS QAWFNVSLLP YAVPALSPLS GEALVQTOLL RALEER
 CÃO 896 RGQAMVTVL AFLGLSLRQ RPLDQFVLQS QAWFNVSLLP YAVPALSPLS GEALVQTOLL RALEER
 SUÍ 894 RGQAMVTVL AFLGLSLRQ RPLDQFVLQS QAWFNVSLLP YAVPALSPLS GEALVQTOLL RALEER
 RAT 896 RGQAMVTVL AFLGLSLRQ RPLDQFVLQS QAWFNVSLLP YAVPALSPLS GEALVQTOLL RALEER

3. Domínio transmembrânico

COE 958 AVPI WWVLVG ALGGLLLLT LVLAMW
 HUM 963 AI PI WWVLVG VLGGLLLLT LVLAMW
 CAM 958 AI PVWWVLVG VLGGLLLLT LVLAMW
 CÃO 962 DI PI WWVLVG VLGGLLLLT LVLAMW
 SUÍ 960 EVPLWWVLVG VLGGLLLLT LVLAMW
 RAT 962 DI PVWWVLVG VLGGLLLLT LVLAMW

4. Domínio citoplasmático

COE 984 KVGFFKRNRL PLEEEDEEE
 HUM 989 KVGFFKRNRL PLEEDDEEE
 CAM 984 KAGFFKRNRL PLEEEDEEE
 CÃO 988 KGGFFKRNRL PLEEEDEEE
 SUÍ 986 KCGFFKRNRL PLEESDEEE
 RAT 988 KAGFFKRNRL PLEEEDEEE

Figura 7 – Homologia de aminoácidos entre a GPIIb de coelho (COE, TAO & PARRILLA, 1999b) e de outras espécies. HUM – homem (PONCZ *et alii*, 1987); CAM – camundongo (THORNTON & PONCZ, 1999); CÃO (LIPSCOMB *et alii*, 2001); SUÍ – suíno (TAO & PARRILLA, 1999c); RAT – rato (PONCZ & NEWMAN, 1990). Os resíduos de aminoácidos hidrofóbicos estão representados em azul, os ácidos em vermelho e os básicos em verde. O traço (-) indica ausência de um resíduo de aminoácido. A tarja representa sítios de glicosilação e a tarja o resíduo N-terminal da proteína madura. A sequência 294-314 da GPIIb é o sítio de ligação ao dodecapeptídeo da cadeia γ do fibrinogênio.

A GPIIb-IIIa modifica a sua função à medida que seus estados quaternários se modificam. Dessarte, os estados quaternários da GPIIb-IIIa são diferentes se ela está em repouso, ativada ou ativada e ocupada por um ligante (Figura 8 e 9). Aparentemente, a actina e as proteínas associadas a ela reprimem os domínios intracitoplasmáticos da GPIIb-IIIa em um estado de repouso, que é liberto durante a ativação plaquetária, uma vez que as proteínas do citoesqueleto se envolvem com a mudança de forma e tornam a GPIIb-IIIa capaz de se ligar ao fibrinogênio (BENNETT, 2001).

Figura 8 – Modelo esquemático da estrutura da GPIIb-IIIa em repouso (esquerda) e da sua mudança estrutural causada após a ativação plaquetária (direita). O ponto negro mostra a localização arbitrária do sítio de união ao ligante, que se abre após a ativação da GPIIb-IIIa. A superfície hachurada representa a região rica em pontes dissulfeto da GPIIIa. GPIIIa: glicoproteína IIIa; GPIIbH: cadeia pesada da GPIIb; GPIIbL: cadeia leve da GPIIb; Ca^{++} : sítios ligantes de cálcio; a região circundada ao redor de um dos sítios ligantes de cálcio (GPIIbH 294-314) contém a região de ligação ao dodecapeptídeo carboxiterminal da cadeia γ do fibrinogênio. Fonte: CALVETE (1995), modificado.

O fluxo de informações que causa a modificação do estado de repouso da GPIIb-IIIa para o seu estado de ativação, quando ela se torna capaz de unir-se a ligantes, é regulado por uma plêiade de eventos intracelulares e este fenômeno é conhecido como sinalização de dentro para fora. Após a ocupação do sítio de ligação das integrinas, a informação desta ligação é enviada através da membrana plasmática para o interior do citoplasma, por um processo conhecido como sinalização de fora para dentro, evento que promove o agrupamento das integrinas na superfície celular e a fixação dos

domínios intracelulares das integrinas ao citoesqueleto plaquetário. A sinalização de fora para dentro também está relacionada com diversas funções críticas à fisiologia plaquetária, como a geração de TxA_2 , a ativação da calpaína, a fosforilação de proteínas, o metabolismo fosfolipídico, a microvesiculação plaquetária e a secreção de grânulos α e corpos densos. Tanto a ativação de dentro para fora como a de fora para dentro têm papéis complementares na regulação da atividade da GPIIb-IIIa (CALVETE, 1999; PHILLIPS *et alii*, 2001).

Uma plaqueta normal humana contém ao redor de 50 a 100 mil cópias do complexo GPIIb-IIIa, 80% dos quais estão distribuídos aleatoriamente e expostos na superfície plaquetária. O restante da GPIIb-IIIa está localizada na superfície do sistema de canais abertos e na membrana interna dos grânulos α . Esta população oculta da GPIIb-IIIa apenas se torna expressa na superfície após a ativação plaquetária (BENNETT, 2001; CALVETE, 1994). Como descrito anteriormente, durante a ativação plaquetária existe uma mudança na estrutura quaternária da GPIIb-IIIa, de modo a abrir o seu sítio de ligação para a entrada de ligantes macromoleculares. Posteriormente à ligação do fibrinogênio ou de suas seqüências de reconhecimento à GPIIb-IIIa, outras mudanças estruturais se sucedem nestas glicoproteínas, de modo que surjam novos epítomos – denominados epítomos induzidos pela união de algum ligante (LIBS) (Figura 9) (CALVETE, 1994).

Figura 9 – Modelo do fibrinogênio ligado à GPIIb-IIIa ativada (vide Figura 8) e exposição de LIBS como consequência desta ligação. Neste modelo, o domínio D do fibrinogênio (Fb, cinza) é o principal responsável pela ligação do fibrinogênio à GPIIb-IIIa. Por uma questão de clareza, apenas parte da molécula do fibrinogênio é mostrada. C5GP3, D3GP3 e LIBS-2 representam LIBS reconhecidos por anticorpos monoclonais, cuja região de ligação à GPIIIa já foi determinada. Da mesma forma, o PMI-1 é um LIBS da GPIIb. Fonte: CALVETE (1995), modificado.

As moléculas de fibrinogênio são estruturas alongadas, de 45 nm de comprimento, formadas por dois domínios D, cada um conectado por um segmento serpentinado ao domínio central E (Figura 10). A molécula do fibrinogênio é composta por um par de três cadeias polipeptídicas, denominadas $\alpha\alpha$, $\beta\beta$ e γ , que são mantidas unidas por meio de 5 pontes de dissulfeto entre as regiões aminoterminais destas cadeias, no domínio E. Cerca de 8% do fibrinogênio circulante apresenta uma pequena variação da cadeia γ , denominada γ' , em que os últimos 4 aminoácidos (AGDV) desta cadeia, envolvidos diretamente com a agregação plaquetária (vide adiante), são substituídos por uma sequência de 20 aminoácidos que contém dois resíduos de tirosina sulfatada. A cadeia γ' do fibrinogênio se liga à subunidade B do fator XIII e serve, assim, como um carreador para a subunidade A do fator XIII; contudo, esta molécula não se liga à GPIIb-IIIa (MOSESSON *et alii*, 2001).

Figura 10 – Diagrama esquemático da molécula de fibrinogênio e de um monômero da fibrina. FPA: fibrinopeptídeo A; FPB: fibrinopeptídeo B; α_2 -PI: α_2 -antiplasmina; XIII: fator XIII. Fonte: MOSESSON *et alii* (2001), modificado.

O fibrinogênio é o principal ligante da GPIIb-IIIa e sua ligação a dois destes receptores localizados em plaquetas diferentes ocasiona a agregação plaquetária. Além de seu papel principal como receptor do fibrinogênio, a GPIIb-IIIa também pode se ligar a outras proteínas adesivas encontradas no plasma ou no subendotélio, como a fibronectina, o vWF e a vitronectina. A ligação tanto ao fibrinogênio como ao vWF causa a agregação plaquetária, contudo, devido à sua alta concentração no plasma, o fibrinogênio é o ligante fisiológico mais importante da GPIIb-IIIa. A ligação destas proteínas adesivas à GPIIb-IIIa é mutuamente exclusiva e é em parte mediada pela sequência de aminoácidos Arg-Gly-Asp

(RGD), que está presente nas estruturas de todas estas proteínas. Além do motivo RGD, muitas proteínas adesivas contêm outros sítios que se ligam às integrinas. No caso do fibrinogênio, o dodecapeptídeo da região carboxiterminal da cadeia γ do fibrinogênio (HHLGGAKQAGDV) compete com os peptídeos que possuem a sequência RGD pela ligação à GPIIb-IIIa, como também inibe a ligação da vitronectina, do vWF e da fibronectina à GPIIb-IIIa. Ao examinar-se a interação do fibrinogênio com a GPIIb-IIIa ao microscópio eletrônico (Figura 11), revela-se uma interação específica da porção nodular da GPIIb-IIIa com o domínio distal do fibrinogênio, indicando que a ligação entre a GPIIb-IIIa e o fibrinogênio envolve predominantemente a região carboxiterminal da cadeia γ do fibrinogênio. Ademais, moléculas de fibrinogênio recombinante com a substituição da sequência RGD por RGE, tanto na posição 97 ou 574 da cadeia α , são semelhantes ao fibrinogênio plasmático em ensaios de agregação plaquetária, enquanto que as moléculas de fibrinogênio recombinante com interrupção na região carboxiterminal da cadeia γ , correspondente à sequência HHLGGAKQAGDV, não conseguem agregar plaquetas. Desta forma, a cadeia carboxiterminal da cadeia γ do fibrinogênio contém informações essenciais para a interação com a GPIIb-IIIa (BENNETT, 2001; CALVETE, 1994).

Figura 11 – Micrografias eletrônicas de preparações de fibrinogênio ligado à GPIIb-IIIa. A GPIIb-IIIa consiste de uma cabeça globular e duas caudas flexíveis que se estendem a partir de um lado da cabeça. Notar como a cabeça globular da GPIIb-IIIa interage exclusivamente com o domínio D do fibrinogênio, com suas caudas permanecendo não paralelas e cruzadas entre si com relação ao eixo longitudinal do fibrinogênio. Estas imagens evidenciam que a GPIIb-IIIa se liga principalmente à região carboxiterminal da cadeia γ do fibrinogênio. Fonte: WEISEL *et alii* (1992), modificado.

Apesar das inúmeras evidências de que o fibrinogênio se liga à GPIIb-IIIa exclusivamente via a região carboxiterminal da cadeia γ , muitos estudos demonstram que peptídeos que contêm a sequência RGD inibem consideravelmente a função da GPIIb-IIIa *in vivo*, *ex vivo* e *in vitro*, sugerindo que as regiões do fibrinogênio que possuem esta sequência também interagem direta ou indiretamente com a GPIIb-IIIa. Considera-se geralmente que os peptídeos que possuem a sequência RGD se ligam predominantemente à GPIIIa (Figura 6) e que o dodecapeptídeo da cadeia γ se liga à GPIIb (Figura 7) (BENNETT, 2001). Embora a ligação do fibrinogênio à GPIIb-IIIa seja necessária para a agregação

plaquetária em todas as espécies de mamíferos, há diferenças substanciais na capacidade dos peptídeos que contêm a sequência RGD em inibir este processo. Assim, por exemplo, a ligação do fibrinogênio às plaquetas de coelhos e ratos é relativamente resistente à inibição pelos peptídeos que contêm a sequência RGD, inclusive pelas disintegrinas dos venenos de serpentes (CHEN *et alii*, 1995; COELHO *et alii*, 1999; DENNIS *et alii*, 1989; GAN *et alii*, 1988; HARFENIST *et alii*, 1988; RAND *et alii*, 1999; SHEU & HUANG, 1994; TRIKHA *et alii*, 1994; VERHALLEN & BARTH, 1991). Contudo, estes peptídeos induzem a exposição de LIBS da GPIIIa no coelho, a despeito de não inibirem eficientemente a agregação plaquetária (JENNINGS *et alii*, 1995). Em um estudo bastante elegante, BASANI *et alii* (2001) demonstraram que o peptídeo RGDS também se liga à GPIIb-IIIa de rato, porém não é capaz de promover mudanças alostéricas subsequentes na GPIIb-IIIa que impeçam a ligação do fibrinogênio às plaquetas desta espécie.

Para que as plaquetas expressem em sua superfície a GPIIb-IIIa em uma conformação estrutural que as capacite de ligar-se ao fibrinogênio e de agregar, as plaquetas devem ser ativadas. Como descrito anteriormente, o processo de ativação plaquetária se inicia quando as plaquetas aderem à superfície exposta do subendotélio em resposta a uma lesão endotelial e tornam-se rapidamente ativadas pela interação com substratos trombogênicos e com diversos agonistas liberados ou gerados localmente.

O colágeno é o componente mais trombogênico da matriz extracelular e liga-se diretamente a receptores plaquetários que medeiam a adesão ativação e agregação plaquetárias. Os principais tipos de colágenos presentes nos vasos sangüíneos – tipos I, III e VI – evocam uma resposta plaquetária por meio de receptores distintos, incluindo a GPIa-IIa (integrina $\alpha_2\beta_1$), a GPVI e possivelmente outros receptores, tais como a glicoproteína IV, a p65 e a p85/90. Os mecanismos adesivos plaquetários são altamente dependentes da força de cisalhamento. Sob condições de baixa força de cisalhamento, a adesão plaquetária e o desenvolvimento dos trombos são independentes da GPIb-IX-V e envolvem outros receptores, como a GPIa-IIa, a GPVI e a GPIIb-IIIa. Contudo, sob condições de altas forças de cisalhamento, como descrito anteriormente, o colágeno ligado ao vWF é crucial para a captura inicial e a ancoragem das plaquetas ao tampão hemostático que cresce. Este processo é mediado pela ligação rápida e reversível da GPIb ao domínio A1 do vWF (BERNDT *et alii*, 2001; SAVAGE *et alii*, 2001). Há muitas similaridades na sinalização intracelular promovida pelo colágeno e pelo receptor de baixa afinidade para a IgG, o Fc γ RIIa. Ambos os receptores estimulam uma fosforilação rápida e intensa da tirosina quinase Syk. A família Syk de tirosina quinases – das quais são conhecidos dois membros, a Syk e a Zap-70 – desempenha um papel importante na sinalização intracelular ao interagir com os ITAM (motivos de ativação dos imunorreceptores baseados na tirosina) presentes em uma ou mais cadeias destes receptores. Os ITAM contêm dois resíduos de tirosina, na sequência de aminoácidos

YXXLX₆₋₁₂YXXI, fosforilados após a ativação celular, que se ligam aos domínios SH2 da Syk e da Zap-70. Nas plaquetas estimuladas pelo colágeno, a cadeia γ do receptor Fc (cadeia- γ -FcR) e a Syk são essenciais para a agregação e secreção plaquetárias induzidas por este agonista (WATSON, 1999).

Semelhantemente ao colágeno, a convulxina, uma toxina isolada do veneno da cascavel sul-americana *Crotalus durissus terrificus*, é um potente agonista plaquetário que se liga especificamente à GPVI. No caso da ativação plaquetária induzida pela convulxina, os ITAM da cadeia- γ -FcR são inicialmente fosforilados pelas quinases Src, a Lyn e a Fyn, levando ao recrutamento e ativação da Syk. A ativação da Syk, por sua vez, induz a fosforilação da PLC γ 2, que assim hidrolisa o 4,5-bisfosfato de fosfatidilinositol (PIP₂) em 1,4,5-trisfosfato de inositol (IP₃), que contribui para a mobilização e o aumento da concentração do Ca⁺² intracelular, e *sn*-1,2 diacilglicerol (DAG), que ativa a proteína quinase C (PKC) (Figura 12). A mobilização do Ca⁺² provém tanto da liberação, dependente de IP₃, dos estoques de cálcio existentes no sistema de canais densos plaquetários, como do influxo de cálcio do meio extracelular. O aumento da Ca⁺² intracelular regula muitos eventos que conduzem à agregação plaquetária, incluindo a ativação da fosfolipase A₂ (PLA₂) citoplasmática, que hidrolisa os fosfolípidios de membrana, produzindo ácido araquidônico para a síntese de TxA₂. A PLA₂ citoplasmática é regulada tanto pela elevação das concentrações de Ca⁺² citoplasmático como pela fosforilação de seus resíduos de serina. O colágeno, por outro lado, depende da secreção do ADP e da produção de TxA₂ plaquetários para causar a agregação irreversível (ATKINSON *et alii*, 2001); o TxA₂ desempenha um papel de retroalimentação positiva na agregação plaquetária induzida pelo colágeno, ao ligar-se a receptores acoplados à proteína G, que causam a ativação da PLC β 2/3 (Figura 12). (WATSON, 1999; WATSON *et alii*, 2001).

Ao utilizar a jararragina, uma metaloproteinase presente no veneno da serpente *B. jararaca*, observou-se em uma série de investigações a contribuição da GPIa-IIa na agregação plaquetária induzida pelo colágeno. A jararragina cliva a GPIa, inativando a GPIa-IIa. A jararragina inibe a ativação plaquetária e a fosforilação de tirosinas de muitas proteínas, inclusive da Syk, quando as plaquetas são estimuladas por baixas concentrações de colágeno. Contudo, quando as plaquetas são estimuladas por concentrações maiores de colágeno, o efeito inibitório da jararragina desaparece, evidenciando que a GPIa-IIa não é essencial para a sinalização intracelular induzida pelo colágeno (HERS *et alii*, 2000; KAMIGUTI *et alii*, 1996b, 1997a).

A trombina é talvez o agonista plaquetário mais potente e induz sinalização intracelular, pelo menos em parte, pelos receptores ativados por proteases (PAR) ligados a proteínas G. Estes receptores convertem um evento de clivagem proteolítica extracelular em um sinal transmembrânico. A trombina se liga ao PAR1 e cliva o seu exodomínio aminoterminal na posição da Arg₄₁, liberando um peptídeo e expondo um ligante oculto deste receptor, que é capaz de auto-ativar este receptor (COUGHLIN, 2001).

Uma vez que os anticorpos antiPAR1 inibem a ativação plaquetária apenas por baixas concentrações de trombina, possivelmente há o envolvimento de outros receptores para a trombina. De fato, também já se demonstrou que peptídeos com sequência idêntica ao ligante oculto do PAR1 humano não são capazes de ativar plaquetas de coelhos, ratos, hamsters e cães (CONNOLLY *et alii*, 1994; COOK *et alii*, 1993; DERIAN *et alii*, 1995; KINLOUGH-RATHBONE *et alii*, 1993). A trombina apresenta outros receptores – como o PAR3, o PAR4 e a GPIb-IX-V – na superfície plaquetária, porém a importância e a contribuição individual dos mesmos para a ativação plaquetária destas espécies animais ainda aguarda estudos mais detalhados. Aparentemente, a interação cooperativa entre os receptores plaquetários para a trombina representa um importante mecanismo de ativação plaquetária. Por exemplo, a trombina cliva a GPV e se liga à GPIb, eventos paralelos e necessários à ativação plaquetária por este agonista (BERNDT *et alii*, 2001; SAVAGE *et alii*, 2001).

Os receptores ativados acoplados às proteínas G causam a ativação plaquetária ao induzirem a permuta do GDP ligado ao complexo heterotrimérico da proteína G inativa pelo GTP do complexo ativo. Como evidenciado supra, o PAR medeia uma resposta plaquetária por meio da proteína G_q , que causa a ativação da PLC β 2/3 e a hidrólise do PIP $_2$ (Figura 12). Este mecanismo de geração de IP $_3$ e DAG inicia uma série de eventos que causam a ativação plaquetária. Em seguida, há a fosforilação de substratos plaquetários específicos, tais como resíduos de serina e treonina da cadeia leve da miosina. Este evento é mediado pela quinase da cadeia leve da miosina, dependente da calmodulina, que regula a interação entre a actina e a miosina (BRASS, 1999; SAVAGE *et alii*, 2001).

Quanto à sinalização induzida pela GPIb-IX-V, na presença de vWF e botrocetina (ou ristocetina), ela é aparentemente mediada pelo Fc γ RIIa, que, como a cadeia- γ -FcR, induz um aumento do Ca $^{+2}$ citoplasmático e a ativação da PKC (Figura 12). Contudo, esta ativação é branda, com uma fosforilação deficiente das proteínas plaquetárias (ASAZUMA *et alii*, 1997; BERNDT *et alii*, 2001; OZAKI *et alii*, 1995).

O 5'-difosfato de adenosina (ADP), o primeiro agonista plaquetário a ser descrito, é um agonista brando e, nas plaquetas humanas, induz apenas mudança de forma e agregação reversível em meios com concentração fisiológica de cálcio. Apesar de ser um agonista brando, o ADP tem um papel fundamental na função plaquetária, pois, ao ser secretado pelos corpos densos, amplifica a resposta plaquetária induzida por outros agonistas plaquetários. O ADP interage com dois receptores P2 específicos nas plaquetas humanas. A transdução do sinal envolve tanto um aumento transitório da Ca $^{+2}$ intracelular, mediado pelo receptor P2Y $_1$ acoplado à proteína G_q , como a inibição da adenilato ciclase, mediada pelo receptor P2Y $_{12}$ acoplado à proteína G_i . É mister observar que embora a inibição da adenilato ciclase seja um evento importante da ativação pelo ADP, não há uma relação entre esta inibição e a agregação plaquetária. A ativação concomitante das vias da G_q e da G_i é necessária para

promover uma agregação plaquetária normal (Figura 12). As plaquetas humanas expressam pelo menos três receptores distintos que são estimulados pelos nucleotídeos da adenosina: o $P2Y_1$, o $P2Y_{12}$ e o $P2X_1$ (Figura 12) (GACHET, 2001; SAVAGE *et alii*, 2001).

O receptor plaquetário da serotonina ($5-HT_2$) também está envolvido com a transdução de sinais por meio de proteínas G (DE COURCELLES *et alii*, 1985).

Figura 12 – Eventos iniciais na ativação plaquetária. A ativação dos receptores $P2Y_1$, $PAR1$, $PAR3$, $PAR4$, de TxA_2 e de serotonina causa diretamente a ativação da proteína G_q , que por sua vez ativa a $PLC\beta2/3$. A ativação da proteína G_i inibe a adenilato ciclase e, conseqüentemente, a geração de cAMP, que indiretamente favorece a ativação da $PLC\beta2/3$. O aumento dos níveis intracelulares de cAMP, como aquele induzido pelo receptor de PGI_2 acoplado à proteína G_s , inibe a ativação plaquetária. A ativação da $GPVI$, pelo colágeno ou convulxina, causa a fosforilação dos resíduos de tirosina da cadeia γ do receptor de Fc ($Fc\gamma$) pelas tirosinaquinases Lyn e Fyn e o recrutamento da Syk. A ativação da Syk regula a função da $PLC\gamma2$. Aparentemente, a ativação do complexo $GPIb-IX-V$ pelo vWF ligado à botrocetina promove a ativação da Syk, por meio da fosforilação do $Fc\gamma RIIA$, porém ainda não se tem certeza de quais proteínas estão envolvidas neste mecanismo de ativação plaquetária. Da mesma forma, a trombina se liga ao complexo $GPIb-IX-V$, porém os mecanismos intracelulares pelos quais ocorre ativação plaquetária ainda não foram adequadamente estudados. A $PLC\beta2/3$ e a $PLC\gamma2$ estão envolvidas na produção de DAG e IP_3 , a partir da hidrólise do PIP_2 . O DAG regula a ativação da proteína quinase C e o IP_3 promove a liberação de Ca^{+2} dos depósitos do sistema tubular denso para o citoplasma. Conquanto a ativação do $P2X_1$ pelo ATP cause um influxo de Ca^{+2} a partir do meio extracelular, o papel fisiológico deste influxo ainda não está claro na ativação plaquetária. C: extremidade carboxiterminal; N: extremidade aminoterminal (BERNDT *et alii*, 2001; BRASS *et alii*, 1997; GACHET, 2001; SAVAGE *et alii*, 2001; WATSON *et alii*, 2001).

A secreção plaquetária é iniciada quando os receptores da membrana plasmática são ativados por agonistas e, pela mudança estrutural das proteínas G acopladas a estes receptores, a PLC é ativada e o IP_3 e o DAG são gerados. Em resposta a agonistas fortes, como a trombina, a secreção se inicia após um intervalo de aproximadamente 1,5 segundos e se completa em 5 segundos. A proteína quinase C (PKC) desempenha um papel crucial na indução da secreção, porquanto inibidores da PKC impedem a secreção de corpos densos. As plaquetas possuem diversas isoformas da proteína quinase C (α , β_1 , β_{11} , δ , ζ , η , θ), muitas das quais são ativadas pelo DAG e Ca^{+2} . Após a ativação plaquetária pela trombina, a proteína quinase C fosforila em segundos a plequistrina e muitos outros substratos, com uma cinética paralela à cinética de secreção e agregação plaquetárias (REED *et alii*, 2000).

A ativação plaquetária causa também modificações dramáticas do citoesqueleto plaquetário, importantes para a mudança de forma, adesão, agregação e secreção plaquetárias. Estas mudanças do citoesqueleto estão intrinsecamente ligadas ao processo de ativação celular e parecem ter um papel importante no movimento dos grânulos e na exocitose (REED *et alii*, 2000). Quando ocorre a exocitose plaquetária, os grânulos se fundem com a membrana citoplasmática ou com o sistema de canais abertos para secretarem seu conteúdo no meio extracelular. Durante o processo de coalescência dos grânulos de secreção com a membrana plaquetária, diversas glicoproteínas que estão presentes exclusivamente na membrana interna destes grânulos se tornam expressas na superfície plaquetária. Dentre estas glicoproteínas, pode-se destacar a P-selectina (grânulos α), o CD63 (lisossomos), LAMP-1 (lisossomos) e o CD154 (HENN *et alii*, 1998; MICHELSON & FURMAN, 1999; SCHMITZ *et alii*, 1998).

A P-selectina (também conhecida como CD62P, GMP-140 e PADGEM) é uma glicoproteína que existe exclusivamente dentro dos grânulos α das plaquetas quiescentes e em células endoteliais não estimuladas. O seu domínio extracelular (aminoterminal) se volta para o lúmen dos grânulos α e sua porção carboxiterminal para o citoplasma plaquetário. A P-selectina humana é composta por um domínio de lectina, um domínio de fator de crescimento epidérmico, 9 domínios repetidos de ligação ao complemento, um domínio transmembrânico e um citoplasmático (Figura 13) (FURIE *et alii*, 2001). No coelho, uma estrutura primária semelhante à P-selectina humana é observada, porém o número de domínios repetidos de ligação ao complemento é de apenas 6. A homologia entre a P-selectina humana e a de coelho é de 59%. Nas demais espécies analisadas na Figura 13, o camundongo, o rato e o suíno também apresentam uma diminuição do número de domínios de ligação ao complemento.

Durante a ativação plaquetária, a P-selectina sofre fosforilação dos resíduos de serina, tirosina, histidina e treonina do seu domínio citoplasmático. Contudo, esta fosforilação não é necessária para a exocitose dos grânulos α , porquanto camundongos deficientes em P-selectina não demonstram qualquer impedimento da secreção dos grânulos α (FURIE *et alii*, 2001).

1. Peptídeo sinalizador

COE -41 MASCPKAI WN WRFQRAVFRT VQLLCFSVLI FEVI NQKEVS A
 HUM -41 MANQOI AI LY QRFRQVVFGL SQLLCFSALI SELTNQKEVA A
 CAM -41 MAGCPKGSWT PRLRSVI LGG AQLI WFSALI SELVNQKEVA A
 RAT -41 MAGCPKGSWK PRLRSVVLGA AQLI WLSALI SELVNRKKVA T
 SUI -41 MASCLKAI CN WRFQRAVFRT VQLLFFNALI SDLMNQKGVA A

2. Domínio extracelular

Lectina
 COE 1 WTYHYSNKTY SWNYSRAFCQ KYYTDLVAI Q NKNEI DYLN E TI PYNYSYWW I GI RKDQOI N GTWVG-NKNLT EEAENWADNE PNNKRNQDC VEI YI KSLSA
 HUM 1 WTYHYSTKAY SWNI SRKYCO NRYTDLVAI Q NKNEI DYLNK VLPYSSSYWW I GI RK-NKLT WTWVGTKKALT NEAENWADNE PNNKRNEDC VEI YI KSPSA
 CAM 1 WTYNYSTKAY SWNNSRVFCR RHFTDLVAI Q NKNEI AHLND VI PPFNSYWW I GI RKI NNNK- WTWVGTKKALT EEAENWADNE PNNKRNQDC VEI YI KSNSA
 RAT 1 WTYNYSTKAY SWNNSRAFCQ RHFTDLVAI Q NKNEI AHLND VI PPFNSYWW I GI RKI NNNK- WTWVGTKKALT EEAENWADNE PNNKRNQDC VEI YI KSNSA
 SUI 1 WTYNYSTAY SWNTSRVFCQ RYFTDLVAI Q NKKEI AYLN D VI PPFNSYWW I GMRKI NNNK- WTWVGTKKALT EEAENWADNE PNNESNNQDC VEMI YI KSPLA

EGF
 COE 101 PGKWNDEPCW KRKRALCYRA SCQDMSCSKQ GECI ETI GNY TCSCYPGFY G PECEYVREWA SLDLPQHVMH NCSHPLGNFS FNSHCSFHCA DGYALNGPSE
 HUM 101 PGKWNDEHCL KKKHALCYTA SCQDMSCSKQ GECLETI GNY TCSCYPGFY G PECEYVRECG ELELPQHVMH NCSHPLGNFS FNSQCSFHCT DGYQVNGPSK
 CAM 101 PGKWNDEPCF KRKRALCYTA SCQDMSCSNQ GECI ETI GSY TCSCYPGFY G PECEYVKECG KVN I PQHVLN NCSHPLGEFS FNSQCTFSCA EGYELDGPGE
 RAT 101 PGKWNDEPCF KRKRALCYTA SCQDMSCSNQ GERI ETI GSY TCSCYPGFY G PECEYVQECG KFDI PQHVLN NCSHPLGDFS FSSQCTFSCP EGYDLNGPSE
 SUI 101 PGKWNDEPCV KRKRALCYTA SCQSTSCSKQ GECTETI GNY TCSCYSGFY G PRCEYVKECG EFKLPQYVLT NCSHPLGNFS FNSQCSFHCA EGYTLNGPSE

CR2
 COE 201 LECLASGI WT NSPPQCAVQ CPALKSPEQG SMSCVQSAEA FQHQSSCSFS CEEGFELVGP EVVHCTALGV WTAPTPVCKA LQ-----
 HUM 201 LECLASGI WT NKPPQCLAAQ CPPLKI PERG NMI CLHSAKA FQHQSSCSFS CEEGFALVGP EVVOCTASGV WTAPAPVCKA VQCQHLEAPS EGTMDCVHPL
 CAM 201 LQCLASGI WT NNPPK----- VQCSLEAPP HGTMACMHI
 RAT 201 MQCLASGI WT NNPPQ----- VQCSLEAPL HGTMDCTHPL
 SUI 201 LECLASGNWT HPPQCAVQ CPALKSPEKG NMACLHSEKA FQYQSSCNFS CEEGYALVGP EVVQCOASGM WTAPVPVCKA I T-----

CR4
 COE 283 ----- CQDLPT STKARVNCSH PFQDFRYQSI WSFHVVHCD E GSFLVGASVL QCLDTGNWDA
 HUM 301 TAFAYGSSCK FECOPGYVR GDLMLRCI DS GHWSAPLPTC EAI SCEPLES PVHGSMDSCP SLRAFOYDTN CSFR---CAE GFMLRGADIV RCDNLGQWTA
 CAM 239 AAFAYDSSCK FECOPGYR GSNLTHCTGS GQWSEPLPTC EAI ACEPEPEI PI HGSMDCVP STGTFGYNSS CTFL---CAE GFVLKGNDAI QCADSGQWTA
 RAT 239 AAFAYDSSCK FECOPGYR GSDI LHCTDS GQWSEPLPTC EAI ACEPLES STGAFGYNSS CTFR---CTE GFVLMGNDAI HCADLGQWTA
 SUI 283 ----- CEPLES PVRGSMDCFP SSRAFQYNTS CSFR---CAK GFTLRGADTV RCSNLGQWTA

CR5
 COE 339 PF----- PECOAV TCAALPNPNQ GEKTCVQPLG GSSYESTCWF
 HUM 398 PAPVCQALQC QDLVPVNEAR VNCSPHFGAF RYQSVCSFTC NEGLLLVGAS VLQCLATGNW NSVPPECAI PCTPLLSQPN GTMTCVQPLG SSSYKSTCQF
 CAM 336 PAPFCEALQC PEFPVPKSAQ VNCSDPFGTL TYQSVCSFSC DEGSLLVGAS VI RCLATGHW NGAPPECAV SCAPMLSPEN GSMTCVQPLG NSTYKSTCQF
 RAT 336 PAPVCEALQC QEFPPVSKAQ VSCSDPFGPL KYQACSFSC DEGSLLVGAS VI RCLATGHW SEAPPECAV SCTPLLSQPN GTMTCI QPLG HSNYKSTCQF
 SUI 336 PAPVCQALQC QDLPAPEKAQ VNCSPHFGAF RYQSTCSFTC DEGSLLVGAS VLQCLETGNW SAPAPECQGI S-----

CR7
 COE 377 TCHGEFPLSG PERLDCTPSG HWTGSPPTCE EVD----- TVSAPAP
 HUM 498 I CDEGYSLSG PERLDCTRSR RWTDSPPMCE AI KCPELFAP EQGSLDCSDT RGEFNVGSTC HFSCNNGFKL EGPNNVECTT SGRWSATPPT CKGI ASLPTP
 CAM 436 MCDEGFYLSG PERLDCTPSG HWTGTPTTCE AI KCPGI FAP EQGNLDCSHV HGEFGVGSIC HFSCNEDFEL LGSNNVECTV SGRWSAPPPT CKGI TSLPAP
 RAT 436 MCDEGFYLSG PERLDCTPSG HWTGSPMCE AI KCPEI FAP EQGSLDCSHV HGEFVSGSTC HFSCNEEFEL LGSNNVECTV SGRWSAPPPT CKGVTSLPVP
 SUI 407 -----

CR8
 COE 417 GVQCPTLIAP KEGTMSQHH VRNFGNLNTTC HFGCKAGFTL LGDSALQCRP SROWTAAPT CRAVKCAKLP VTEPI VMNCS NPWGNFSYGS TCSFHCPEGQ
 HUM 598 GLQCPALTTT GQGTMYCRHH PGTFGFNTTC YFGCNAGFTL I GDSTLSCR P SGQWTAVTPA CRAVKCSLH VNKPI AMNCS NLWGNFSYGS ICSGHCLGQ
 CAM 536 AVRCPALTTT GQGTMSQHH LGSFGPNTTC YFGCKTGFTL RGANSRCRA SGQWTAVTPM CRAVKCSLH MDTAVAMNCS NPWGNFSYGS TCTFCPEGQ
 RAT 536 SVRCPALTTT GQGTMSQHH LESFGPNTTC YFGCKTGFTL RGANSRLCGA SGQWTAVTPV CRAVKCSLH MDTAVAMNCS NPWGNFSYGS TCAFHCPGQ
 SUI 414 EVRCPALI TP EQGTMHQHH LGTFGLNTTC YFRCKTGFTI MGNNALCRS SGQWTAVAPV CRAVKCYELH I TGPI VMNCS NPWGSFSYGS TCSFHCPEGQ

COE 517 LLNGSERTVC QENVQWSTTM PTCQAGPLTI QET
 HUM 698 LLNGSAQTAC QENGHWSTTV PTCQAGPLTI QEA
 CAM 636 SLNGSVRATC REDGHWSDAM PTCQAGTLTI QEA
 RAT 636 SLNGSARTTC GEDGHWSDAM PTCQAGTLTI QEA
 SUI 514 LLNGSELTVC KENGWSTTM PTCLAGPLTI QEA

3. Domínio transmembrânico

COE 550 LTYVGGAAG TTGLVTGSI L LALL
 HUM 731 LTYFGGAVAS TI GLI MGGTL LALL
 CAM 669 LTYLGGAVAS TTGLAVGGTL LALL
 RAT 669 LTYLGGALAS TSGLAVGGTL LALL
 SUI 547 LTYFGGAVAS TTGLVMGGTL LALL

4. Domínio citoplasmático

COE 574 RRRRCRQKDDG KSPLNPQSHL GTYGVFTNAA FDPSP
 HUM 755 RKRFRQKDDG KCPLNPQSHL GTYGVFTNAA FDPSP
 CAM 693 RKRLRKKDDG KCPLNPQSHL GTYGVFTNAA YDPTP
 RAT 693 RKRLRKKDDG KCPLNPQSHL GTYGVFTNAA YDPTP
 SUI 571 RKRRCRQKDDG KSPLNPQSHL GTYGVFTNAA FDPNP

Figura 13 – Homologia de aminoácidos entre a P-selectina de coelho (COE, VORA *et alii*, 1995) e de outras espécies. HUM – homem (JOHNSTON *et alii*, 1989); CAM – camundongo (WELLER *et alii*, 1992); RAT – rato (AUCHAMPACH *et alii*, 1994); SUI – suíno (STOCKER *et alii*, 2000). Os resíduos de aminoácidos hidrofóbicos estão representados em azul, os ácidos em vermelho e os básicos em verde. O traço (-) indica ausência de um resíduo de aminoácido. A tarja representa sítios de glicosilação e a tarja o resíduo N-terminal da proteína madura. EGF: domínio de fator de crescimento epidérmico; CR: domínio de ligação ao complemento.

A expressão da P-selectina na superfície celular, tanto das células endoteliais como das plaquetas, intermedeia a adesão de monócitos e neutrófilos, por meio do ligante PSGL-1 expresso na superfície destes leucócitos. O PSGL-1 está envolvido diretamente com o rolamento dos leucócitos sobre a superfície da célula endotelial. Além desta função de adesão celular, a P-selectina ligada ao PSGL-1 induz a geração de mensageiros intracelulares em leucócitos, o que causa o aumento da expressão do fator tissular na superfície de monócitos e, portanto, um aumento do seu potencial trombogênico (BERGER *et alii*, 1998; FURIE *et alii*, 2001; MCEVER, 2001).

A resposta da coagulação à lesão vascular é iniciada pela associação do fator tissular – expresso na superfície de células subendoteliais, células endoteliais ativadas e monócitos – com a serinoprotease fator VIIa. Após a aderência e a ativação plaquetárias no local de lesão vascular, as plaquetas regulam a atividade catalítica dos fatores da coagulação e a restringem a este local. O complexo fator VIIa-fator tissular ativa o fator IX em fator IXa e o fator X em fator Xa. As plaquetas ativadas promovem a montagem e o funcionamento de dois complexos enzimáticos homólogos e sequenciais, a Xase e protrombinase, cujas atividades promovem, respectivamente, a ativação do fator X em Xa e da protrombina em trombina. A fim de que funcionem adequadamente, ambos os complexos dependem da presença de Ca^{+2} e da formação de um complexo entre os cofatores VIIIa e fator Va com as serinoproteases fator IXa e Xa, respectivamente. A geração de trombina a partir da hidrólise da protrombina pelo complexo protrombinase na superfície das plaquetas ativadas amplifica novamente a resposta da coagulação, porquanto a trombina ativa o fator V em fator Va, o fator VIII em fator VIIIa e o fator XI em XIa. Ademais, a trombina ativa outras plaquetas, promovendo, assim, o crescimento do tampão plaquetário. A resposta da coagulação também é propagada pela formação de fator IXa por meio da ativação proteolítica do fator IX pelo fator XIa ligado às plaquetas. Do mesmo modo, a trombina livre pode se tornar um anticoagulante crucial pela sua ligação à trombomodulina existente na superfície das células endoteliais. O complexo trombina-trombomodulina montado na superfície endotelial catalisa a conversão do zimogênio da proteína C em proteína C ativada, que degrada o fator VIIIa e Va não incorporados ao complexo Xase e protrombinase, respectivamente (BOUCHARD & TRACY, 2001).

As plaquetas ativadas expressam sítios em sua membrana específicos para as proteínas envolvidas na coagulação, como os fatores VIIIa, Xa e Va. No entanto, a protrombina se liga às plaquetas quiescentes por meio da sua sequência RGD à GPIIb-IIIa não ativada, uma interação que parece acelerar a ativação da protrombina catalisada pelo complexo protrombinase. Desta forma, as plaquetas circulam com uma pequena quantidade de protrombina ligada à GPIIb-IIIa, que parece ser importante para os eventos iniciais da geração de trombina e para a formação do tampão hemostático. Após a

ativação plaquetária, o fibrinogênio parece bloquear esta interação, ao deslocar a protrombina e ligar-se à GPIIb-IIIa ativada (BOUCHARD & TRACY, 2001; PLOW *et alii*, 2001).

O fator Xa engendrado em outros locais que não a superfície das plaquetas ativadas não é muito eficiente para a geração de trombina. O fator Xa em fase líquida é altamente susceptível à inibição pela ATIII e pelo inibidor da via do fator tissular (TFPI). O início da cascata de coagulação é altamente dependente da ativação de pequenas quantidades de fator IXa e Xa na proximidade da superfície plaquetária. A ativação inicial do fator X pelo complexo fator tissular-VIIa, que ocorre previamente à ativação plaquetária, é importante para a geração de pequenas quantidades de trombina para a ativação plaquetária e geração de fator IXa. Esta ativação do fator IX desempenha um papel crucial na taxa de formação de trombina, uma vez que ela promove a ativação do fator X na superfície plaquetária, onde ele pode se complexar com o fator Va e formar o complexo protrombinase, que produz altas concentrações de trombina. Realmente, o fator Xa formado pela Xase plaquetária permanece protegido da ação dos inibidores plasmáticos (HOFFMAN *et alii*, 1995). Ademais, o complexo ternário fator tissular-VIIa-Xa é capaz de ativar eficientemente o receptor de trombina PAR-1 existente na superfície plaquetária (RIEWALD & RUF, 2001).

A trombina, uma serinoprotease da família das quimiotripsina, é a principal enzima da cascata da coagulação e um dos agonistas plaquetários mais potentes e, sendo assim, sua ação é primordial para o processo hemostático. A trombina desempenha diversas funções na hemostasia, que podem ser pró-coagulantes ou anticoagulantes. Por meio da hidrólise do fibrinogênio, a trombina é o principal promotor da coagulação. Ademais, ela ativa o fator XIII (que forma ligações covalentes entre as moléculas de fibrina) e, como visto anteriormente, o fator XI, fator V e VIII (necessários para um incremento na geração da própria trombina) (STUBBS & BODE, 1993). Nas plaquetas, a trombina induz mudança de forma, agregação e secreção de grânulos α , corpos densos e lisossomos. Além disso, ela também estimula a síntese e a liberação de TxA_2 e a expressão de atividade pró-coagulante na superfície plaquetária. Nas culturas de células endoteliais, a trombina causa a liberação de vWF, a expressão de P-selectina na membrana plasmática, a mudança de forma e o aumento da permeabilidade vascular, cujo resultado é a transudação de proteínas e a formação de edema. A trombina pode também regular o diâmetro vascular ao induzir uma vasodilatação dependente do endotélio, e na sua ausência, de uma ação vasoconstritora direta sobre as células lisas. Outra ação sobre as células endoteliais é o estímulo para a produção de fator ativador plaquetário (PAF), interleucina 6 e interleucina 8. Nos fibroblastos, a trombina atua como um mitógeno (COUGHLIN, 2001).

A atividade enzimática da trombina está sob o controle de poucos inibidores endógenos, como a α_2 -macroglobulina e os inibidores de serinoproteases (serpinas) (ATIII, cofator II da heparina e a protease nexina I). A ligação das serpinas à trombina é consideravelmente maior na presença de

glicosaminoglicanos (STUBBS & BODE, 1993). A ATIII, uma proteína de 60 kDa, é a principal responsável pela remoção da trombina livre no plasma, assim como do fator Xa. Após a sua ligação à trombina, a ATIII sofre uma clivagem no seu centro reativo, pela qual se forma uma ligação covalente entre as duas proteínas, impedindo-as de se separarem. A ATIII de coelho funciona de forma idêntica à ATIII humana, com uma homologia ao redor de 80% entre as duas espécies (SHEFFIELD *et alii*, 1992).

No processo de conversão do fibrinogênio em fibrina, a trombina cliva a cadeia A α do fibrinogênio, entre os resíduos Arg₁₆ e Gly₁₇, liberando o fibrinopeptídeo A (FPA), e inicia-se a montagem dos monômeros de fibrina pela exposição do sítio EA (Figuras 10 e 14). Este sítio se liga subsequente a uma região de afinidade da cadeia γ (bolso de polimerização, Da) de outra molécula de fibrinogênio e esta associação resulta na formação de fibrilas alinhadas horizontalmente (fibrina I). Há ainda dois outros sítios de auto-associação, o γ_{XL} e o D:D, que participam no processo de montagem da rede de fibrina (Figuras 10 e 14). A associação intermolecular entre dois sítios γ_{XL} promove o alinhamento recíproco entre os resíduos Lys₄₀₆ de uma cadeia e os resíduos Gln₃₉₈ da outra cadeia, onde pode ocorrer a transglutaminação posterior mediada pelo fator XIII ou XIIIa. O mesmo tipo de ligações intermoleculares também ocorre entre os resíduos de lisina e glutamina da cadeia A α ou α do fibrinogênio, porém de uma maneira mais lenta (Figura 14). Os sítios D:D estão situados na porção externa de cada domínio D e são necessários para um alinhamento adequado horizontal (MOSESSON *et alii*, 2001).

Figura 14 – Esquema da montagem de moléculas de fibrina, evidenciando os arranjos de ligações intermoleculares. GPR: sequência aminoterminal do sítio EA. Fonte: MOSESSON *et alii* (2001), modificado.

A liberação do fibrinopeptídeo B (FPB) ocorre mais lentamente que a liberação do fibrinopeptídeo A e expõe um sítio de polimerização independente, EB, que interage com os sítios complementares Db (Figura 10). A molécula de fibrina que sofreu proteólise limitada pela trombina e perdeu os fibrinopeptídeos A e B é denominada monômero de fibrina II. A interação EB:Db não é estritamente necessária para a associação lateral das protofibrilas, porém contribui para este processo ao promover interações cooperativas que resultam do alinhamento dos domínios D. Além de mediar a montagem da rede de fibrina, o domínio EB também se liga à heparina e participa do espreadimento plaquetário e de células endoteliais (Figura 10) (MOSESSON *et alii*, 2001).

À medida que há a formação da rede de fibrina, inicia-se o processo de ativação da fibrinólise para controlar o crescimento da mesma. A enzima envolvida diretamente com a lise do coágulo é a plasmina, oriunda da ativação do plasminogênio. A ativação do plasminogênio mediada pelo ativador de plasminogênio do tipo tissular (tPA) é intensamente acelerada na presença de fibrina, porém em menor escala pelo fibrinogênio. Este evento estimulador não é ocasionado somente pela presença de polímeros de fibrina, mas também por fibrilas de fibrinogênio ligadas pelo fator XIIIa. A ativação do plasminogênio ocorre por meio da ativação pelo tPA ligado à fibrina, particularmente aos sítios existentes nas seqüências A α 148-160 e γ 312-324. Estas seqüências estão ocultas no fibrinogênio, mas tornam-se expostas como consequência das interações não covalentes entre os domínios D e E das moléculas de fibrina. Há apenas um único sítio para a ligação do plasminogênio à fibrina ou ao fibrinogênio, localizado na porção distal do domínio α C (Figura 10). Contudo, a clivagem proteolítica da fibrina pela própria plasmina expõe novos resíduos de lisina, que fomentam a fibrinólise pela ligação de novas moléculas de plasminogênio. O inibidor natural da plasmina, a α_2 -antiplasmina, também se liga covalentemente à fibrina, por meio da ação do fator XIII (MOSESSON *et alii*, 2001).

A digestão proteolítica do fibrinogênio e da fibrina pela plasmina está representada na Figura 15. A fibrina entrecruzada pela ligação do fator XIIIa é degradada mais lentamente pela plasmina. Genericamente, estes fragmentos produzidos pela digestão do fibrinogênio ou das diferentes formas de fibrina pela plasmina são denominados produtos de degradação do fibrinogênio e da fibrina (PDF). Estes produtos são capazes tanto de inibir a polimerização da fibrina (FRANCIS & MARDER, 1987), como de inibir a agregação plaquetária (KOWALSKI *et alii*, 1964; NIEWIAROWSKI *et alii*, 1977a; PASQUA & PIZZO, 1983).

Figura 15 – Esquema representativo da fibrinólise. **Painel A:** sob a ação da trombina, o fibrinogênio perde os peptídeos A e B e é convertido em monômero de fibrina II. **Painel D:** representa a interação intermolecular entre os domínios αC das moléculas de fibrina II, que promovem a agregação lateral das mesmas em fibras mais grossas. **Painéis B e C:** representam a geração dos produtos de degradação do fibrinogênio e fibrina, respectivamente. As setas menores nos painéis A e D indicam os pontos de clivagem entre as regiões D e E do fibrinogênio ou fibrina pela plasmina. Fonte: MEDVED *et alii* (2001).

Grande parte dos venenos ofídicos possui inúmeros compostos que interferem na hemostasia. Pelas serpentes, estes componentes são utilizados para provocar a morte rápida de suas presas naturais capturadas (SANTORO & SANO-MARTINS, 1993). Pelo homem, eles são utilizados como ferramentas e reagentes para o estudo da hemostasia.

Os venenos das serpentes do gênero *Bothrops* possuem em sua composição uma gama bastante diversa e complexa de componentes que atuam sobre o sistema hemostático e, outrossim, os mecanismos fisiopatológicos pelos quais estes venenos causam distúrbios hemostáticos são também variados e complexos.

Os componentes que alteram a hemostasia podem ser categorizados segundo as suas atividades. Dessarte, há aquelas toxinas que atuam sobre a coagulação, as quais podem ser classificadas em dois grandes grupos, a das toxinas coagulantes e das anticoagulantes. Há também as toxinas que atuam diretamente sobre as plaquetas, sendo também classificadas inicialmente em pró-agregantes e antiagregantes plaquetárias. Finalmente, há aquelas que causam lesão vascular, as quais recebem a denominação de fatores hemorrágicos ou hemorraginas. Muitas vezes, uma mesma toxina pode apresentar mais de uma atividade sobre a hemostasia.

Os venenos que possuem a capacidade de ativar os fatores da coagulação sanguínea e de formar um coágulo visível *in vitro* são tidos como coagulantes. Genericamente, as toxinas coagulantes podem ser classificadas em ativadores do tipo pró-coagulante e ativadores do tipo trombina-símile. Entende-se como ativadores do tipo pró-coagulante, os componentes do veneno que ativam o fator X ou o fator II (protrombina) da cascata de coagulação, engendrando a trombina, que por sua vez hidrolisa o fibrinogênio em fibrina. Os ativadores do tipo trombina-símile são aqueles, no entanto, que hidrolisam diretamente o fibrinogênio em fibrina, sem a necessidade de geração de trombina.

A trombina e os componentes trombina-símeis dos venenos botrópicos apresentam algumas diferenças: a heparina não é capaz de inibir o componente trombina-símile do veneno (VAZ & MARTIRANI, 1948); o coágulo formado pela ação *in vitro* do veneno de *B. atrox* é solúvel em uma solução de uréia (JÁNSZKY, 1950) e a enzima trombina-símile do veneno de *B. jararaca* somente cliva o fibrinopeptídeo A do fibrinogênio, embora a trombina hidrolise os fibrinopeptídeos A e B (BLOMBÄCK, 1958; BLOMBÄCK *et alii*, 1957). Quer a trombina, quer a enzima trombina-símile do veneno de *B. jararaca*, são capazes de hidrolisar ésteres sintéticos que contenham o aminoácido arginina na posição de clivagem, mas não a lisina (BLOMBÄCK *et alii*, 1957; BLOMBÄCK & YAMASHINA, 1958). Não obstante, a atividade trombina-símile não está relacionada à atividade proteolítica do veneno (HENRIQUES *et alii*, 1959, 1960). Até esta data, as enzimas trombina-símeis purificadas dos venenos botrópicos são serinoproteases ácidas, glicosiladas e que possuem massa molecular entre 30 e 60 kDa (ANDRIO-ESCARSO *et alii*, 1997; CAVINATO *et alii*, 1998; HOLLEMAN & WEISS, 1976; LOCHNIT & GEYER, 1995; NISHIDA *et alii*, 1994; SELISTRE & GIGLIO, 1987; SERRANO *et alii*, 1998, 2000; SMOLKA *et alii*, 1998; STOCKER & BARLOW, 1976; ZAGANELLI *et alii*, 1996). Com exceção da enzima purificada do veneno de *B. insularis*, nenhuma outra enzima trombina-símile é inibida pela heparina (SELISTRE & GIGLIO, 1987). Algumas enzimas trombina-símeis purificadas dos venenos de *B. jararaca* e *B. jararacussu* também liberam bradicinina (SERRANO *et alii*, 1998; ZAGANELLI *et alii*, 1996). Diferentemente das demais enzimas trombina-símeis purificadas do veneno da *B. jararaca*, a botrombina induz fraca agregação plaquetária (NISHIDA *et alii*, 1994).

Além da atividade trombina-símile, o veneno botrópico possui ativadores de fator X e II. A atividade destes três tipos de enzimas pôde ser diferenciada inicialmente pela propriedade da heparina em inibir a trombina gerada pelos ativadores de fator X e II (NAHAS *et alii*, 1964, 1975). Posteriormente, estas classes de enzimas foram caracterizadas ao utilizar-se plasmas deficientes em fatores de coagulação (NAHAS *et alii*, 1979). O veneno de *B. atrox* possui duas isoformas de um ativador de fator X, ambas dependentes de cálcio e formadas pela união de duas cadeias polipeptídicas (65 kDa e 14-15 kDa) (HOFMANN & BON, 1987b; HOFMANN *et alii*, 1983). Os ativadores de fator X dos venenos de *B. erythromelas* e *B. jararaca* foram purificados parcialmente e mostraram que suas

atividades são também dependentes de cálcio (DENSON & ROUSSEAU, 1970; FURUKAWA & HAYASHI, 1977; MARUYAMA *et alii*, 1992a; YAMADA *et alii*, 1997).

Com relação aos ativadores de protrombina, NAHAS *et alii* (1979) observaram que os venenos botrópicos possuíam também ativadores de protrombina, inclusive o veneno de *B. jararaca*. Foram isolados e caracterizados, até o momento, três ativadores de protrombina dos venenos botrópicos. Uma metaloproteinase foi isolada do veneno de *B. atrox*, com massa molecular de 70 kDa (HOFMANN & BON, 1987a), outra metaloproteinase com massa molecular de 60 kDa do veneno de *B. neuwiedi* (GOVERS-RIEMSLAG *et alii*, 1987) e, finalmente, MARUYAMA *et alii* (1992a) purificaram parcialmente uma metaloproteinase ativadora de protrombina do veneno de *B. erythromelas*.

Como mencionado anteriormente, é interessante observar que os venenos de filhotes do gênero *Bothrops*, quando comparados aos venenos de espécimes adultos, apresentam uma maior atividade dos componentes ativadores de fator X e protrombina, porém uma atividade similar quanto aos componentes trombina-símiles (FURTADO *et alii*, 1991; KAMIGUTI *et alii*, 1987; ROSENFELD *et alii*, 1959).

Com relação aos anticoagulantes presentes nos venenos botrópicos, STOCKER *et alii* (1986) mostraram que os venenos de *B. moojeni* e *B. pradoi* possuem componentes ativadores de proteína C. Os venenos botrópicos também possuem inibidores de trombina. A botrojaracina, uma proteína ácida de 27 kDa purificada do veneno de *B. jararaca*, inibe a trombina ao formar com ela um complexo de ligação não covalente. A botrojaracina inibe diversas atividades da trombina, entre elas as coagulantes, as anticoagulantes e agregante plaquetária (AROCAS *et alii*, 1996, 1998; ZINGALI *et alii*, 1993a,b). Diversas isoformas da botrojaracina foram encontradas no veneno de *Bothrops jararaca* (MONTEIRO *et alii*, 1997, 1998) e, inclusive, uma proteína com estrutura semelhante à botrojaracina já foi isolada do veneno de *B. alternatus* (CASTRO *et alii*, 1998). O veneno de *B. taeniata* apresenta propriedades anticoagulantes e parece inibir tanto a ativação do fator X como a atividade coagulante do fator Xa e da trombina (KAMIGUTI *et alii*, 1985; KUCH *et alii*, 1996; NAHAS *et alii*, 1979). A proteína ligante de fator IX/X, isolada do veneno de *B. jararaca*, causa prolongamento do tempo de coagulação; além de inibir esses dois fatores da coagulação, também apresenta sítios de reconhecimento para a proteína S (SEKIYA *et alii*, 1993). Outra proteína descrita com atividade anticoagulante é a bothropstoxina II, uma fosfolipase isolada do veneno de *B. jararacussu* (GUTIÉRREZ *et alii*, 1991).

MARUYAMA *et alii* (1992b,c; 1993) isolaram quatro metaloproteinases com atividade fibrinolítica do veneno de *B. jararaca* (jararafibrases I, II, III e IV). A jararafibrase I, uma proteína de 47 kDa, é capaz de degradar a fibrina e o fibrinogênio (cadeia A α > B β), o colágeno do tipo IV, a gelatina, a fibronectina e a laminina, ao passo que degrada apenas parcialmente o colágeno do tipo I. As jararafibrases II, III e IV têm o mesmo perfil proteolítico em relação aos substratos estudados. Todas

essas enzimas possuem atividade hemorrágica. A ação fibrinolítica da jararafibrase I também é devida à ativação do ativador de plasminogênio do tipo uroquinase de cadeia única (SUGIKI *et alii*, 1998).

Apesar das alterações da coagulação já terem sido documentadas desde a Antigüidade, são bem mais recentes as primeiras investigações da ação dos venenos ofídicos sobre as plaquetas (ALOOF *et alii*, 1962; BOUNAMEAUX, 1959). DAVEY & LÜSCHER (1965a; 1965b; 1967) e MARKWARDT *et alii* (1966) foram os primeiros autores a demonstrar a ação agregante e secretora de aminas e nucleotídeos plaquetários pelos venenos botrópicos (*B. jararaca*, *B. atrox*, *B. alternatus*, *B. cotiara*, *B. insularis*, *B. jararacussu*, e *B. neuwiedi*).

A trombocitina é uma serinoprotease isolada do veneno de *B. atrox*, capaz de induzir a agregação, contração e secreção plaquetárias. É uma glicoproteína de 36 kDa, com baixa atividade trombina-símile (NIEWIAROWSKI *et alii*, 1977b). Sua atividade agregante plaquetária é mais potente em plaquetas suspensas em plasma (PRP) do que em plaquetas lavadas e é inibida pelo D-Phe-Pro-Arg-CH₂Cl, um inibidor sintético da trombina e pelo complexo heparina/ATIII. Contudo, ela não é inibida pela hirudina ou pela α_1 -antitripsina. A agregação plaquetária induzida pela trombocitina é devida basicamente à secreção do ADP plaquetário e não à produção de TxA₂ (KIRBY *et alii*, 1979; KISIEL & CANFIELD, 1981; KUBISZ *et alii*, 1984; NIEWIAROWSKI *et alii*, 1977b, 1979; RAWALA *et alii*, 1978; TENG & KO, 1988). Além da sua ação sobre as plaquetas, a trombocitina também promove a liberação de PGI₂ e óxido nítrico (NO) pelas células endoteliais (CZERVIONKE *et alii*, 1979; GLUSA *et alii*, 1991). Como a trombocitina, a PA-BJ, uma serinoprotease isolada do veneno de *B. jararaca*, é capaz de agregar mais intensamente plaquetas humanas suspensas em plasma do que em tampão fisiológico. Seu mecanismo de ação parece ser homólogo ao da trombina, isto é, mediado pela hidrólise dos receptores PAR1 e PAR4 das plaquetas (SANTOS *et alii*, 2000; SERRANO *et alii*, 1995). É interessante observar que a atividade pró-agregante plaquetária total dos venenos botrópicos é reduzida apenas parcialmente pelos inibidores de serinoproteases, sugerindo que outras famílias de proteinases estão também envolvidas (FRANCISCHETTI *et alii*, 1998).

A botrocetina (previamente denominada de coaglutinina) é indubitavelmente a proteína de veneno de serpente, com ação plaquetária, melhor caracterizada quanto ao seu modo de ação. READ *et alii* (1978) observaram que os venenos de *Bitis arietans* e do gênero *Bothrops* (*B. alternatus*, *B. jararaca*, *B. medusa*, *B. neuwiedi* e *B. atrox*) apresentavam atividade agregante plaquetária dependente do vWF. Assim, o vWF na presença da botrocetina sofreria uma mudança estrutural que lhe permitiria ligar-se à GPIb-IX-V da membrana plaquetária e induzir aglutinação plaquetária (READ *et alii*, 1989; SUGIMOTO *et alii*, 1991). Observou-se, enfim, que a botrocetina não era uma enzima e que sua atividade ocorria quando se utilizavam plaquetas fixadas. Sua atividade não é espécie-específica (diferentemente da

ristocetina), nem depende de íons bivalentes (ANDREWS *et alii*, 1989; BRINKHOUS & READ, 1980; CLEMMONS *et alii*, 1984; JOHNSON & DODDS, 1981; READ *et alii*, 1978, 1983).

A trombolectina é outra lectina agregante plaquetária isolada do veneno de *B. atrox*. Sua atividade é inibida especificamente pela lactose e pelo β -tiodigalactosídeo, como também pelo EDTA e ditiotreitol. As lectinas presentes em venenos, pela sua ligação às GP da membrana plaquetária, provocam um estímulo intracitoplasmático que induz a ativação da GPIIb-IIIa e conseqüente agregação plaquetária (GARTNER & OGILVIE, 1984; GARTNER *et alii*, 1980; OGILVIE *et alii*, 1989; OGILVIE & GARTNER, 1984).

Os venenos botrópicos possuem igualmente inibidores da agregação plaquetária. Deles já foram purificadas as disintegrinas, um grupo de proteínas de baixa massa molecular, que contêm a seqüência Arg-Gly-Asp, ricas em cisteína e inibidoras das integrinas das famílias β_1 e β_3 . Com relação às plaquetas, as disintegrinas inibem a agregação plaquetária induzida por diversos agonistas, porquanto inibem a GPIIb-IIIa (GOULD *et alii*, 1990; HUANG *et alii*, 1987). Diversas disintegrinas purificadas dos venenos botrópicos são capazes de inibir a adesão celular, a agregação plaquetária e a quimiotaxia de neutrófilos (COELHO *et alii*, 1999; RUCINSKI *et alii*, 1990a; SCARBOROUGH *et alii*, 1993). Outras classes de proteínas inibidoras da agregação plaquetária também já foram isoladas do veneno de *B. jararaca*. Entre elas, as PLA₂ que inibem a agregação induzida pelo ADP, colágeno e PAF (SERRANO *et alii*, 1999; ZINGALI *et alii*, 1990). Há ainda proteínas inibidoras da agregação plaquetária, isoladas do veneno de *B. jararaca*, cujas atividades são específicas para a agregação induzida pelo colágeno (KAMIGUTI *et alii*, 1996a,b, 1997a,b; SMITH *et alii*, 1991) e pela botrocetina ou ristocetina (FUJIMURA *et alii*, 1995).

Os venenos botrópicos possuem diversas metaloproteinases (dependentes de Zn^{+2}) com alta atividade hemorrágica (hemorraginas), capazes de causar lesão endotelial e conseqüentemente trombocitopenia (ASSAKURA *et alii*, 1986; MANDELBAUM, 1990; MANDELBAUM & ASSAKURA, 1988; MANDELBAUM *et alii*, 1976, 1984; QUEIROZ *et alii*, 1985). A hemorragina mais bem caracterizada do veneno de *B. jararaca* é a jararragina, capaz de degradar a região carboxiterminal da cadeia A α do fibrinogênio e a porção aminoterminal do vWF e de aumentar a atividade fibrinolítica plasmática (KAMIGUTI *et alii*, 1991b, 1994, 1996a; PAINE *et alii*, 1992; SUGIKI *et alii*, 1995).

Em virtude da grande quantidade de componentes nos venenos botrópicos que alteram a hemostasia, não é motivo de surpresa a alta freqüência com que os sangramentos ocorrem nos envenenamentos causados por estas serpentes. Em função da proximidade dos sangramentos ao local da picada, os distúrbios hemostáticos podem ser distinguidos em locais e sistêmicos.

Quanto aos distúrbios hemostáticos sistêmicos, relata-se amiúde na literatura o aparecimento de gengivorragia, hematúria (macroscópica e microscópica), hematomas, hemorragia por ferimentos de

pele, epistaxe, hemoptise, hematêmese, petéquias, metrorragia e equimose sistêmica. Quanto aos sangramentos locais, os dois principais sinais observados são a equimose e a hemorragia pelos orifícios causados pelas presas da serpente. A frequência e a intensidade dessas alterações hemostáticas variam conforme a casuística, a espécie da serpente *Bothrops* causadora do envenenamento e a gravidade do mesmo (BAUAB *et alii*, 1994; BUCARETCHI *et alii*, 2001; CARDOSO *et alii*, 1993; HAAD, 1981; JORGE *et alii*, 1995; KOUYOUNDJIAN & POLIZELLI, 1988, 1989; MILANI *et alii*, 1997; OTERO *et alii*, 1996; RIBEIRO & JORGE, 1997). Na maior parte dos casos, esses sangramentos cessam após a administração do soro antibotrópico (CARDOSO *et alii*, 1993; OTERO *et alii*, 1996). Contudo, a ocorrência de sangramentos intracranianos pode causar o óbito do paciente (KOUYOUNDJIAN *et alii*, 1991).

Com relação ao quadro laboratorial dos pacientes envenenados com coagulopatia, observa-se geralmente o prolongamento do tempo de coagulação sangüínea (BAUAB *et alii*, 1994; BUCARETCHI *et alii*, 2001; CARDOSO *et alii*, 1993; HAAD, 1981; JORGE *et alii*, 1995; KAMIGUTI & CARDOSO, 1989; KOUYOUNDJIAN *et alii*, 1987; KOUYOUNDJIAN & POLIZELLI, 1988; MILANI *et alii*, 1997; NISHIOKA & SILVEIRA, 1992; OTERO *et alii*, 1996; RIBEIRO & JORGE, 1989, 1990, 1997). A frequência com que ocorre o prolongamento do tempo de coagulação é maior em pacientes picados por serpentes jovens, pois, como explicado anteriormente, a atividade coagulante dos venenos de serpentes *Bothrops* sp. é maior nos filhotes (KOUYOUNDJIAN & POLIZELLI, 1989; MILANI *et alii*, 1997; RIBEIRO & JORGE, 1989, 1990). Além do prolongamento do tempo de coagulação do sangue total, os testes laboratoriais realizados em pacientes picados por serpentes do gênero *Bothrops* indicam um consumo do fibrinogênio e dos fatores X, V e VIII plasmáticos. A razão para o consumo desses fatores parece ser tanto o consumo direto do fibrinogênio pelos componentes trombina-símiles, como a formação de trombina intravascular pelos componentes pró-coagulantes dos venenos botrópicos (DEMPFLE *et alii*, 1990; KAMIGUTI *et alii*, 1986; MARUYAMA *et alii*, 1990; SANO-MARTINS *et alii*, 1995). A comprovação de que há geração de trombina intravascular foi feita pela mensuração dos níveis plasmáticos do complexo trombina-antitrombina, que se apresentam elevados em pacientes envenenados (KAMIGUTI *et alii*, 1991a).

A fibrinólise também está exacerbada nesses acidentes ofídicos. Altas quantidades de PDF, inclusive de dímeros D, são geradas devido à ativação da fibrinólise. Há ainda uma diminuição dos níveis plasmáticos de α_2 -antiplasmina, um inibidor natural e específico da plasmina, indicando que ocorre a produção de plasmina intravascular durante o envenenamento botrópico (DEMPFLE *et alii*, 1990; KAMIGUTI *et alii*, 1986; MARUYAMA *et alii*, 1990; SANTORO, 1993). Os níveis de tPA, PAI-1 e vWF estão elevados em pacientes, dados sugestivos da liberação dessas proteínas pelas células endoteliais durante o envenenamento botrópico (KAMIGUTI *et alii*, 1991a). Contudo, os níveis elevados de trombomodulina circulante em pacientes (KAMIGUTI *et alii*, 1992) também indicam que o veneno total

não somente estimula as células endoteliais a secretarem o seu conteúdo granular, mas que também é capaz de lesá-las.

A trombocitopenia é comum em indivíduos envenenados pela serpente *Bothrops jararaca*, como também em animais utilizados como modelos experimentais (CARDOSO *et alii*, 1993; KAMIGUTI *et alii*, 1986; MARUYAMA *et alii*, 1990; SANO-MARTINS *et alii*, 1995; SANTORO *et alii*, 1994). A administração do soro antibotrópico também restabelece, dentro de 6 horas após a soroterapia, a contagem plaquetária dos pacientes envenenados (CARDOSO *et alii*, 1993). Por outro lado, HAAD (1981) não observou trombocitopenia em pacientes picados por serpentes envenenados por *B. atrox* e *B. bilineatus*. É interessante observar que não há uma correlação direta entre o consumo de fibrinogênio e a trombocitopenia em pacientes envenenados pela *B. jararaca*, mas há uma maior incidência de sangramentos sistêmicos em pacientes que apresentam concomitantemente trombocitopenia e afibrinogenemia (KAMIGUTI *et alii*, 1986, 1991a).

2. Objetivos

Os envenenamentos ofídicos são responsáveis por uma cifra anual de vinte mil acidentes no Brasil (BRASIL, 1998). Noventa por cento desses acidentes são causados pelas serpentes do gênero *Bothrops*, conhecidas popularmente como jararacas. No Estado de São Paulo, 98% dos acidentes ofídicos são causados pela serpente *Bothrops jararaca* (JORGE & RIBEIRO, 1990).

O estudo laboratorial do mecanismo hemostático de pacientes humanos envenenados demonstra um acentuado consumo dos fatores da coagulação – especialmente do fibrinogênio plasmático – que causa o prolongamento do tempo de coagulação sangüínea. Com a formação de grandes quantidades de fibrina solúvel intravascular, a fibrinólise é ativada e a fibrina circulante formada é degradada rapidamente; dessa maneira, há uma elevação drástica dos níveis dos PDF circulantes (MARUYAMA *et alii*, 1990). Os componentes ativadores de fator II e X do veneno são também capazes de engendrar trombina intravascular, uma vez que há a elevação dos níveis do complexo trombina-antitrombina circulantes (KAMIGUTI *et alii*, 1991a; MARUYAMA *et alii*, 1990).

Contudo, em comparação com os estudos da coagulação e fibrinólise, as alterações plaquetárias nesse envenenamento ainda aguardam um estudo mais aprofundado. Em estudos recentes, observamos que o envenenamento pela *Bothrops jararaca* induz trombocitopenia e alteração da função plaquetária, tanto em pacientes humanos como em modelos animais (CARDOSO *et alii*, 1993; KAMIGUTI *et alii*, 1986; SANO-MARTINS *et alii*, 1997; SANTORO, 1993; SANTORO *et alii*, 1994). Todavia, utilizando o coelho como modelo experimental para o estudo dessas alterações hemostáticas, notamos que algumas diferenças importantes ocorriam em relação às respostas observadas em pacientes humanos. A primeira delas era que o consumo do fibrinogênio plasmático induzido por esse veneno no coelho era devido principalmente à ação dos componentes ativadores de fator II e X e no homem à ação do componente trombina-símile (SANTORO & SANO-MARTINS, 1993). Outra diferença foi a intensa e duradoura hipoagregação plaquetária observada no plasma rico em plaquetas (PRP) do coelho e a hipoagregação discreta e efêmera no sangue total de pacientes humanos envenenados (SANO-MARTINS *et alii*, 1997; SANTORO, 1993). Observamos ainda que as plaquetas circulantes de coelhos envenenados apresentavam alterações ultra-estruturais compatíveis com uma ativação plaquetária *in vivo* (dilatação do sistema de canais abertos e número reduzido de corpos densos plaquetários) (SANTORO, 1993; SANTORO *et alii*, 1994). Esse quadro se assemelhava bastante àquele de ativação plaquetária observado em pacientes humanos submetidos à circulação extracorpórea (PARETI *et alii*, 1976, 1980; VAN OOST *et alii*, 1983, 1984; VIVIC & WEISS, 1983).

Apesar da grande incidência de distúrbios hemorrágicos em pacientes picados por serpentes do gênero *Bothrops*, a causa do surgimento de sangramentos nesses pacientes ainda é discutível. Certamente, a presença de incoagulabilidade sangüínea não determina necessariamente o aparecimento

de sangramentos. As plaquetas, por participarem em diversas etapas do processo hemostático, parecem ter uma contribuição decisiva no surgimento de sangramentos, visto que os sangramentos sistêmicos estão mais diretamente relacionados à presença de trombocitopenia do que à incoagulabilidade sangüínea (CARDOSO *et alii*, 1993; KAMIGUTI *et alii*, 1991a). Assim, o estudo dos mecanismos fisiopatológicos que causam trombocitopenia e induzem distúrbios da fisiologia plaquetária parece ser imprescindível para a compreensão das causas dos sangramentos sistêmicos em indivíduos envenenados. Ademais, as contribuições oriundas dos estudos sobre os mecanismos de ativação e inibição plaquetárias no envenenamento pelas serpentes do gênero *Bothrops* podem sugerir e indicar tratamentos mais adequados a esses indivíduos, que muitas vezes desenvolvem quadros graves relacionados aos distúrbios hemorrágicos (KOUYOUMDJIAN *et alii*, 1991; MILANI *et alii*, 1997).

Além disso, visto que o coelho é utilizado muitas vezes como modelo experimental para o estudo de doenças trombo-hemorrágicas, a utilização desse animal pode trazer novas contribuições para o estudo de outras patologias humanas relacionadas com o surgimento de distúrbios hemostáticos. Devido às diferenças observadas quanto ao mecanismo de ativação da cascata de coagulação do coelho e do homem pelo veneno de *B. jararaca*, além das discrepâncias verificadas quanto à função plaquetária nessas duas espécies, o cotejo das alterações hemostáticas nestas duas espécies poderá proporcionar um método de contraste para investigar os diversos mecanismos de ação desse veneno em diferentes espécies de mamíferos.

Assim, o escopo desta investigação foi o estudo da fisiologia plaquetária de coelhos antes e após a administração do veneno da serpente *B. jararaca*. Este estudo teve seu enfoque dirigido para os seguintes tópicos:

1. Determinação da contagem e parâmetros plaquetários (amplitude da distribuição de plaquetas (PDW), volume plaquetário médio (VPM) e plaquelécrito);
2. Estudo da agregação e secreção de ATP induzidas pelo colágeno em sangue total, assim como da aglutinação plaquetária induzida pela botrocetina neste mesmo meio;
3. Determinação dos níveis plasmáticos do fator de von Willebrand;
4. Estudo das GP da membrana plasmática das plaquetas de coelho, valendo-se da citometria de fluxo para a avaliação da expressão da GPIIb-IIIa e da P-selectina;
5. Estudo da expressão do fibrinogênio na superfície plaquetária por meio da citometria de fluxo;
6. Avaliação da secreção dos constituintes dos grânulos α e corpos densos plaquetários, por meio da dosagem plasmática do PF4 e da dosagem intraplaquetária de serotonina, respectivamente;

7. Determinação da sobrevivência plaquetária (plaquetas marcadas *ex vivo* com a NHS-biotina) e a quantificação das plaquetas recém-liberadas da medula óssea (plaquetas reticuladas), utilizando a citometria de fluxo;
8. Acompanhamento das alterações do sistema da coagulação por meio da dosagem do fibrinogênio e da antitrombina III plasmáticas;
9. Análise histopatológica e imuno-histoquímica de fragmentos de órgãos dos coelhos para a identificação do local de seqüestro plaquetário e depósito de fibrina.

Vaso ático *Lekythos*, Nova Iorque, Museu Metropolitano de Arte. Cerca de 430 a.C. Filoctetes (em túnica de mangas curtas, com o pé esquerdo enfaixado) se senta em uma rocha sob uma árvore, segurando o seu joelho com a mão esquerda. Ao seu lado, sobre a rocha, seu arco e aljava. Fonte: FONTANNAZ (2000); LIMC (1994).

Camaféu de calcedônia, Atenas, Museu Nacional. Cerca 400 a.C. Filoctetes, sem veste, senta-se sobre o seu himácio e segura com a mão direita o seu pé direito ferido pela picada da serpente. Fonte: **LIMC** (1994).

Estatueta cartaginesa de mármore, Paris, Museu do Louvre. Cópia romana de um original helenístico. Filoctetes (faltam a cabeça e os braços), veste uma túnica e a sua perna direita ferida está enfaixada. Fonte: **LIMC** (1994).

Entalhe em jaspe negro, Berlin, Museu Estadual. Cerca 150 a.C. Filoctetes, nu, de chapéu, cabelo e barba longos, senta-se sobre o seu himácio e segura com a mão direita arco e flecha. Fonte: **LIMC** (1994).

Entalhe em cornalina, Berlin, Museu Estadual. 50 a.C. Filoctetes (nu, despen-teado, expressão triste) senta-se sobre uma pedra e suporta sua cabeça com a mão direita. O seu pé direito está enfaixado. Ao seu lado, seu arco e aljava repleta de flechas. Fonte: **LIMC** (1994).