

Sisi Marcondes

IMPORTÂNCIA DOS SÍTIOS ANIÔNICOS DAS PLAQUETAS NA AGREGAÇÃO
INDUZIDA POR POLICÁTIONS

Orientador - Gilberto de Nucci

Tese apresentada ao Departamento de Farmacologia da Faculdade de Ciências
Médicas da UNICAMP para obtenção do Título de Mestre em Farmacologia

Campinas, 1993

M333i

20583/BC

Sisi Marcondes

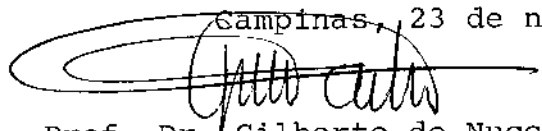
IMPORTÂNCIA DOS SÍTIOS ANIÔNICOS DAS PLAQUETAS NA AGREGAÇÃO
INDUZIDA POR POLICÁTIONS

Orientador - Gilberto de Nucci

Tese apresentada ao Departamento de Farmacologia da Faculdade de Ciências
Médicas da UNICAMP para obtenção do Título de Mestre em Farmacologia

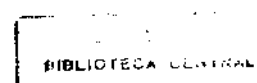
Este exemplar corresponde à versão final da tese de Mestrado, apresentada a Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP, para obtenção do título de Mestre em Farmacologia da Farmacêutica Bioquímica SISI MARCONDES.

Campinas, 23 de novembro de 1993



Prof. Dr. Gilberto de Nucci

- Orientador -



*"Se não há nada que brilhe
debaixo da pálpebra, é que
nada há que pense no
cérebro, e nada há que ame
no coração."*

Vitor Hugo

(1802-1885)

" *A maior loucura que um
homem pode fazer nesta
vida é deixar-se morrer.*"

Miguel de Cervantes

(1547-1616)

Dedico,

Ao Hélio

Aos meus pais, Joaquim e Zilda

Aos meus irmãos, Pire e Cuca

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Gilberto de Nucci, pela orientação, pelo incentivo e oportunidade.

Ao Prof. Edson Antunes, pela discussão do trabalho, pelas sugestões apresentadas, pelo carinho e amizade.

Ao Prof. Stephen Hyslop, pelo auxílio e colaboração na técnica de agregação plaquetária

Aos Profs. Helena Nader e Carl Peter Dietrich, pelo fornecimento de enzimas e discussão científica do trabalho

À amiga Dora Maria Grassi Kassisse, pela amizade e por estar sempre presente nos momentos difíceis.

À Maria das Dores Ponciano, pela atenção e carinho.

Aos funcionários da coleta do banco de sangue, pelo fornecimento deste material.

Aos colegas do Departamento de Farmacologia, pelo carinho, amizade e compreensão.

Aos funcionários e professores do Departamento de Farmacologia que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

À FAPESP, pelo apoio financeiro.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIACÕES	7
LISTA DE MATERIAIS	8
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE TABELAS	11
RESUMO	12
INTRODUÇÃO	13
OBJETIVOS	24
MÉTODOS	25
RESULTADOS	31
DISCUSSÃO	62
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68
ABSTRACT	80

LISTA DE ABREVIÇÕES

PAF	fator ativador de plaquetas
TXA ₂	tromboxano A ₂
TXB ₂	tromboxano B ₂
ADP	difosfato de adenosina
ATP	trifosfato de adenosina
SNP	nitroprussiato de sódio
Ilo	iloprost
Indo	indometacina
GMPc	monofosfato de guanosina cíclico
AMPc	monofosfato de adenosina cíclico
EDTA	ácido etilenodiaminotetraacético
TRIS	hidroximetil aminometano
PL	plaquetas lavadas
PRP	plasma rico em plaquetas
POPOP	1,4-di-(2-(4-metil-5-feniloxazolil))-benzeno
PPO	2,5-difeniloxazole
RIA	radioimunoensaio
PDA	acetato 1,3-diaminopropano
EDA	acetato etileno diamina
WEB 2086	(3-(4-(2-clorofenil)-9-metil-6H-tieno-(3, 2-f) (1, 2, 4)- triazolo-(4,3-a) (1,4)diazepina-2-il)-1-(4-morfolinil)-1- (propano)

LISTA DE MATERIAIS

SUBSTÂNCIA	PROCEDÊNCIA
Soro anti-TXB ₂	Dr. J. A. Salmon (Wellcome Res. Lab., Beckenham, GB)
Carvão ativado	Sigma Chemical Company (St. Louis, Mo, EUA)
Indometacina	Sigma Chemical Company (St. Louis, Mo, EUA)
Iloprost	Schering (Germany)
Nitroprussiato de sódio	Sigma Chemical Company (St. Louis, Mo, EUA)
³ H-Tromboxano B ₂	Amersham (Bucks, GB)
Difosfato de adenosina	Sigma Chemical Company (St. Louis, Mo, EUA)
Trifosfato de adenosina	Sigma Chemical Company (St. Louis, Mo, EUA)
Ácido poli-L-aspártico	Sigma Chemical Company (St. Louis, Mo, EUA)
Ácido poli-L-glutâmico 10.6 kD	Sigma Chemical Company (St. Louis, Mo, EUA)
Ácido poli-L-glutâmico 46.2 kD	Sigma Chemical Company (St. Louis, Mo, EUA)
Ácido poli-L-glutâmico 74 kD	Sigma Chemical Company (St. Louis, Mo, EUA)
Poli-D-lisina 26.5 kD	Sigma Chemical Company (St. Louis, Mo, EUA)
Poli-D-lisina 52.5	Sigma Chemical Company (St. Louis, Mo, EUA)
Poli-D-lisina 105.8 kD	Sigma Chemical Company (St. Louis, Mo, EUA)
Poli-DL-lisina 64 kD	Sigma Chemical Company (St. Louis, Mo, EUA)
Poli-L-lisina 2 kD	Sigma Chemical Company (St. Louis, Mo, EUA)
Poli-L-lisina 26.5 kD	Sigma Chemical Company (St. Louis, Mo, EUA)
Poli-L-lisina 98 kD	Sigma Chemical Company (St. Louis, Mo, EUA)
Poli-L-lisina 87.4 kD	Sigma Chemical Company (St. Louis, Mo, EUA)
Poli-L-lisina 84 kD	Sigma Chemical Company (St. Louis, Mo, EUA)
Poli-L-lisina 122 kD	Sigma Chemical Company (St. Louis, Mo, EUA)
Poli-L-lisina 289 kD	Sigma Chemical Company (St. Louis, Mo, EUA)
Trombina	Sigma Chemical Company (St. Louis, Mo, EUA)
Adenosina	Sigma Chemical Company (St. Louis, Mo, EUA)
Adrenalina	Sigma Chemical Company (St. Louis, Mo, EUA)
Colágeno	Sigma Chemical Company (St. Louis, Mo, EUA)
Yohimbina	Sigma Chemical Company (St. Louis, Mo, EUA)
Fator de agregação plaquetário	Sigma Chemical Company (St. Louis, Mo, EUA)
Cloreto de sódio	Merck (Germany)
Glicose	Merck (Germany)
Sulfato de magnésio	Merck (Germany)
Azida sódica	Sigma Chemical Company (St. Louis, Mo, EUA)

PPO	Sigma Chemical Company (St. Louis, Mo, EUA)
Gelatina	Aldrich Chemical Co Ltd (St. Louis, Mo, EUA)
POPOP	Koch-Light Laboratories Ltd (England)
Citrato tri-sódico	Merck (Germany)
TRIS	Sigma Chemical Company (St. Louis, Mo, EUA)
Dextran	Sigma Chemical Company (St. Louis, Mo, EUA)
Triton X-100	Nuclear (SP, BR)
Tolueno	Labsynth Produtos para Lab. LTDA (Diadema, SP, BR)
Tripticase	Dif Co Laboratories (Detroit, MI, USA)
Bactopeptona	Dif Co Laboratories (Detroit, MI, USA)
Heparina	LAOB (Barueri, SP, BR)
1,2-diaminoetano	Aldrich Chemical Co Ltd (St. Louis, Mo, EUA)
Papel Whatman nº 1	Wa & R. Balston Ltd (England)
Ácido isobutírico	Aldrich Chemical Co Ltd (St. Louis, Mo, EUA)
Nitrato de prata	Aldrich Chemical Co Ltd (St. Louis, Mo, EUA)
Azul de toluidina	Sigma Chemical Company (St. Louis, Mo, EUA)
Bicarbonato de sódio	Merck (Germany)
Cloreto de potássio	Merck (Germany)
Fosfato de potássio	Merck (Germany)
WEB 2086	Boehringer-Ingelheim (Germany)
Anticorpo 6F ₁ para colágeno	Dr. B.S. Collier, SUNY (Brook, New York)
EDTA	Sigma Chemical Company (St. Louis, Mo, EUA)
Maxatase	BIOCON (SP, BR)
Resina amberlite IRA 900	Sigma Chemical Company (St. Louis, Mo, EUA)
Agarose	Standard low-mr BIO-RAD (Richmond, Califórnia)
Acetato de 1,3-diaminopropano	Aldrich Chemical Co. Inc. (St. Louis, Mo, EUA)
CETAVLON	British Drug House Chemicals Ltd (Poole, Inglaterra)
Ácido acético	Merck (Alemanha)
Etanol	Co. Nacional de Álcool (SP BR)

Constituição da solução de Krebs-Ringer (mM): 118 NaCl, 25 NaHCO₃, 5.6 glicose, 4.7 KCl, 1.2 KH₂PO₄ e 1.17 MgSO₄.7H₂O.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Agregação plaquetária induzida pela poli-L-lisina em PRP é dependente da concentração e diretamente proporcional ao peso molecular deste polícatión.	38
Figura 2 - As formas enantiômeras da polilissina são equipotentes.	39
Figura 3 - Poli-D-lisina e poli-DL-lisina induzem agregação plaquetária dependente da concentração e do seu peso molecular.	40
Figura 4 - Comparação do perfil de agregação de ADP e polilissina.	41
Figura 5 - Indometacina não inibe a agregação induzida por polilissina.	42
Figura 6 - ATP não inibe a agregação induzida por polilissina.	43
Figura 7 - Adenosina não inibe a agregação induzida por polilissina.	44
Figura 8 - Yohimbina não inibe a agregação induzida por polilissina.	45
Figura 9 - WEB 2086 não inibe a agregação induzida por polilissina.	46
Figura 10 - SNP inibe de maneira dose-dependente a agregação induzida por polilissina.	47
Figura 11 - Iloprost inibe de maneira dose-dependente a agregação induzida por polilissina.	48
Figura 12 - Agregação induzida por polilissina em PRP 24 h após coleta do sangue.	49
Figura 13 - Plaquetas 24 h após a coleta do sangue não são agregadas por colágeno, adrenalina e PAF.	50
Figura 14 - Condroitinase AC inibe agregação induzida por polilissina	51
Figura 15 - Perfil da eletroforese do 4-sulfato de condroitina na membrana da plaqueta em plasma.	52
Figura 16 - O efeito induzido por polilissina em PL é dependente da concentração e diretamente proporcional ao seu peso molecular.	53
Figura 17 - Plaquetas lavadas são mais sensíveis à polilissina do que o plasma rico em plaquetas.	54
Figura 18 - Perfil do efeito de polilissina e trombina em PL.	55
Figura 19 - O efeito induzido por polilissina em PL independe de cálcio.	56
Figura 20 - Inibição do efeito de polilissina em PL (aglutinação) quando o ácido poliglutâmico é pré-incubado às plaquetas lavadas.	57
Figura 21 - A adição do ácido poliglutâmico após obtenção do efeito máximo induzido por polilissina reverte a aglutinação.	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Liberação de Tromboxano B ₂ durante a agregação induzida por polilisina em PRP.	59
Tabela 2 - Efeito sinérgico da polilisina na agregação plaquetária induzida por colágeno, ADP e adrenalina.	60
Tabela 3 - Polilisina não libera Tromboxano B ₂ em PL.	61

RESUMO

O objetivo desta tese foi caracterizar farmacologicamente a ativação plaquetária induzida pela polilisina (poliaminoácido básico) em plasma rico em plaquetas ou plaquetas lavadas humanas e verificar a influência dos sítios aniônicos na ativação plaquetária induzida por este polícatión.

A agregação plaquetária foi monitorada utilizando-se um agregômetro Payton ou Chrono-Log e a liberação de TXA_2 foi medida através de seu produto de degradação TXB_2 por radioimunoensaio. O perfil do sulfato de condroitina em plaquetas foi analisado através de eletroforese em gel de agarose.

Em PRP polilisina induziu agregação dependente da concentração e do peso molecular do polícatión. Esta agregação foi acompanhada pela liberação de TXA_2 e inibida por nitroprussiato de sódio e iloprost. Antagonistas de receptores de plaquetas para ADP, adrenalina, PAF e colágeno não modificaram a agregação induzida por polilisina em PRP.

Em PL o efeito de polilisina também foi dependente do peso molecular do polícatión. Este efeito não foi inibido por EDTA, iloprost e apenas parcialmente por SNP e não foi acompanhado por liberação de TXA_2 . Poliânions como o ácido poliglutâmico inibiram o efeito de polilisina quando adicionado antes ou depois deste evento.

A agregação de polilisina em PRP ou o efeito deste polícatión em PL não foram modificados por heparinase, heparitinase I ou heparitinase II, contrariamente, a condroitinase inibiu de maneira dose-dependente a agregação em PRP, mas não modificou o efeito deste poliaminoácido básico em PL.

Nossos resultados demonstraram que a polilisina induz agregação em PRP, mas não em plaquetas lavadas. A agregação induzida pela polilisina em PRP deve-se a carga catiônica do polícatión e depende parcialmente da presença de sulfato de condroitina na membrana plaquetária. Em plaquetas lavadas, a aglutinação induzida pela polilisina não se deve à interação com sulfato de condroitina. Estes resultados levam a hipótese que o sulfato de condroitina apresenta características de receptor plaquetário, visto que a interação eletrostática com um polícatión, como a polilisina, leva a um fenômeno de ativação metabólica. A expressão de sítios aniônicos das plaquetas pode desta maneira modular sua reatividade aos diversos agonistas.

1 - INTRODUÇÃO

1.1 Morfologia

Plaquetas são pequenos fragmentos de forma discóide oriundas do citoplasma de megacariócitos (Wright, 1906). Estes elementos estão presentes no sangue em uma concentração de $180 - 350 \times 10^3/\mu\text{l}$ e possuem meia-vida na circulação de 8 a 10 dias, quando então são retiradas principalmente pelo baço e fígado (Harker, 1978).

Plaquetas são anucleadas, mas contém as organelas e complexos moleculares comuns a outros tipos celulares tais como mitocôndrias, sistemas de Golgi, ribossomos, microtúbulos e grânulos. Os microtúbulos estão à margem da membrana plaquetária e, acredita-se serem os responsáveis pela manutenção da forma discóide da plaqueta (Zucker-Franklin, 1969).

As membranas plaquetárias são constituídas principalmente por fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, esfingomielina (Marcus et al, 1969), glicoproteínas (Okumura & Jamieson, 1976; Berndt & Phillips, 1981; Nurden & Caen, 1975), ácido siálico (Bosmann, 1972) e proteoglicanos (Nader, 1991).

Os grânulos são classificados em grânulos densos, grânulos alfa e grânulos lisossomais (Holmsen & Weiss, 1979).

As plaquetas possuem ainda um sistema canalicular que parece estar em continuidade com o meio externo e os grânulos alfa (Zucker-Franklin, 1969).

Os grânulos densos contém serotonina, ATP, ADP, cálcio e pirofosfato (Holmsen & Weiss, 1979). Os grânulos alfa possuem o fator 4 plaquetário, β -tromboglobulina, fator de crescimento derivado de plaqueta, proteínas catiônicas, fator quimiotático (responsável pela ativação do quinto componente do sistema complemento), fator bactericida e fatores que participam da cascata

da coagulação (fibrinogênio, fator V e o fator VIII/von Willebrand; Holmsen & Weiss, 1979). Nos grânulos lisossomais encontram-se algumas hidrolases ácidas como a β -glucuronidase e β -galactosidase (Holmsen & Weiss, 1979).

A função primordial das plaquetas é manter a hemostasia formando tampões hemostáticos que ocluem sítios danificados do sistema vascular. Após transecção de vasos sanguíneos, as plaquetas aderem ao tecido conectivo às margens da lesão. Após alguns minutos forma-se um tampão hemostático plaquetário que oclue a lesão e detém a perda de sangue (Roskam et al, 1959).

1.2. Agonistas plaquetários

A ativação plaquetária pode gerar quatro diferentes fenômenos: mudança de forma da plaqueta, adesão, agregação e secreção. O primeiro evento envolve a mudança da forma discóide plaquetária para a forma esférica acompanhada de emissão de "pseudópodes". Secreção compreende a extrusão do conteúdo granular que ocorre durante a agregação, adesão ou mesmo na ausência de ambas. Adesão é o processo na qual plaquetas se juntam à superfícies que não a de outras plaquetas e, finalmente, agregação é o processo em que plaquetas se juntam somente a superfícies de outras plaquetas.

A agregação plaquetária requer atividade do metabolismo plaquetário. Diversos agonistas (ADP, trombina, colágeno, PAF, ácido araquidônico, adrenalina e outros) são capazes de se ligar as plaquetas e iniciar uma série de reações bioquímicas que levam a formação de agregados plaquetários e secreção granular (Born, 1962; Tollefsen et al, 1974; Wilner et al, 1968; Chesney et al, 1982; Armstrong et al, 1983; O'Brien, 1963).

Estes agonistas são classificados em fortes e fracos dependendo da capacidade destes em estimular a secreção de grânulos plaquetários na

ausência (forte) ou somente na presença (fraco) de agregação plaquetária (Holmsen, 1972; Charo et al, 1977). Imediatamente após a adição de um determinado agonista (exceto adrenalina), ocorre uma diminuição temporária na transmissão de luz seguida por um aumento da transmitância de luz. O primeiro evento corresponde ao "shape change" e o segundo corresponde à agregação. São descritas duas ondas da agregação. A primeira onda (ou agregação primária) é uma consequência direta do estímulo do agonista; é reversível e não é associada a secreção plaquetária. A segunda onda (ou agregação secundária) corresponde a formação de grandes e irreversíveis agregados acompanhados de secreção plaquetária.

A trombina é considerada um agonista plaquetário forte (Berndt et al, 1986). Esta substância estimula o "shape change" seguida de agregação primária e secundária (Holmsen, 1972). Como um agonista forte, a trombina estimula a secreção plaquetária em condições nas quais não há agregação (Holmsen, 1972; Charo et al, 1977). Outro exemplo de agonista plaquetário forte é o colágeno (Wilner et al, 1968). Quando o colágeno se liga à plaqueta, ocorre estimulação da síntese de tromboxano A_2 e secreção de ADP, que também são agonistas plaquetários (Charo et al, 1977). Concentrações elevadas de colágeno podem induzir agregação plaquetária independente da liberação de tromboxano A_2 (Charo et al, 1977).

O ADP é considerado um agonista plaquetário fraco. Esta substância foi o primeiro agonista plaquetário específico a ser identificado (Gaarden et al, 1961) e é secretado pelos grânulos densos quando plaquetas são estimuladas; pode também ser liberado por tecidos danificados e células vermelhas do sangue (Gaarden et al, 1961; Holmsen & Weiss, 1979). Assim como o ADP, a adrenalina é considerada um agonista fraco. A indução de agregação plaquetária por adrenalina é dependente da síntese de tromboxano A_2 (Charo

et al, 1977). Adrenalina é capaz de potenciar a resposta de outros agonistas plaquetários (Grant & Scrutton, 1980; Huang & Detwiler, 1981).

1.3. Mecanismos de ativação e inibição plaquetárias

A estimulação plaquetária inicia-se pela interação de um determinado agonista a um receptor específico presente na membrana da plaqueta. Geralmente, estes receptores interagem com proteínas de membrana que requerem GTP, as proteínas G (Cassey & Gilman, 1988). Estas enzimas atuam como transdutores entre certos receptores e enzimas efetoras ou canais iônicos (Gilman, 1984).

O primeiro evento ligado à ação do agonista estimulatório é a ativação da fosfolipase C (PLC) que está ligada a uma proteína G. A proteína G possui três sub-unidades - α , β e γ . Quando a proteína G é ativada o GTP liga-se a sub-unidade α e dissocia-se de $\beta\gamma$. O complexo GTP- α ativa determinadas enzimas como a fosfolipase C, enquanto o complexo $\beta\gamma$ está, provavelmente, implicado na ativação do canal de potássio. A sub-unidade α possui atividade GTPase intrínseca que hidroliza GTP a GDP fazendo com que as sub-unidades $\beta\gamma$ religuem-se a α . A remoção da sub-unidade α livre desliga o sistema de transdução do sinal de ativação para o interior da plaqueta (Ashby et al, 1990). A fosfolipase C, quando ativada, cliva o fosfatidilinositol 4,5-bifosfato liberando o diacilglicerol (DG) e o inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃) (Bell & Majerus, 1980; Billah & Lapetina, 1982; Berridge & Irvin, 1984). O diacilglicerol ativa a proteína quinase C, que por sua vez regula a formação do citoesqueleto da plaqueta (Hashimoto et al, 1987) e a hidrólise do inositol 1,4,5-trifosfato para inositol 1,4-bifosfato, através da fosforilação da 5-fosfomonoesterase (Connolly et al, 1986), além de levar a uma modificação, independente de cálcio, do complexo GpIIb-

Illa existente na membrana da plaqueta, permitindo a ligação do fibrinogênio (Shattil & Brass, 1987).

O IP_3 libera cálcio do sistema tubular denso da plaqueta (Brass & Joseph, 1985; O'Rourke et al, 1985). O sistema tubular denso plaquetário é análogo ao retículo sarcoplasmático presente no músculo e representa um sítio de sequestro de cálcio na plaqueta (Brass, 1984). O aumento dos níveis citosólicos de cálcio promove processos dependentes de calmodulina, tais como a fosforilação da miosina de cadeia leve, e facilita a ativação de enzimas cálcio-dependente como a proteína quinase C e a fosfolipase A_2 (Nishikawa et al, 1980; Loeb & Gross, 1986; Brass et al, 1987). A quinase da miosina de cadeia leve ativada fosforila a miosina plaquetária. Esta fosforilação é necessária para a interação ATP dependente entre miosina e actina que resulta em hidrólise de ATP e geração de força contrátil que está relacionado ao "shape change" e centralização dos grânulos da plaqueta (Adelstein et al, 1975; Daniel et al, 1984; Lebowitz & Cooke, 1978).

Quando a fosfolipase A_2 é ativada ocorre liberação do ácido araquidônico a partir de fosfolípidos de membrana, principalmente da fosfatidilcolina e da fosfatidiletanolamina (Bills et al, 1977). Na plaqueta o ácido araquidônico liberado é convertido pela cicloxigenase aos endoperóxidos intermediários PGG_2 e PGH_2 e, subsequentemente, a tromboxano A_2 pela enzima tromboxano sintetase (Hammarstrom & Falaradeau, 1977). As plaquetas podem ainda liberar o ácido araquidônico a partir do diacilglicerol através das enzimas diacilglicerol lipase e a monoacilglicerol lipase (Bills et al, 1977; Purdon & Smith, 1985). Em plaquetas de cavalo o diacilglicerol também pode ser fosforilado pela diacilglicerol quinase levando a formação do ácido fosfatídico. O ácido fosfatídico pode sofrer ação direta da fosfolipase A_2 liberando o ácido araquidônico ou pode sofrer ação de acetiltransferases, formando

fosfatidiletanolamina ou fosfatidilcolina, que podem ser utilizadas como substrato pela fosfolipase A_2 liberando o ácido araquidônico (Billah et al, 1980). O ácido fosfatídico também pode ser reciclado para nova síntese de fosfatidilinositois (Bishop & Bell, 1986). O tromboxano A_2 e os endoperóxidos são potentes agonistas plaquetários e vasoconstritores (Hamberg et al, 1974; Samuelsson et al, 1978).

A ativação plaquetária pode ser inibida em vários níveis, como na ligação do agonista a membrana plaquetária, na liberação de tromboxano ou na translocação de cálcio. Entretanto, de modo geral, as respostas plaquetárias são inibidas pela elevação dos níveis intracelulares de AMPc (Mills & Smith, 1972).

O AMPc é formado a partir do ATP pela ação da enzima adenilato ciclase e, posteriormente, quebrado pela AMPc fosfodiesterase em AMP. A adenilato ciclase é encontrada na membrana de plaquetas e várias formas de fosfodiesterases podem estar presentes no citoplasma e membrana (Grant & Colman, 1984).

A formação de AMPc em plaquetas intactas é estimulada através de receptores da superfície pela PGI_2 , PGD_2 , PGE_1 e adenosina. PGI_2 é produzido no endotélio (Moncada et al, 1976) e representa o mais potente estimulador conhecido da formação de AMPc. PGI_2 é um hormônio circulante que regula a responsividade das plaquetas circulantes (Moncada & Korbet, 1978). Atualmente, aceita-se que os efeitos de AMPc devem-se, principalmente, à fosforilação de proteínas (Kroll & Schafer, 1989). A proteína quinase dependente de AMPc, quando ativada por este segundo mensageiro, estimula o sistema de captação de cálcio removendo-o do citoplasma (Ashby et al, 1990). A diminuição dos níveis citoplasmáticos de cálcio parece ser o principal mecanismo pelo qual a elevação dos níveis de AMPc inibe a resposta

plaquetária. Outros mecanismos pelo qual o AMPc induz inibição incluem inibição da fosfolipase C (Shukla, 1985, Imai et al, 1983), inibição da quinase da miosina de cadeia leve que é responsável pela ativação da miosina de cadeia leve (Feinstein et al, 1983, Hathaway et al, 1981), alteração da exposição dos receptores de von Willebrand e fibrinogênio (Fujimoto et al, 1982, Graber & Hawiger, 1982) e diminuição da afinidade da trombina pelo seu sítio de ligação à plaqueta (Lerea et al, 1987).

O GMPc é um outro segundo mensageiro capaz de inibir a agregação plaquetária. Nitrovasodilatadores como o nitroprussiato de sódio, nitroglicerina, azida sódica e outras substâncias que liberam óxido nítrico (NO) são potentes inibidores da agregação plaquetária por ativarem a guanilato ciclase aumentando, conseqüentemente, os níveis de GMPc intraplaquetários (Loscalzo, 1985; Erne et al, 1986, Waldmann et al 1987). O vasodilatador endógeno EDRF (fator relaxante derivado de endotélio), considerado hoje como sendo o NO (Palmer et al, 1987), inibe a agregação plaquetária, tendo assim um papel, juntamente com a prostaciclina, na regulação homeostática da interação entre plaquetas e as paredes dos vasos sanguíneos (Radomski et al, 1987). As plaquetas também são capazes de sintetizar NO (Radomski et al, 1990). A resposta plaquetária pode também ser inibida por substâncias que inibem a GMPc fosfodiesterase (Hagiwara et al, 1984). O mecanismo da inibição da agregação plaquetária pela elevação dos níveis de GMPc ainda não está bem esclarecido, mas tem sido sugerido que pode ser causado pela inibição da fosfolipase C (Takai et al, 1981; Nakashima et al, 1986) e mobilização de cálcio (Nakashima et al, 1986; Nawahara et al, 1984).

1.4. Proteoglicanos plaquetários

Proteoglicanos são definidos, de modo geral, como compostos de alto peso molecular, constituídos de um esqueleto proteico ao qual estão ligados covalentemente uma ou mais cadeias de glicosaminoglicanos. Os glicosaminoglicanos, por sua vez, são heteropolissacarídeos lineares constituídos por unidades dissacarídicas repetitivas compostas por hexosaminas e açúcares não nitrogenados, unidas por ligações glicosídicas. Este conceito foi introduzido por Meyer em 1938 para definir estes compostos, anteriormente conhecidos como mucopolissacarídeos (Meyer, 1938). Os glicosaminoglicanos, devido a presença de carboxilas dos açúcares ácidos e as substituições com ésteres de sulfato, possuem uma alta densidade de cargas negativas.

Durante a última década tem sido demonstrado a presença de proteoglicanos na superfície de vários tipos celulares. Estas substâncias estão implicadas nas interações intercelulares, na organização estrutural da matriz extracelular, controle da hemostase e na ligação específica de certas proteínas plasmáticas à parede dos vasos sanguíneos (Hook, 1984; Lindahl & Hook, 1978). Atualmente são conhecidos sete tipos de proteoglicanos naturalmente encontrados no organismo, representados pelo o hialuronato, 4-sulfato de condroitina, 6-sulfato de condroitina, sulfato de dermatan, sulfato de heparan, sulfato de keratan e heparina. Estas substâncias estão presentes na membrana celular como parte integral das mesmas ou como componentes periféricos e estão distribuídas diferentemente entre os vários sistemas celulares. Assim, vasos de calibre pequeno, por exemplo, são pobres em sulfato de dermatan, pois sofrem grandes variações de tamanho; vasos de grande calibre, como a aorta, são ricos em sulfato de dermatan visto que este dá uma maior rigidez ao vaso (Hook, 1984; Ausprunk et al, 1981).

Por outro lado, células endoteliais possuem um tipo diferente de sulfato de heparan que acredita-se ser o responsável pela manutenção da fluidez sanguínea, por inibir a conversão de pró-trombina em trombina (Buonassisi & Colbum, 1982).

Além disso, as glicoproteínas fibronectina e laminina da matriz extracelular ocorrem em íntima associação com o sulfato de heparan, sugerindo que este proteoglicano tenha grande papel na formação da matrix extracelular e adesão celular (Hedman et al, 1982).

Antitrombina é uma glicoproteína que se liga a trombina, inativando-a. A presença de heparina faz com que esta ligação ocorra com muito mais facilidade, provavelmente por aumentar a afinidade da antitrombina à trombina, atuando assim como substância anticoagulante (Rosemberg & Damus, 1973; Li et al, 1976).

LDL (low density lipoprotein) é uma lipoproteína e grande carreadora de colesterol. Sulfato de dermatan, principalmente, tem sido postulado ter um importante papel no desenvolvimento da lesão de arterioesclerose, pois este seria o receptor desta lipoproteína. Apoiando esta hipótese, sabe-se que o principal glicosaminoglicano sintetizado pelas células do músculo liso arterial é o sulfato de dermatan que está mais proliferado em sítios de lesões arteroscleróticas (Wight & Ross, 1975).

Membranas plaquetárias contém heparina, sulfato de heparan e sulfato de condroitina. Durante a agregação induzida por ADP, adrenalina, noradrenalina, serotonina, colágeno e trombina há liberação de 4- sulfato de condroitina para o meio exterior. Há ainda evidências que sulfato de heparan e condroitina, responsáveis por parte dos sítios aniônicos da membrana plaquetária, estejam implicados na interação entre as mesmas (Hagen, 1972; Nader, 1991).

Desde a descoberta de glicosaminoglicanos associados a superfícies de células tem-se hipotetizado que estes poderiam atuar como "receptores" de moléculas circulantes, ou seja, como tais substâncias são fortes poliânions, toda molécula que em pH fisiológico fosse carregada positivamente se ligaria a estes glicosaminoglicanos. O fator 4 plaquetário, por exemplo, se liga às células endoteliais em cultura via sulfato de heparan (Hook, 1984).

Existem enzimas específicas que atuam sobre estes proteoglicanos depolimerizando certos polissacárides acídicos, como a heparinase, a heparitinase e a condroitinase (Linhardt et al, 1990).

1.5. Proteínas catiônicas

Proteínas catiônicas são produzidas no organismo principalmente por leucócitos ou plaquetas ativadas (Camussi et al, 1986), entretanto a função destas proteínas ainda não está bem definida.

Superfícies carregadas negativamente de células circulantes como plaquetas, neutrófilos, eritrócitos (Bangham et al, 1958), assim como de células da parede de vasos sanguíneos (Simionescu et al, 1981; Skutelsky et al, 1975) podem interagir com substâncias policatiônicas.

Eritrócitos podem ser aglutinados por substâncias policatiônicas, mas não por polímeros carregados negativamente ou neutros (Katchalsk et al 1959). Estes autores demonstraram que a aglutinação não ocorria somente devido ao caráter básico destas substâncias, mas também por causa de sua natureza polimérica já que seus respectivos monômeros não eram capazes de aglutinar eritrócitos.

Proteínas catiônicas liberadas de plaquetas aumentam a permeabilidade glomerular e este efeito se deve a uma interação iônica entre sítios aniônicos do glomérulo e as proteínas, pois poliânions, como heparina, são capazes de inibir

este aumento de permeabilidade tanto *in vivo* quanto *in vitro* (Camussi et al, 1986; Tetta et al, 1985).

Sulfato de protamina é capaz de induzir secreção enzimática de neutrófilos e este efeito também parece se dever ao conteúdo catiônico desta substância (Efferink & Deierkauf, 1986). Policátions sintéticos também são capazes de liberar histamina de mastócitos (Suzuki-Nishimura et al 1989; Ennis et al, 1980).

Poli-L-lisina e poli-L-arginina (poliaminoácidos básicos) são capazes de causar aumento de permeabilidade vascular, dependente da concentração e peso molecular do policátion utilizado. Este efeito parece ocorrer basicamente devido a uma interação eletrostática entre determinadas proteínas aniônicas do endotélio e o policátion, visto que o aumento de permeabilidade vascular era marcadamente diminuído quando o policátion era pré-incubado com um poliânion como a heparina (Antunes et al, 1990).

Poli-L-arginina, quando injetada dentro da cavidade pleural ou dentro da traquéia, induz pleurisia, caracterizada por grande e rápida formação de exudado juntamente com migração leucocitária. A formação de exudado foi dependente do peso molecular do policátion e inibida pelos poliânions heparina e sulfato de dermatan, demonstrando que este efeito foi dependente de interações eletrostáticas (Santana et al, 1993).

Jenkins e colaboradores (1971) demonstraram que polilisina (poliaminoácido básico) induz agregação de plaquetas humanas em plasma ou suspensas em tampão.

O mecanismo pelo qual policátions induzem agregação e/ou aglutinação em plaquetas não é bem conhecido, assim como seus possíveis receptores a nível da membrana plaquetária. O objetivo desta tese é investigar estas interações.

2. OBJETIVOS

1- Caracterizar farmacologicamente a ativação plaquetária induzida pela polilisina em plasma rico em plaquetas ou plaquetas lavadas humanas.

2- Verificar a influência dos sítios aniônicos na ativação plaquetária induzida pela polilisina.

3. MÉTODOS

3.1- *Obtenção do plasma rico em plaquetas*

Sangue humano de voluntários sadios que não receberam qualquer medicação durante 10 dias anteriores ao experimento foi coletado em citrato tri-sódico 3.8% (9:1 v/v). O plasma rico em plaquetas (PRP) foi obtido por centrifugação do sangue total a 200 g em temperatura ambiente por 15 min. O sangue remanescente foi novamente centrifugado a 2000 g a temperatura ambiente por 15 min para obtenção do plasma pobre em plaquetas (PPP). o sangue do mesmo indivíduo nunca foi repetido para o mesmo protocolo experimental.

3.2- *Obtenção de plaquetas lavadas*

Ao PRP foi adicionado iloprost (0.8 μ M) e o mesmo foi centrifugado a 800 g por 10 min. O sobrenadante foi desprezado e ao resíduo plaquetário foi adicionado solução de Krebs-Ringer desprovida de cálcio. O resíduo plaquetário foi cuidadosamente resuspenso na solução de Krebs-Ringer, adicionando-se novamente iloprost (0.8 μ M). Repetiu-se o mesmo processo acima, adicionando-se ao final 1 mM de cloreto de cálcio (Radomski & Moncada, 1983). O número de plaquetas foi ajustado para 1.5×10^8 plaquetas /ml através de contagem manual, utilizando-se câmara de Neubauer.

3.3- *Radioimunoensaio para TXA₂*

Os agentes agregantes usados (polilisina, ADP ou trombina) foram adicionados ao PRP ou PL e, após obtenção de agregação máxima, a amostra foi transferida imediatamente para Eppendorfs e centrifugadas (Centrifuge 5412, Eppendorf Geratebau, Germany) por 3 min à temperatura ambiente. O sobrenadante foi retirado e mantido em freezer (-20^o C) até o momento da

dosagem. Como controle da produção de TXA₂, algumas amostras foram pré-incubadas com indometacina (10 µM) por 20 min.

A concentração de TXA₂ foi analisada por radioimunoensaio (RIA) através de seu produto de degradação, TXB₂ (Salmon, 1978).

Anti-soros provenientes de coelho foram diluídos (1:1000 - 1:2000) em tampão Tris (50 mM, pH 7.4) contendo gelatina (0.1%) e azida sódica (NaN₃; 0.1%). Aliquotas de 0.1 ml dos antisoros foram misturados com os padrões ou amostras em tubos de ensaio (10 x 75 mm). O TXB₂ marcado (³H) diluído em tampão Tris-gelatina (0.1 ml contendo aproximadamente 10.000 dpm) foi imediatamente adicionado e o volume total da reação completado para 0.4 ml com tampão TRIS. O período de incubação foi de 18 - 48 h a 4^o C. Para remover o material não ligado da mistura, foi adicionado uma mistura de carvão e dextran (0.2 ml de tampão contendo 4 mg de carvão e 0.8 mg de dextran) a cada tubo, sendo em seguida agitados por 10 segundos. Os tubos permaneceram imersos em camada de gelo durante 10 min após o qual foram centrifugados a 2000 g durante 15 min em centrífuga refrigerada (Beckman). O sobrenadante contendo o complexo antígeno-anticorpo foi coletado e a este foi adicionado 4.5 ml do líquido de cintilação (PPO 0.4 g + POPOP 4.0 g + Triton X 333 ml + tolueno qsp 1000 ml). A radioatividade foi determinada em um espectrofotômetro de cintilação líquida (Beckman LS-150). A eficiência de contagem foi confirmada usando-se um padrão externo.

3.4- Purificação das enzimas provenientes da *Flavobacterium heparinum*

As enzimas condroitinase AC, heparinase, heparitinase I e heparitinase II foram extraídas da bactéria *Flavobacterium heparinum* (ATCC 13125). Esta bactéria foi cultivada em meio ágar mais tripticase e depois foi transferida para 50 ml de um meio líquido, contendo glicose e bactopectona por aproximadamente 15 horas. Em seguida foi transferida para um líquido de indução contendo 150 mg/ml de heparina por 16 horas. O líquido foi centrifugado a 4000 g por 20 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o resíduo foi ressuspensão em 10 ml de tampão EDA, pH 7.0 a 0.1 M. Em seguida, esta solução foi sonicada por 5 min. em pulsos de 30 s/min. Durante todo o processo a solução foi mantida em gelo. Após sonicação a mistura foi centrifugada a 100000 g por 60 min. No sobrenadante obtivemos o extrato bruto das enzimas, o qual foi aplicado a uma coluna de DEAE-celulose (2 x 20 cm), previamente equilibrada com acetato de etileno diamida 0.1 M, pH 7.0. Frações de 10 ml foram coletadas com um fluxo de 20 ml/h. Estas frações foram ensaiadas com diferentes substratos (ver abaixo). As frações contendo atividade enzimática foram concentradas sob pressão de diálise e nitrogênio e em seguida foram aplicadas em coluna de Bio-Gel A-0.5m (4 x 135 cm), previamente equilibrada com o mesmo tampão. Frações de 10 ml foram coletadas e alíquotas destas frações foram ensaiadas com diferentes substratos. As frações contendo heparinase, heparitinase I, heparitinase II e condroitinase AC foram concentradas sob pressão de diálise e nitrogênio e adicionadas em 2 ml de acetato de etileno diamida, pH 7.0 e aplicadas em coluna de carboximetil celulose (1 x 10 cm). As enzimas foram eluídas da coluna com diferentes molaridades (0.01-0.1 M) de acetato de etileno diamida, pH 7.0. O ensaio das enzimas foi realizado conforme descrito a seguir. Alíquotas de 10 µl de enzima

foram incubadas 24 h com 100 µg de substrato em tampão de acetato de etileno diamida, pH 7.0 com volume final de 20 µl. A mistura foi aplicada em papel Whatman nº 1 e submetida a corrida cromatográfica por 48 h, utilizando como solvente o ácido isobutírico, 1M NH₃ (5/3, v/v). Os produtos formados foram detectados em lâmpada de UV e revelados com nitrato de prata ou azul de toluidina. Alternativamente, os produtos insaturados foram quantificados por espectrofotometria a 230 nm em um tampão KCl-HCl 0.1 M, pH 2.0.

3.5- Preparo das amostras que foram submetidas a cromatografia

O material, contendo plasma rico em plaquetas ou plaquetas lavadas, foi inicialmente centrifugado a 6000 g por 10 min e o sobrenadante foi submetido a proteólise adicionando-se 1 mg/ml de maxatase, uma protease inespecífica, e NaCl visando uma concentração final de 0.3 M. Esta mistura ficou sob agitação por 24 h a uma temperatura de 55 - 60° C. A seguir, foi adicionado 1 ml para cada 5 ml de plasma de resina amberlite Ira 900 e, novamente, deixado sob agitação por 24 h a 55 - 60° C. A resina foi então colocada em uma pequena coluna e lavada com água quente para retirar qualquer substância que tenha feito uma ligação inespecífica com a mesma. Esta coluna foi eluída com 3 volumes de NaCl 2 M e o eluato foi filtrado em milipore LGC. Os glicosaminoglicanos retidos sobre a malha foram ressuspensos em 200 µl de água e depois secados à vácuo. O resíduo foi novamente ressuspensos em 30 µl de água e submetidos a eletroforese em gel de agarose.

3.6- Eletroforese em gel de agarose

Os compostos foram aplicados em lâminas de gel de agarose de 7.5 x 5.0 x 0.2 cm (agarose 0.55%), em tampão PDA, 0.05M, pH 9.0 e, submetidos a corrida eletroforética a 5 v/cm durante 1 h sob refrigeração a 4^o C. Nestas condições os glicosaminoglicanos migram em direção ao polo positivo e são discriminados por ordem decrescente de mobilidade eletroforética o sulfato de condroitina, o sulfato de dermatan e o sulfato de heparan.

Após a migração eletroforética em cada sistema, os compostos foram precipitados com CETAVLON 0.1% por um intervalo de tempo mínimo de 2 h. A seguir, o gel foi seco sob uma corrente de ar quente e corado com azul de toluidina 0.1%, preparado com ácido acético 1% e etanol 50%. A seguir, os géis foram mantidos à temperatura ambiente e depois de secos foi feita densitometria a 525 nm para a quantificação dos compostos. Para o cálculo das concentrações dos polissacarídeos foram usados padrões de cada classe de glicosaminoglicanos. O erro do método é de ordem de 5%.

3.7- Agregação plaquetária

A agregação foi monitorada utilizando-se um agregômetro de canal simples (Chrono-Log Corporation, Haverton, PA) ou um agregômetro de dois canais (Payton Scientific Instruments, Inc., Buffalo, NY). Os aparelhos foram calibrados para 0% (usando PRP ou PL) e 100% (usando PP ou solução de Krebs).

Em todos os experimentos foram adicionados 10 µl de solução de polication, ADP ou trombina a 500 µl de PRP ou plaquetas lavadas e a agregação monitorada por pelo menos 5 min. ADP (10 µM) e trombina (200 mU/ml) foram usados como controles em PRP e PL, respectivamente.

Os inibidores utilizados foram adicionados de 3 - 20 min antes da adição do agente agregante e, em alguns experimentos, após a obtenção da agregação máxima.

Para a verificação de sinergismo entre polilisina e outros agonistas (ADP, colágeno e adrenalina) foram inicialmente construídas curvas dose-resposta com poli-D-lisina (105.8 kD) para se obter a dose sub-agregante do polícatión. Após administração da dose sub-agregante do polícatión foram adicionadas doses crescentes de ADP, colágeno ou adrenalina. Esta curva foi comparada em um mesmo experimento com curvas dose-resposta de ADP, colágeno e adrenalina na ausência de polilisina.

Nos experimentos para determinar o efeito do tempo de estocagem das plaquetas em resposta à agregação induzida pela polilisina, ADP, adrenalina, PAF e colágeno, o PRP foi estocado em tubos de plástico à temperatura ambiente e testado durante 24 h.

3.8. Análise estatística dos dados

Os dados foram analisados pelo teste t de Student pareado. $p < 0.05$ foi considerado estatisticamente significativo.

4. RESULTADOS

4.1- Plasma rico em plaquetas (PRP)

4.1.1. Efeito de poliaminoácidos catiônicos e aniônicos

O poliaminoácido catiônico poli-L-lisina com pesos moleculares que variaram de 2 a 289 kD induziu agregação plaquetária em PRP dependente da concentração e peso molecular (fig 1). Igualmente, o enantiômero dextrógero, poli-D-lisina (26.5 - 105 kD) induziu agregação plaquetária de magnitude similar à forma L (fig. 2), caracterizando-se também por apresentar agregação dependente da dose e do peso molecular (fig. 3). O perfil de agregação de ambos poli-L-lisina e poli-D-lisina, no que diz respeito à presença de "shape change", tempo de latência para desencadeamento da agregação e agregação máxima foi semelhante àquele apresentado pelo ADP (fig 4).

O ácido poli-L-glutâmico (10.6, 46.2 e 74 kD) e o ácido poli-L-aspartico (28.8 kD), em concentrações de 10.8 - 75.5 μM , $n=3$, não foram capazes de induzir agregação em PRP.

4.1.2. Participação do TXA_2 na agregação induzida por polilisina

A contribuição do TXA_2 sobre a agregação plaquetária induzida pela polilisina foi investigada medindo-se os níveis de TXA_2 e tratando-se o PRP com indometacina (inibidor de cicloxigenase). Conforme mostrado na tabela 1, verificamos que a agregação máxima induzida por poli-D-lisina (105 kD, 1.9 μM), poli-L-lisina (26.5 kD, 7.6 μM) e ADP (10 μM) foi acompanhada por uma substancial produção de TXA_2 quando comparado aos níveis basais na ausência de estímulo agregante.

A pré-incubação (20 min) do PRP com indometacina (10 μM) reduziu marcadamente os níveis de TXA_2 , mas não alterou de forma significativa a resposta agregante dos três agentes estudados (fig, 5, tabela 1).

4.1.3. Envolvimento de receptores de ADP, adrenalina, PAF e colágeno

O ATP e adenosina foram utilizados neste trabalho como antagonistas de receptores de ADP do tipo P₂ e P₁, respectivamente. Ambos ATP (1 - 30 µM) e adenosina (0.1 µM - 3 mM) inibiram a agregação induzida pelo ADP de forma dose-dependente (fig 6 e 7). Entretanto, adenosina e ATP, mesmo em concentrações máximas 3 e 0.3 mM, respectivamente, não interferiram com a agregação induzida pela poli-L-lisina.

A figura 8 mostra que a yohimbina (antagonista de receptores alfa 2), na concentração de 1 µM inibiu significativamente a agregação plaquetária induzida por adrenalina (10 µM), entretanto concentrações 300 vezes maiores não afetaram a agregação induzida por poli-L-lisina 122 kD (0.8 µM).

A pré-incubação do PRP com WEB 2086 (antagonista de PAF), na concentração de 1 µM aboliu a agregação induzida por PAF (1 µM). WEB 2086 (100 µM) não afetou a agregação induzida por poli-L-lisina 122 kD (0.8 µM, fig. 9).

O anticorpo 6F₁ (específico para GpIA), quando pré-incubado por 3 min ao PRP a uma concentração de 10 µg/ml aboliu a agregação induzida por colágeno (20 µg/ml). O mesmo anticorpo (30 µg /ml) não modificou a resposta agregante de poli-L-lisina 84 kD (2.4 µM, resultado não mostrado).

4.1.4. Elevação dos níveis intraplaquetários de AMPc e GMPc

O efeito dos níveis elevados de GMPc e AMPc sobre a agregação plaquetária induzida por polilisina foi rotineiramente investigado utilizando substâncias que sabidamente estimulam a guanilato ciclase (nitroprussiato de sódio) e a adenilato ciclase (prostaciclina).

A incubação do PRP por 3 min. com nitroprussiato de sódio (30-3000 μM) inibiu de forma dependente a agregação induzida por poli-L-lisina (98 kD 0,2 μM) e ADP (10 μM), conforme ilustrado na figura 10. Entretanto, em termos de ED₅₀ (dose necessária do SNP para inibir 50% da agregação máxima), verificamos que o SNP foi mais efetivo em inibir a resposta agregante do ADP (ED₅₀= 4.97 μM) do que a polilisina (ED₅₀ = 489 μM). O efeito inibitório do SNP foi dependente do tempo de pré-incubação, sendo necessários 3 min para se obter a inibição máxima (não mostrado).

Resultados semelhantes foram obtidos com o iloprost (análogo estável da prostaciclina). Em concentrações de 0.6 nM - 30 nM e períodos de incubação de 3 min., o iloprost inibiu a agregação produzida pela poli-L-lisina (98 kD, 2 μM) e ADP (10 μM). Verificamos também que o iloprost foi mais eficaz em inibir agregação induzida pelo ADP (ED₅₀= 0.72 nM) do que pela poli-L-lisina (ED₅₀= 6.89 nM) (fig. 11).

4.1.5. Efeito do tempo de estocagem na agregação induzida por polilisina

A figura 12 mostra o efeito agregante do ADP e polilisina usando-se PRP mantido à temperatura ambiente por períodos de 2 a 24 h. Podemos observar que após 24 h a agregação induzida pelo ADP (10 μM) foi significativamente reduzida ($21 \pm 7\%$, n=11). Entretanto, as respostas agregantes induzidas por poli-D-lisina 105.8 kD (1.9 μM , n=3), poli-L-lisina 122 kD (1.6 μM , n=3) e poli-L-lisina 289 kD (0.7 μM , n=3) não foram significativamente alteradas. Adrenalina

(10 μ M, n=3), PAF (1 μ M, n=3) e colágeno (10 μ g/ml, n=3) não induziram agregação após 24 h de estocagem do plasma (fig. 13).

4.1.6. Sinergismo entre polilisina e outros agentes agregantes

Com o objetivo de verificar a existência de sinergismo entre polilisina e outros agentes agregantes (ADP, adrenalina e colágeno), incubou-se o PRP com doses crescentes de ADP (0.1 - 10 μ M), adrenalina (0.1 - 30 μ M) e colágeno (0.1 -30 μ g/ml), na ausência ou na presença de doses sub agregantes do policátion (60 - 500 nM). Verificou-se que as DE₅₀ do ADP, adrenalina e colágeno foram diminuídas quando em presença da poli-D-lisina, sendo que esta diminuição foi mais evidente com colágeno (tabela 2).

4.1.7. Envolvimento de proteoglicanos na interação entre polilisina e plaquetas

A agregação induzida por poli-L-lisina 87.4 kD (0.2 - 0.8 μ M) foi inibida de forma dose-dependente pela condroitinase AC (4 pU/ml - 400 μ U/ml; enzima responsável pela degradação do sulfato de condroitina). Condroitinase AC, nas mesmas concentrações produziu pequena inibição da agregação plaquetária induzida pelo ADP (figura 14). A pré-incubação por 3 min do PRP com 400 μ U/ml de condroitinase AC aumentou significativamente o tempo de latência para o desencadeamento da agregação máxima induzida por poli-L-lisina (175 ± 3 s e 300 ± 33 s, na ausência e na presença de condroitinase AC, respectivamente, n=5, p<0.05). A agregação induzida pelo ADP não foi significativamente alterada (225 ± 10 s e 276 ± 32 s, na ausência e na presença de condroitinase AC, respectivamente, n=4).

Heparitinase I e II (enzimas responsáveis pela degradação do sulfato de heparan e heparina) e heparinase (enzima responsável pela degradação de

heparina), em concentrações similares as da condroitinase AC, quando pré-incubadas ao PRP por um período de 3 ou 30 min, não afetaram a agregação plaquetária induzida por poli-L-lisina (122 kD). As enzimas acima, nas mesmas concentrações e tempos de incubação, também não afetaram a agregação induzida por ADP.

A figura 15 mostra uma cromatografia que traz o perfil do 4-sulfato de condroitina em PRP quando as plaquetas foram estimuladas com poli-D-lisina (75.7 kD), na presença ou na ausência de condroitinase AC (26 μ U/ml). Inicialmente notou-se que o sulfato de condroitina estava presente em ambos PPP (linha 1) e PRP (linha 2), sendo que neste último encontrou-se em concentração muito mais elevada (0.3 mg/ml e 3.48 mg/ml, respectivamente). A incubação de PRP com condroitinase AC por 3 min causou uma redução da quantidade de sulfato de condroitina (linha 3, 2.4 mg/ml). A incubação do PRP com polilisina provocou o desaparecimento do sulfato de condroitina (linha 4, 0.3 mg/ml), provavelmente devido a formação de um complexo polilisina/sulfato de condroitina e conseqüente precipitação durante a centrifugação. A incubação da condroitinase AC previamente à adição de polilisina causou resultado semelhante (linha 5, 0.24 mg/ml). A linha 6 mostra uma mistura de sulfato de condroitina, heparan e dermatan.

4.2. Plaquetas Lavadas (PL)

4.2.1. Efeito de poliaminoácidos catiônicos e aniônicos

Em plaquetas lavadas a polilisina também induziu um efeito dependente da dose e do peso molecular deste poliaminoácido (fig. 16). Entretanto, a polilisina foi significativamente mais potente em PL do que em PRP (fig. 17). O perfil do efeito da polilisina foi diferente do perfil de agregação induzida por trombina. Com a polilisina não verificamos a presença de "shape change", o

efeito observado foi imediato após a adição do poliaminoácido e a resposta máxima foi menor que aquela apresentada por trombina (fig. 18). O ácido poli-L-glutâmico (10.6, 46.2 e 74 kD) e o ácido poli-L-aspártico (28.8 kD) em concentrações que variaram de 10.8 - 75.5 μ M (n=3) não foram capazes de induzir agregação em PL.

4.2.2. *TXA₂ não participa do efeito induzido por polilisina*

Em condições onde a poli-D-lisina (105.8 kD, 1.9 μ M) e poli-L-lisina (26.5 kD, 7.6 μ M) produziram efeito máximo de $66.1 \pm 1.5\%$ (n=3) e $61.2 \pm 2.7\%$ (n=3), respectivamente, verificamos a ausência de produção de TXA₂. A incubação prévia (20 min) das PL com indometacina (10 μ M) também não modificou as respostas induzidas pelos policátions acima (tabela 3). Utilizando a trombina (200 mU/ml) como agente agregante controle em PL, verificamos que o tratamento com indometacina inibiu marcadamente a produção de tromboxano A₂ e inibiu apenas $22.6 \pm 11\%$ o efeito plaquetário (tabela 3).

4.2.3. *O efeito de polilisina independe de cálcio*

A pré-incubação de PL em meio desprovido de cálcio na ausência ou na presença de EDTA (3 mM) não alterou o efeito induzido por poli-L-lisina 289 kD (1.4 μ M), mas aboliu a agregação induzida por trombina 200 mU/ml (fig. 19).

4.2.4. *Poliânions inibem o efeito de polilisina*

O efeito induzido por poli-L-lisina 26.5 kD (7.6 μ M) em PL foi inibido de maneira dose-dependente pela pré-incubação por 3 min com o ácido poli-L-glutâmico (fig. 20). Adicionando-se ácido poli-L-glutâmico (46.2 kD) após obtenção do efeito máximo por poli-L-lisina (26.5 kD, 7.6 μ M), observamos uma inibição também de maneira dose-dependente (fig. 21).

4.2.5. Elevação dos níveis intraplaquetários de AMPc e GMPc

A pré-incubação das PL com iloprost (200 ng/ml) por 3 min aboliu a agregação induzida por trombina 200 mU/ml enquanto 5.3 μ M de iloprost não afetou o efeito induzido por poli-D-lisina 105.8 kD (1.9 μ M, n=3) (não mostrado). Igualmente, SNP (6 mM) inibiu completamente o efeito induzido por trombina 200 mU/ml, enquanto 30 mM de SNP inibiram apenas $26,7 \pm 1.7\%$ o efeito induzido por poli-D-lisina 105.8 kD (1.9 μ M, n=3) (fig. 22).

4.2.6. O papel de proteoglicanos no efeito de polilisina

Condroitinase AC (400 μ U/ml, n=3), heparinase (100 μ U/ml, n=3), heparitinase I (100 μ U/ml, n=3) e heparitinase II (100 μ U/ml, n=3) quando pré-incubadas a PL por 3 min não afetaram o efeito de polilisina. As enzimas acima, nas mesmas concentrações e tempo de incubação, também não afetaram a agregação induzida por trombina (100 mU/ml).

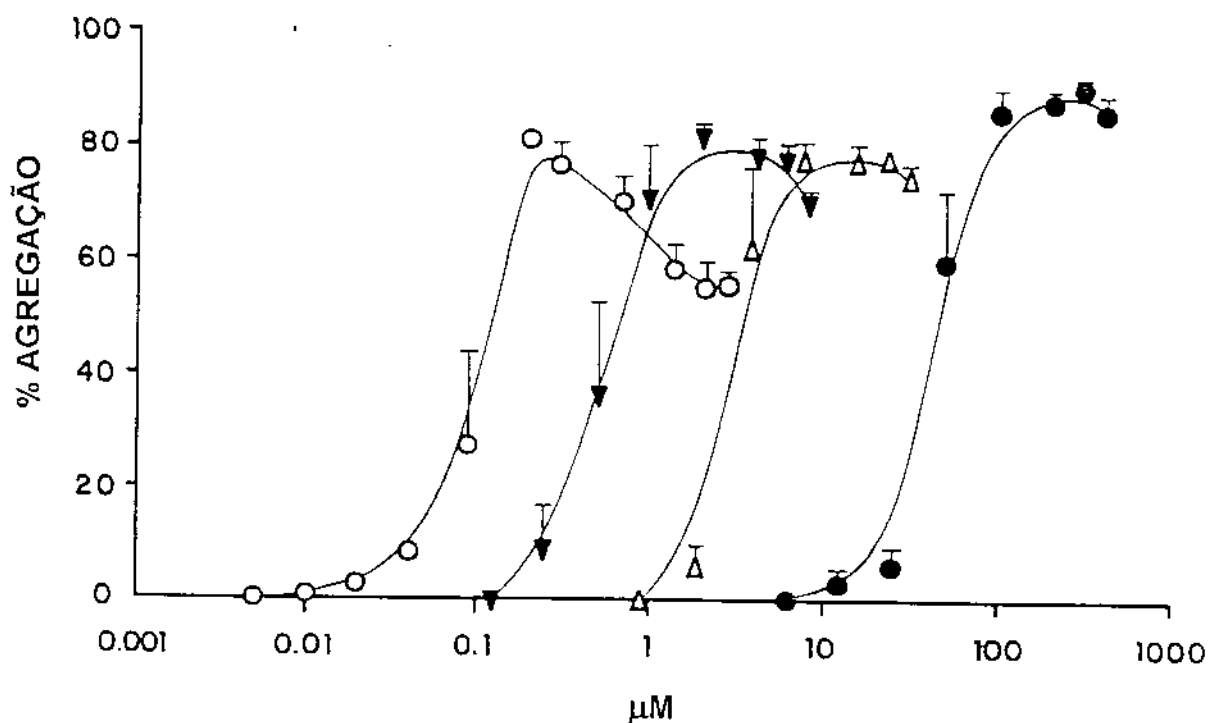


Fig. 1 - Agregação plaquetária induzida pela poli-L-lisina em PRP é dependente da concentração e diretamente proporcional ao peso molecular deste polícatión. Os círculos abertos representam a poli-L-lisina 289 kD, os triângulos fechados representam a poli-L-lisina 98 kD, os triângulos abertos representam a poli-L-lisina 26.5 kD e os círculos fechados representam a poli-L-lisina 2 kD. Cada ponto da curva representa a média de 3-5 experimentos. As barras verticais representam o erro padrão das médias.

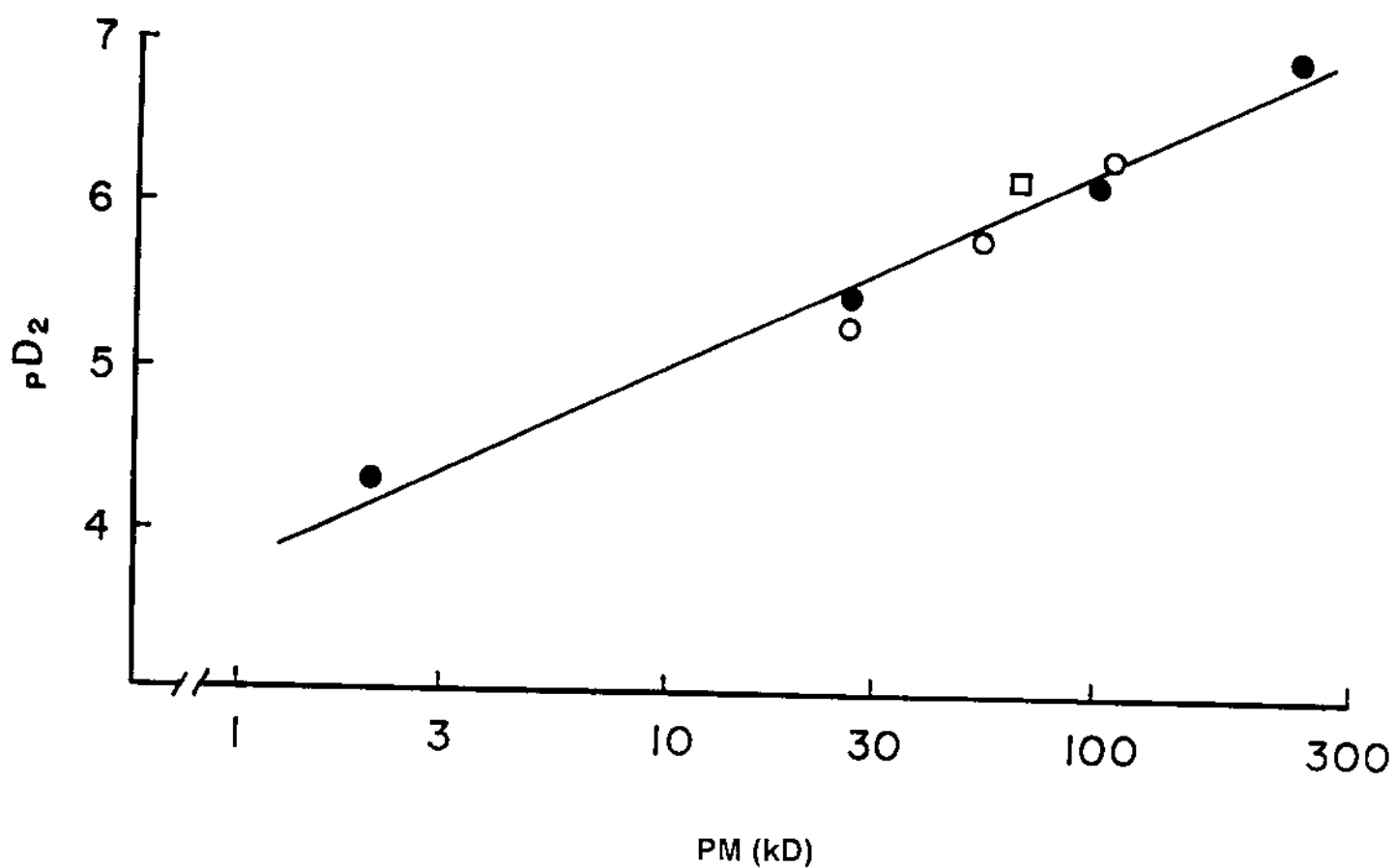


Fig 2 - A agregação plaquetária produzida por polilisinina (2, 26.5, 52.5, 64, 98, 105.8 e 289 kD) em PRP é dependente de seu peso molecular e suas formas enantiômeras são equipotentes. Os círculos fechados correspondem a forma L, círculos abertos correspondem a forma D e o quadrado aberto corresponde a forma DL.

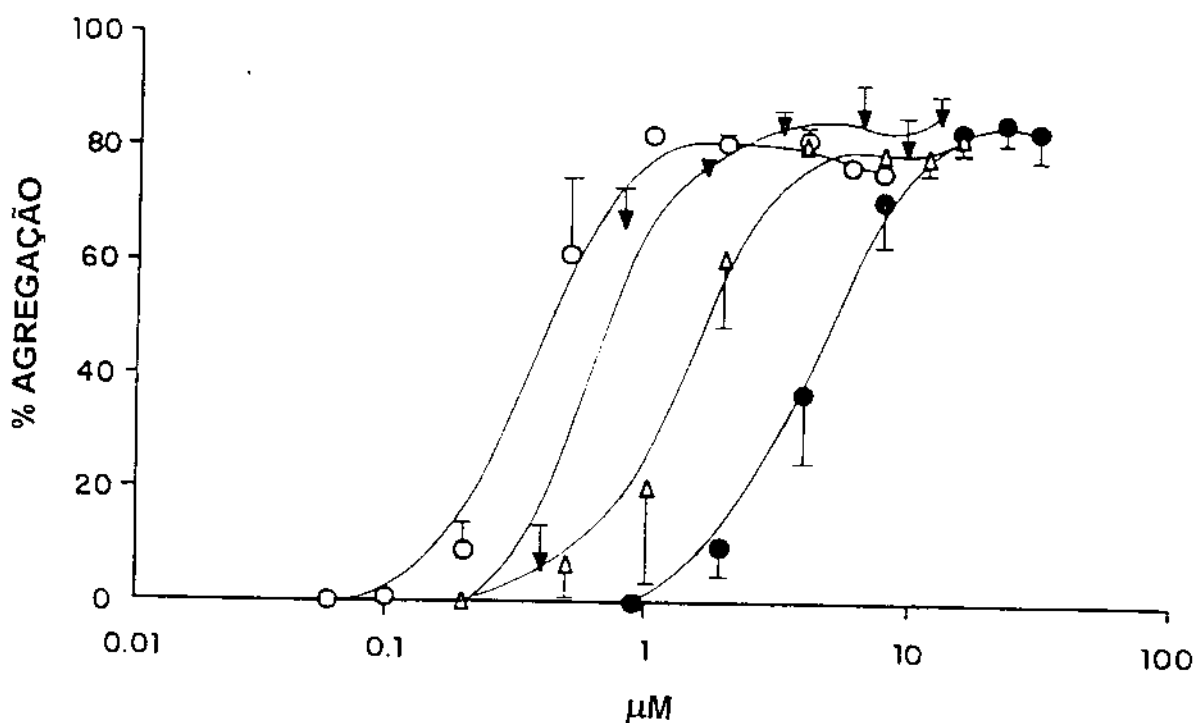


Fig. 3 - Agregação plaquetária induzida por poli-D-lisina e poli-DL-lisina em PRP é dependente da concentração e diretamente proporcional ao peso molecular do polícatión. Os círculos abertos representam a poli-D-lisina 105 kD, os triângulos fechados representam a poli-DL-lisina lisina 64 kD, os triângulos abertos representam a poli-D-lisina 52 kD e os círculos fechados representam a poli-D-lisina 26.5 kD. Cada ponto da curva representa a média de 4-7 experimentos. As barras verticais representam o erro padrão das médias.

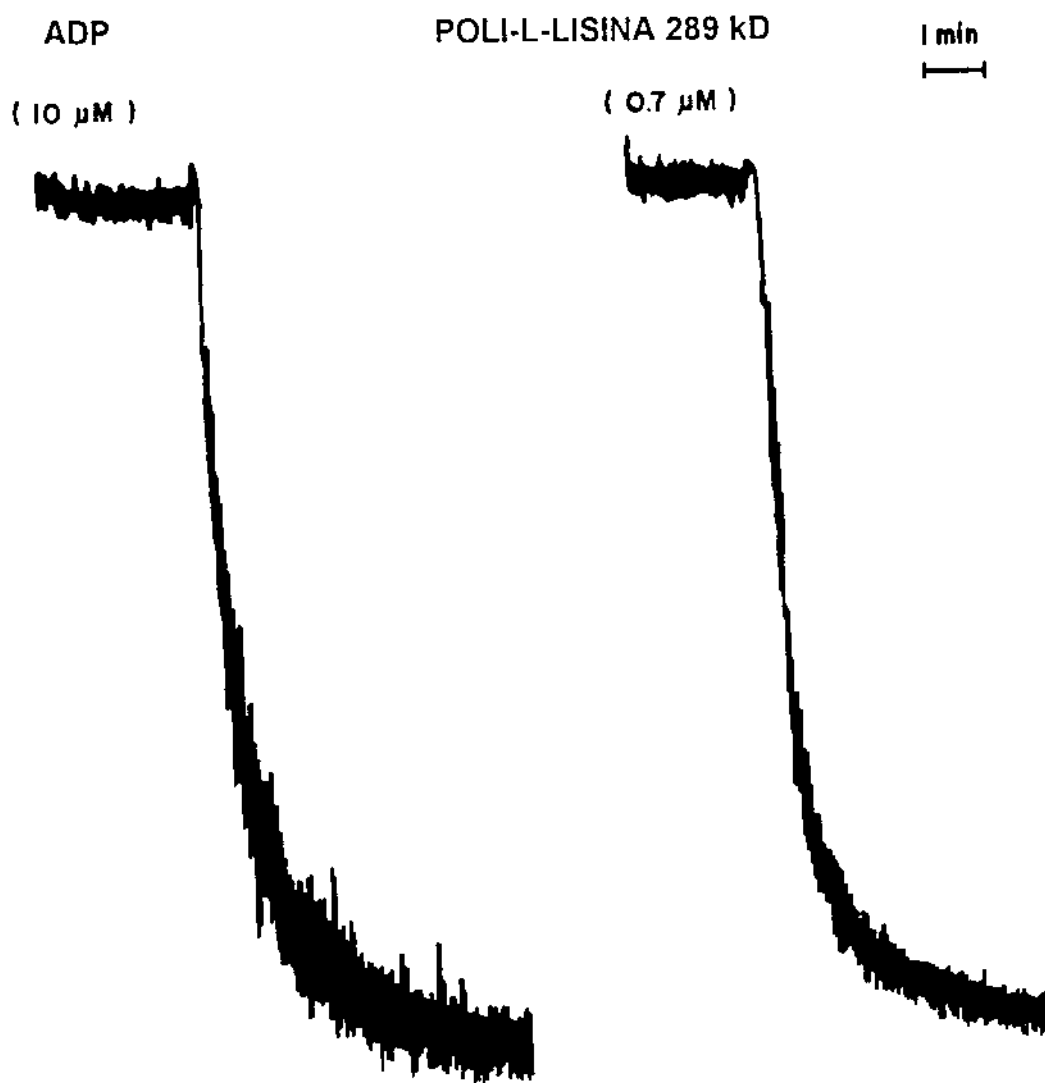


Fig. 4 - Comparação do perfil de agregação de ADP e polilisina.

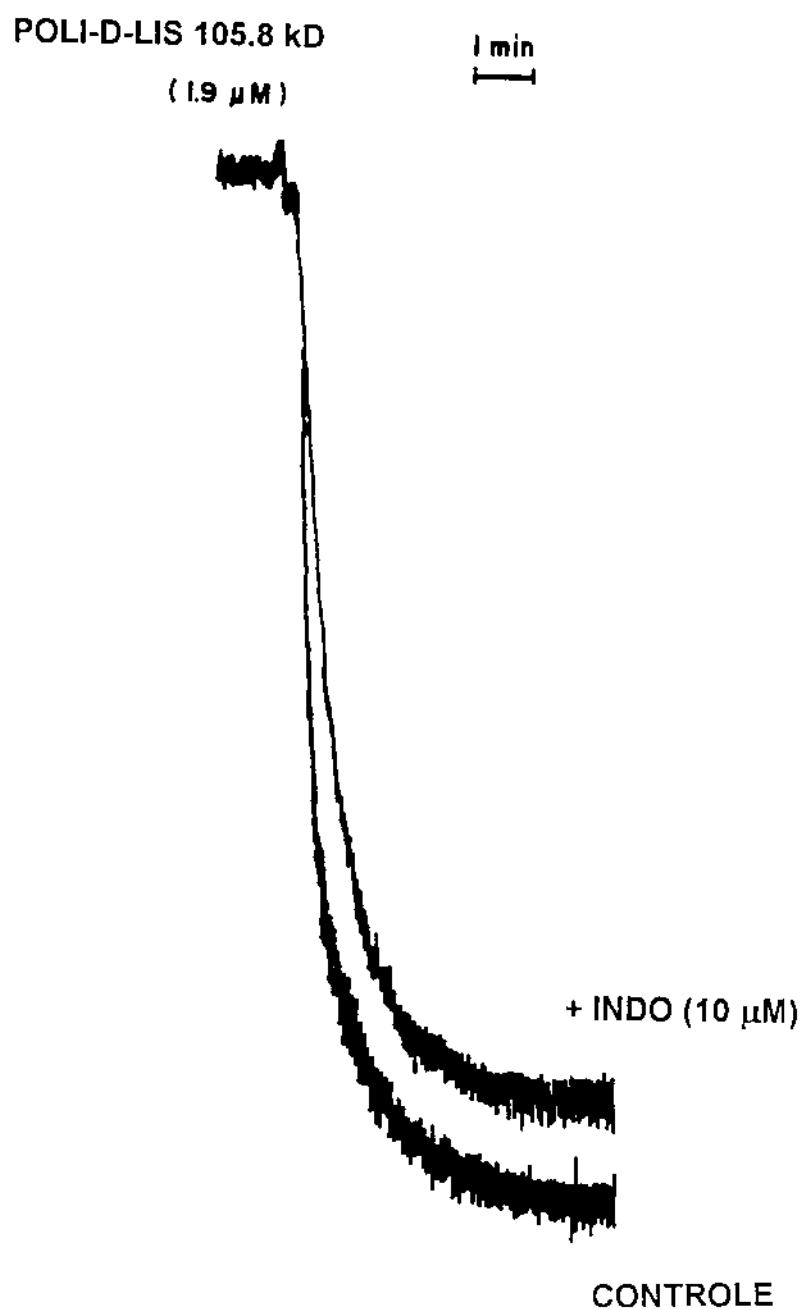


Fig 5 - A pré-incubação do PRP com 10 μ M de Indo por 20 min não afetou a agregação induzida por poli-D-lisina 105,8 kD (1.9 μ M, n=3).

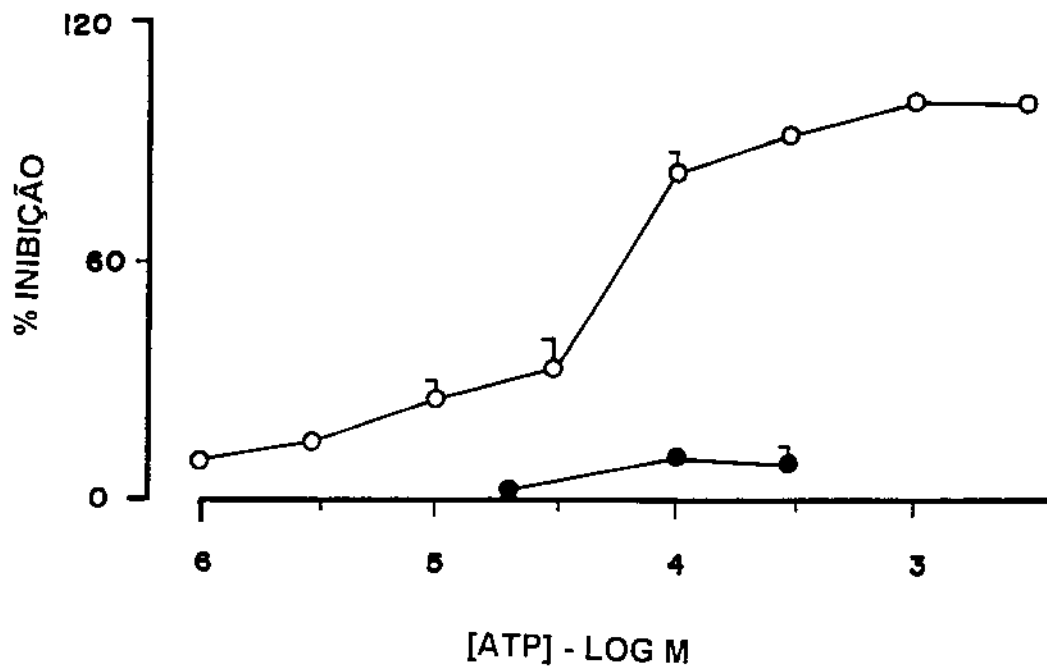


Fig 6 - ATP não inibe a agregação induzida por poli-L-lisina 87.4 kD (2.3 μ M) em PRP. O tempo de pré-incubação do ATP ao PRP foi de 3 min. Os círculos abertos e fechados representam, respectivamente, as respostas ao ADP e polilisina. As barras verticais representam o erro padrão das médias (n=4).

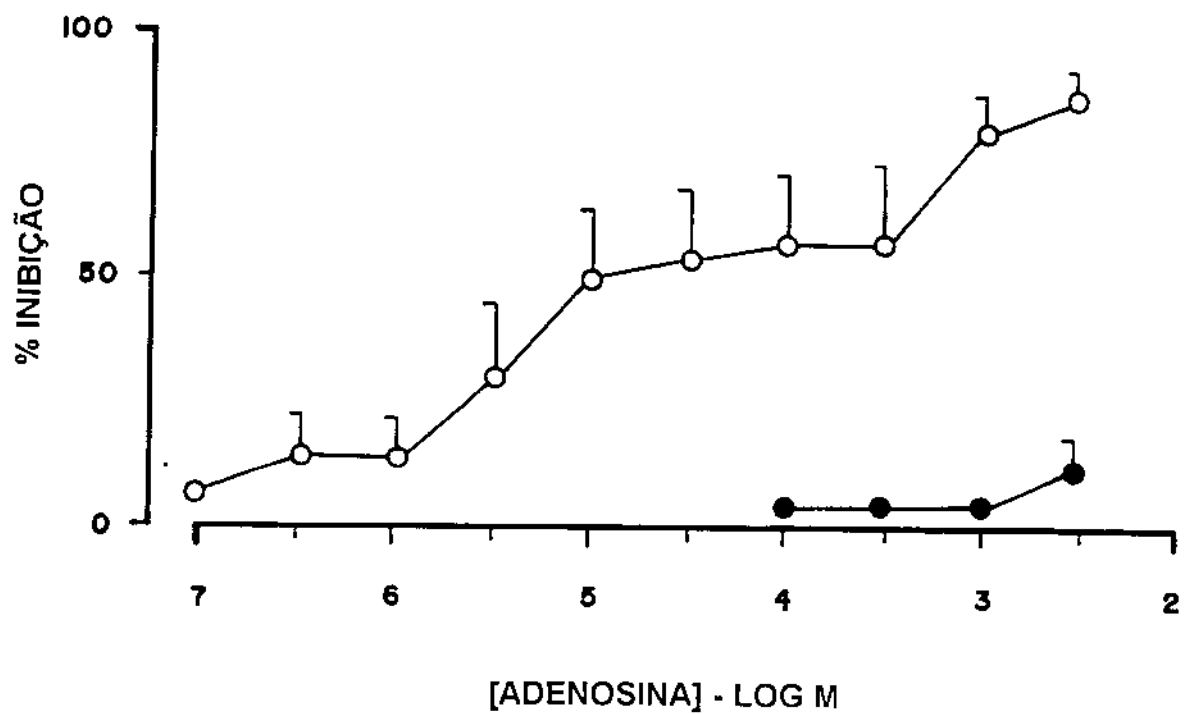


Fig 7 - Adenosina não inibe a agregação induzida por poli-L-lisina 122 kD (0.8 μ M) em PRP. O tempo de pré-incubação da adenosina foi de 3 min. Os círculos abertos e fechados representam, respectivamente, as respostas ao ADP e polilisina. As barras verticais representam o erro padrão das médias (n=3).

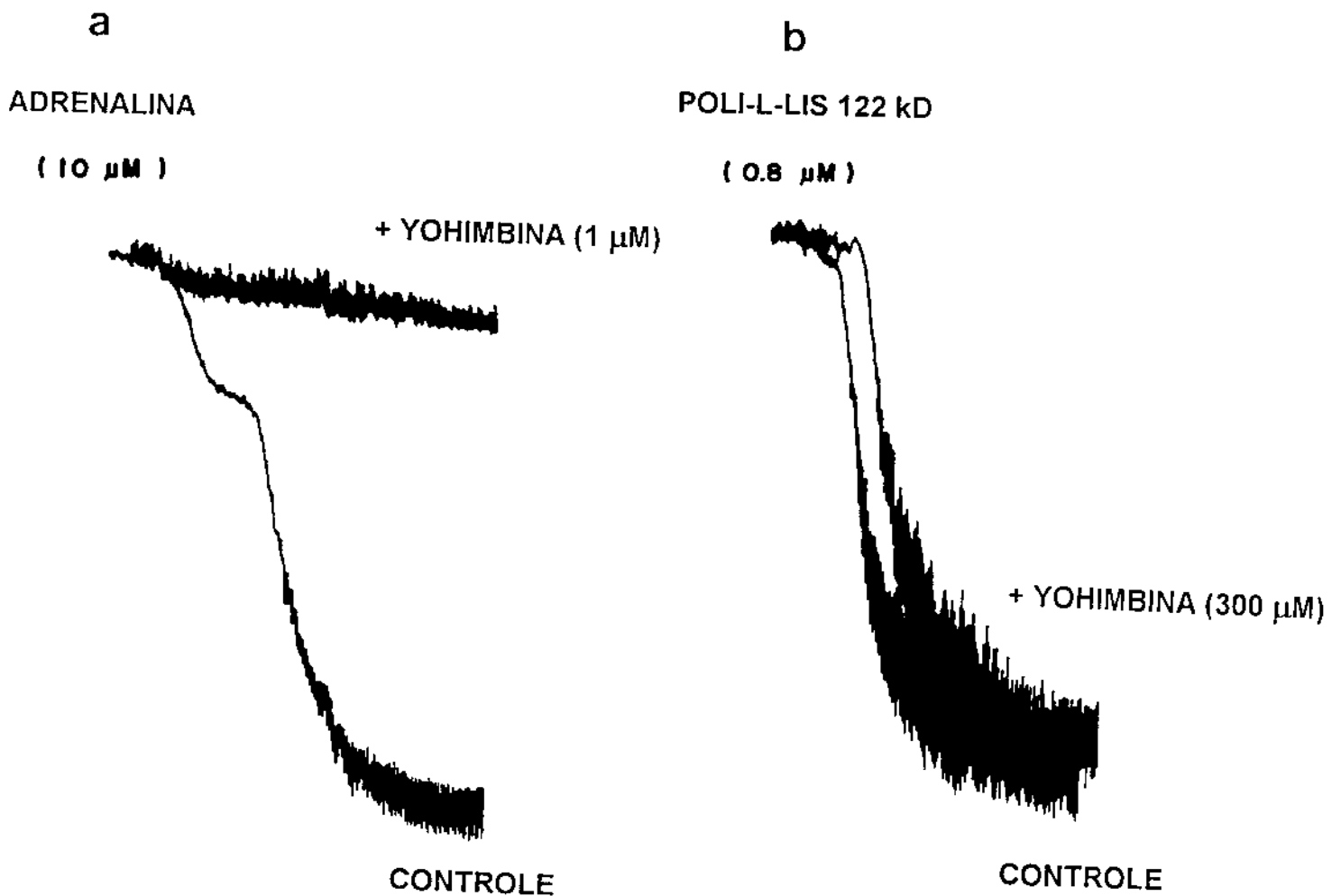


Fig 8 - Ausência de efeito de yohimbina na agregação plaquetária induzida pela polilisina. Os traçados mostram que a yohimbina (incubada por 3 min no PRP na concentração de 1 μM) aboliu a agregação induzida pela adrenalina (painel A). Quando incubada (3 min) em uma concentração de 300 μM, a yohimbina não alterou a resposta agregante induzida pela polilisina (painel B). Os traçados mostrados acima são representativos de 3 experimentos realizados.

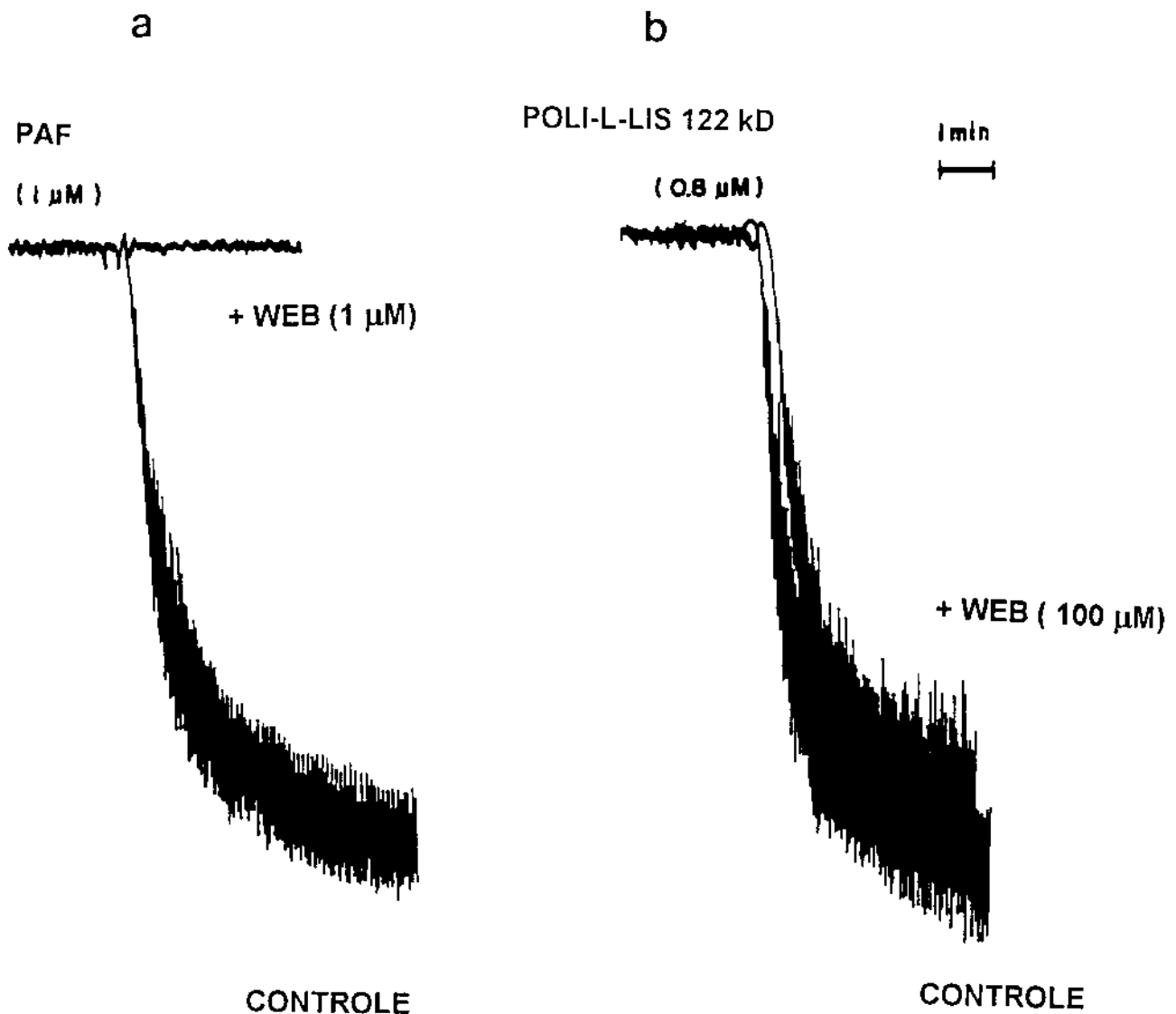


Fig 9 - Ausência de efeito do WEB 2086 na agregação plaquetária induzida pela polissina. Os traçados mostram que o WEB 2086 (incubado por 3 min no PRP em uma concentração de 1 μM) aboliu a agregação induzida pelo PAF (painel A). Quando incubada (3 min) em uma concentração de 100 μM , o WEB 2086 não alterou a resposta agregante induzida pela polissina (painel B). Os traçados mostrados acima são representativos de 3 experimentos realizados.

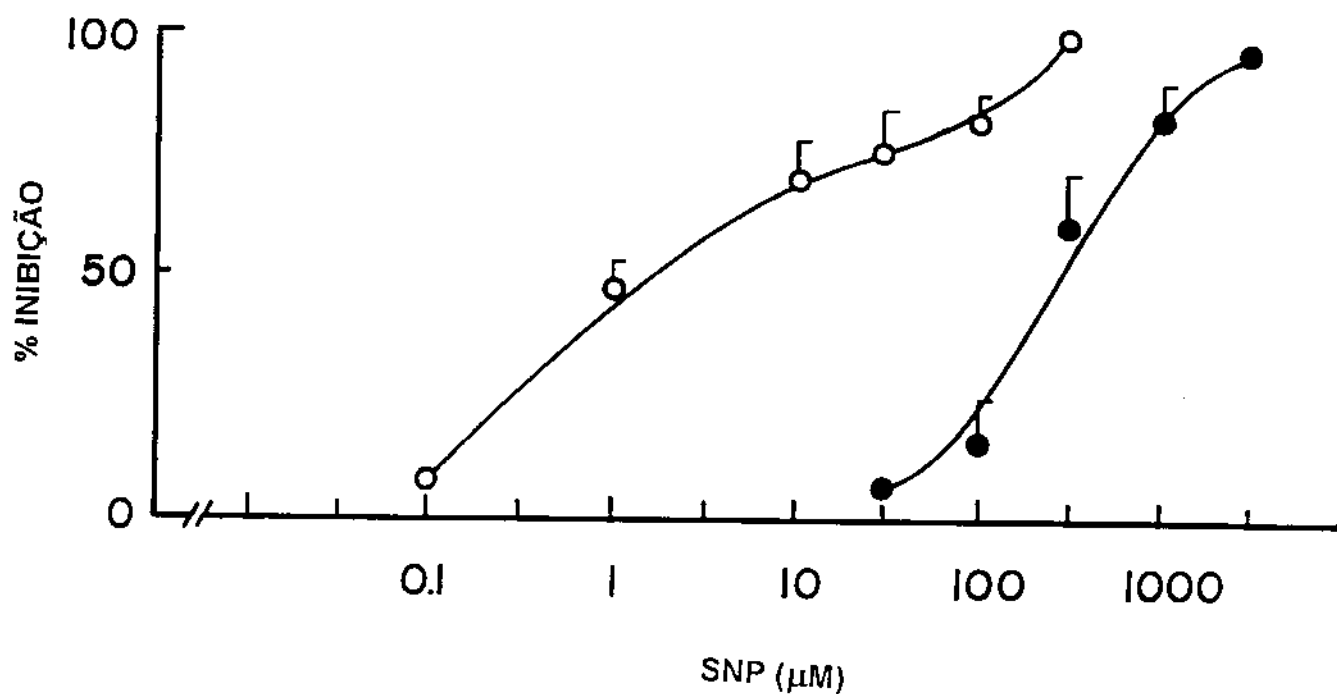


Fig. 10 - SNP inibe de maneira dose-dependente a agregação plaquetária induzida pela poli-L-lisina (98 kD, 2 μ M) e pelo ADP (10 μ M) em PRP. O tempo de pré-incubação do SNP foi de 3 min. Os círculos abertos e fechados representam, respectivamente, as respostas ao ADP e polilisina. As barras verticais representam o erro padrão das médias (n= 5-6).

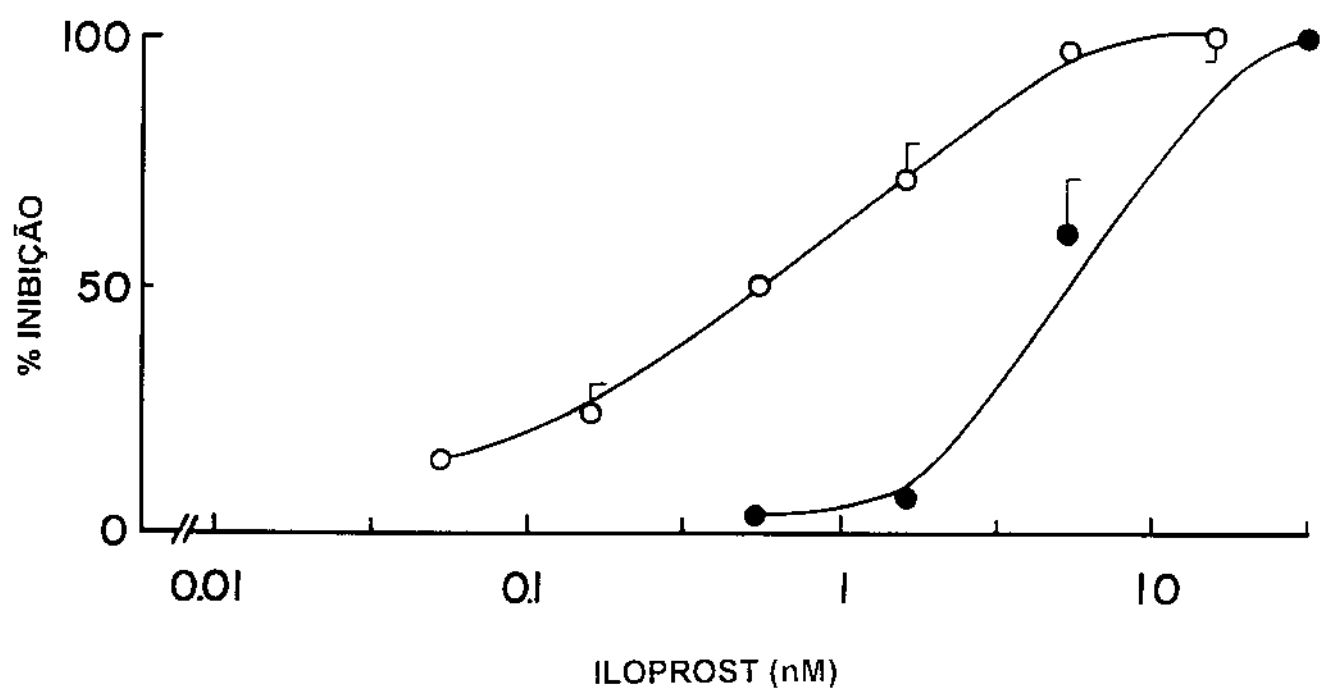


Fig. 11 - Iloprost inibe de forma dose-dependente a agregação plaquetária induzida pela poli-L-lisina (98 kD, 2 μ M) e ADP (10 μ M) em PRP. O tempo de pré-incubação do iloprost foi de 3 min. Os círculos abertos e fechados representam, respectivamente, as respostas ao ADP e polilisina. As barras verticais representam o erro padrão das médias (n=5-6).

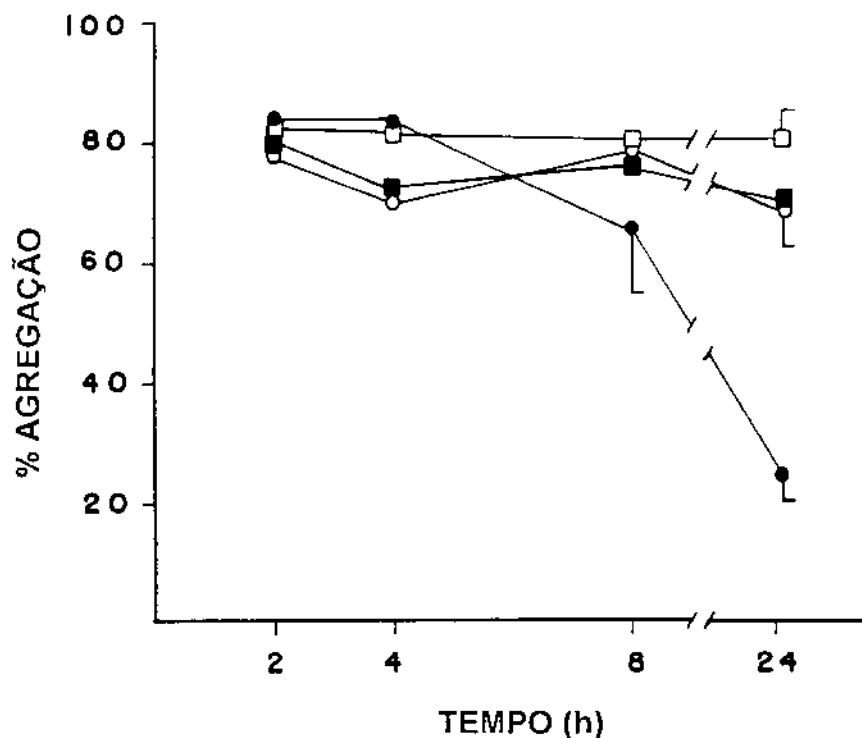


Fig 12 - A agregação induzida por ADP ($10 \mu\text{M}$) em PRP 24 h após a coleta do sangue é bastante diminuída, enquanto a agregação induzida por poli-D-lisina 105.8 kD ($1.9 \mu\text{M}$), poli-L-lisina 122 kD ($1.6 \mu\text{M}$) e poli-L-lisina 289 kD ($0.7 \mu\text{M}$) é mantida. Círculos fechados representam o ADP, círculos abertos representam poli-D-lisina 105.8 kD, quadrados abertos representam a poli-L-lisina 122 kD e os quadrados fechados representam a poli-L-lisina 289 kD. As barras verticais representam o erro padrão das médias ($n=3-11$).

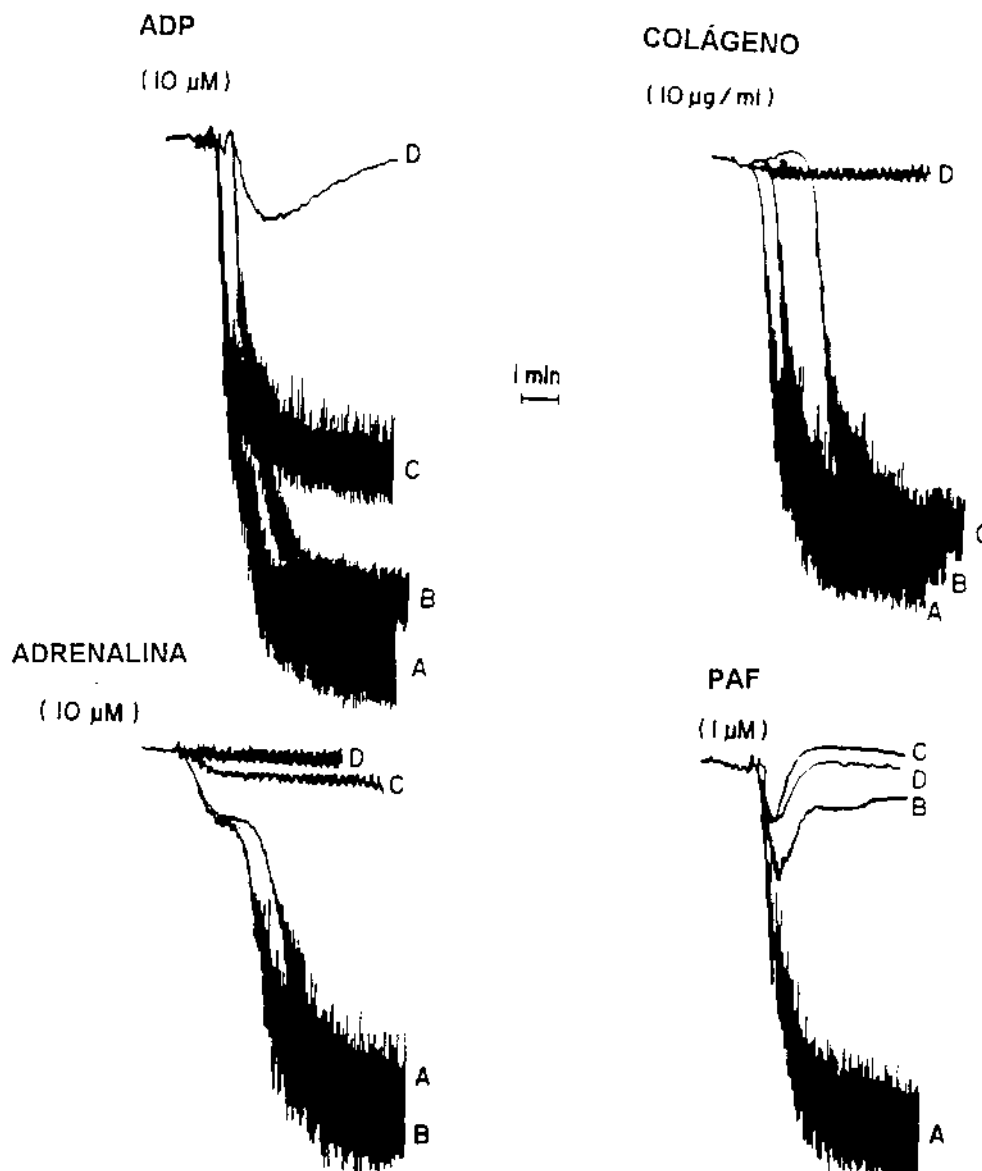


Fig 13 - Plaquetas 24 h após a coleta do sangue não são agregadas por ADP (10 μ M), colágeno (10 μ g/ml), adrenalina (10 μ M) e PAF (1 μ M). Em A temos plaquetas 2 h após coleta do sangue, em B temos plaquetas 4 h após coleta, em C temos plaquetas 8 h após coleta e em D temos plaquetas 24 h após coleta. Os traçados mostrados acima são representativos de 3-11 experimentos realizados.

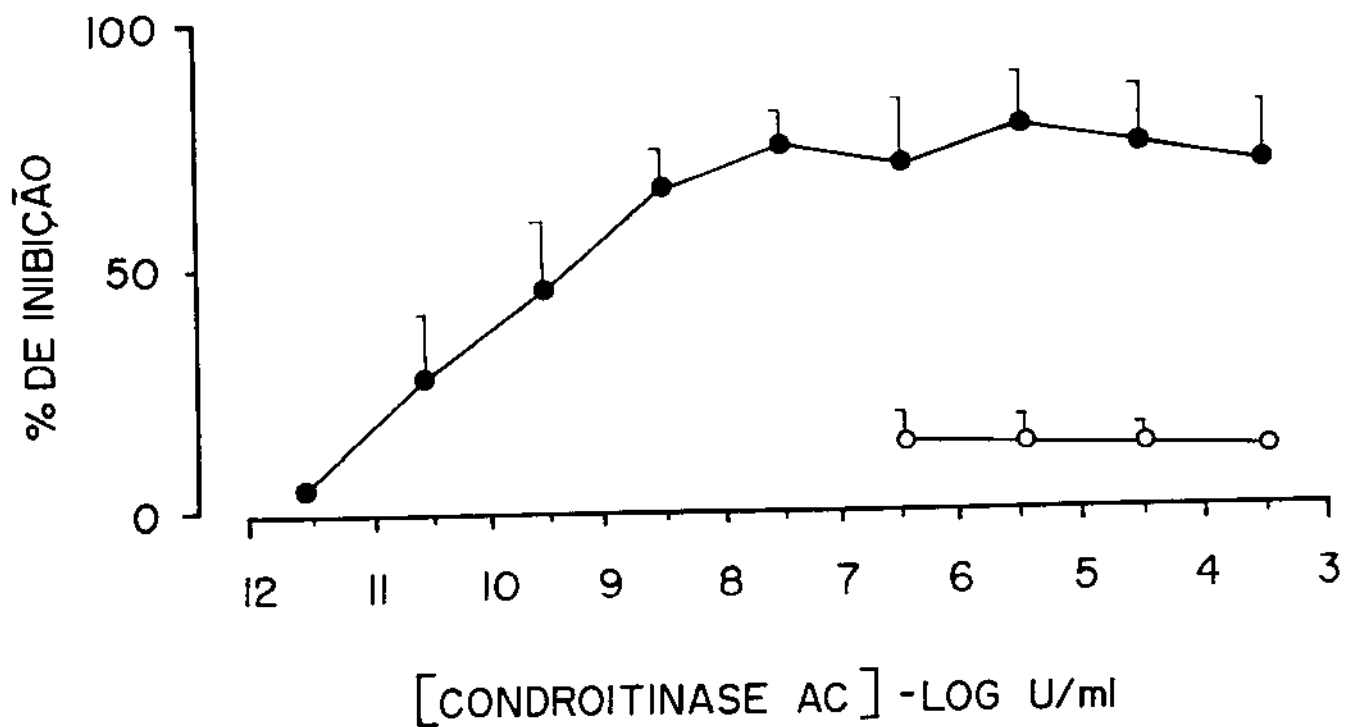


Fig 14 - Condroitinase AC inibe a agregação induzida por poli-L-lisina 87.4 kD (0.2 - 0.8 μ M) em PRP. O tempo de pré-incubação da condroitinase AC ao PRP foi de 3 min. Os círculos abertos e fechados representam, respectivamente, as respostas do ADP e polilisina. As barras verticais representam o erro padrão das médias (n=4).

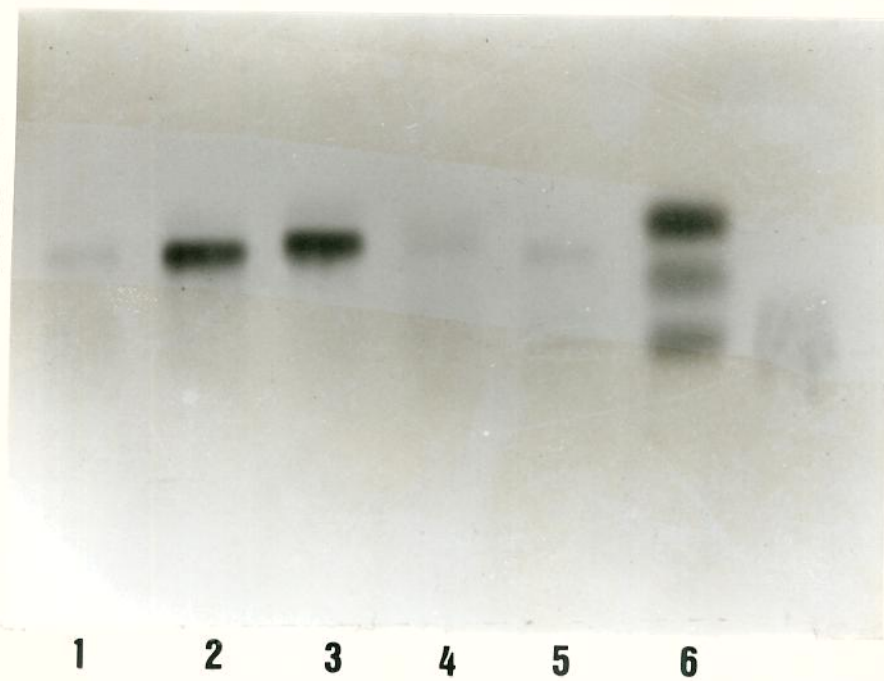


Fig. 15 - Perfil da eletroforese do 4-sulfato de condroitina em PRP quando as plaquetas foram estimuladas com poli-D-lisina (75.7 kD), na presença ou na

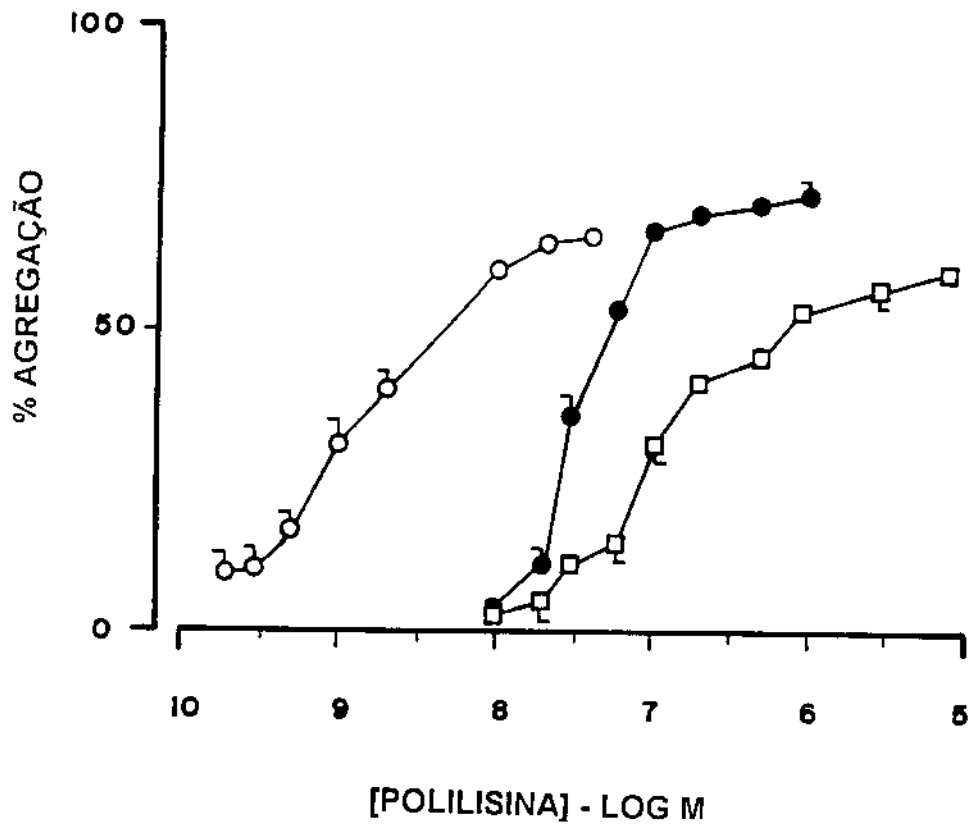


Fig. 16 - O efeito induzido por polilisina em PL é dependente da concentração e diretamente proporcional ao peso molecular do policátion. Os círculos abertos representam a poli-L-lisina 289 kD, os círculos fechados representam a poli-D-lisina 105.8 kD e os quadrados abertos representam a poli-L-lisina 26.5 kD. Cada ponto da curva representa a média de 4-7 experimentos. As barras verticais representam o erro padrão das médias.

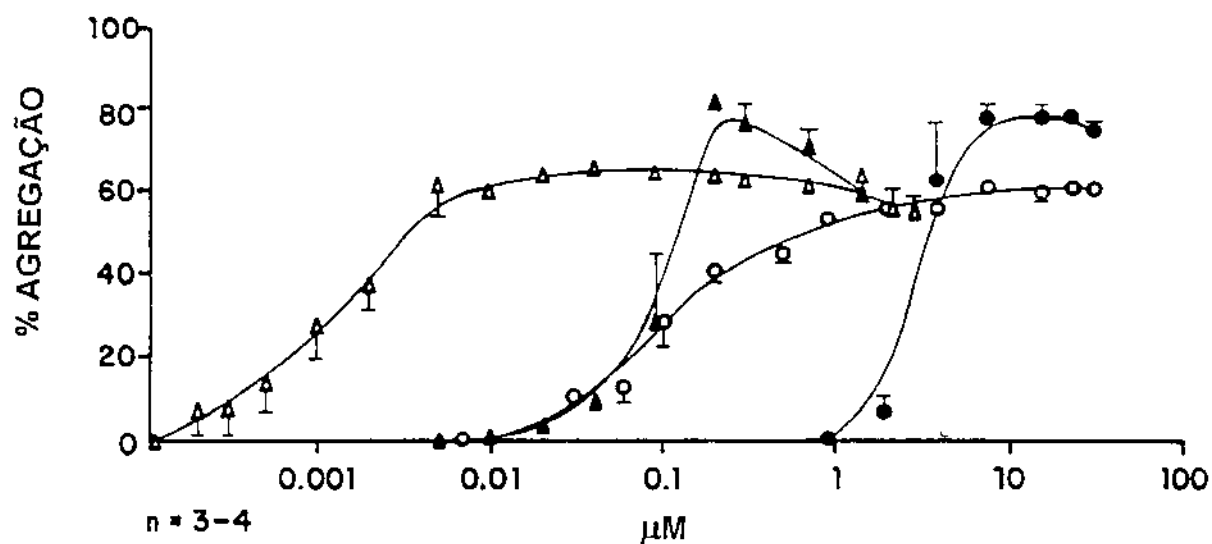
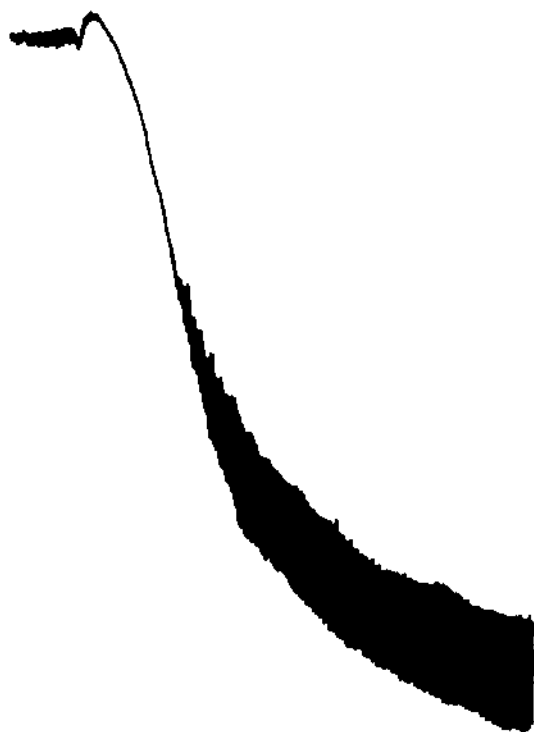


Fig. 17 - As plaquetas lavadas são mais sensíveis à polilisina do que o plasma rico em plaquetas. Os triângulos fechados representam a poli-L-lisina 289 kD em PRP enquanto os triângulos abertos representam o polícatión de mesmo peso molecular em PL. Os círculos fechados representam a poli-L-lisina 26.5 kD em PRP enquanto os círculos abertos representam o polícatión de mesmo peso molecular em PL. As barras verticais representam o erro padrão das médias (n=3-4).

TROMBINA (200 mU/ml)



POLI-L-LIS 122 kD

(0.8 μ M)

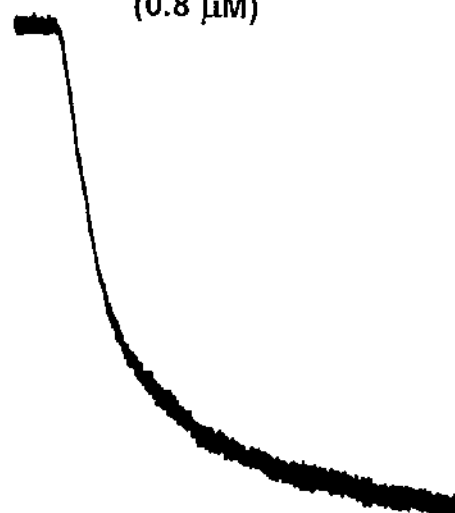


Fig 18 - Perfil do efeito de polilisina e trombina em PL

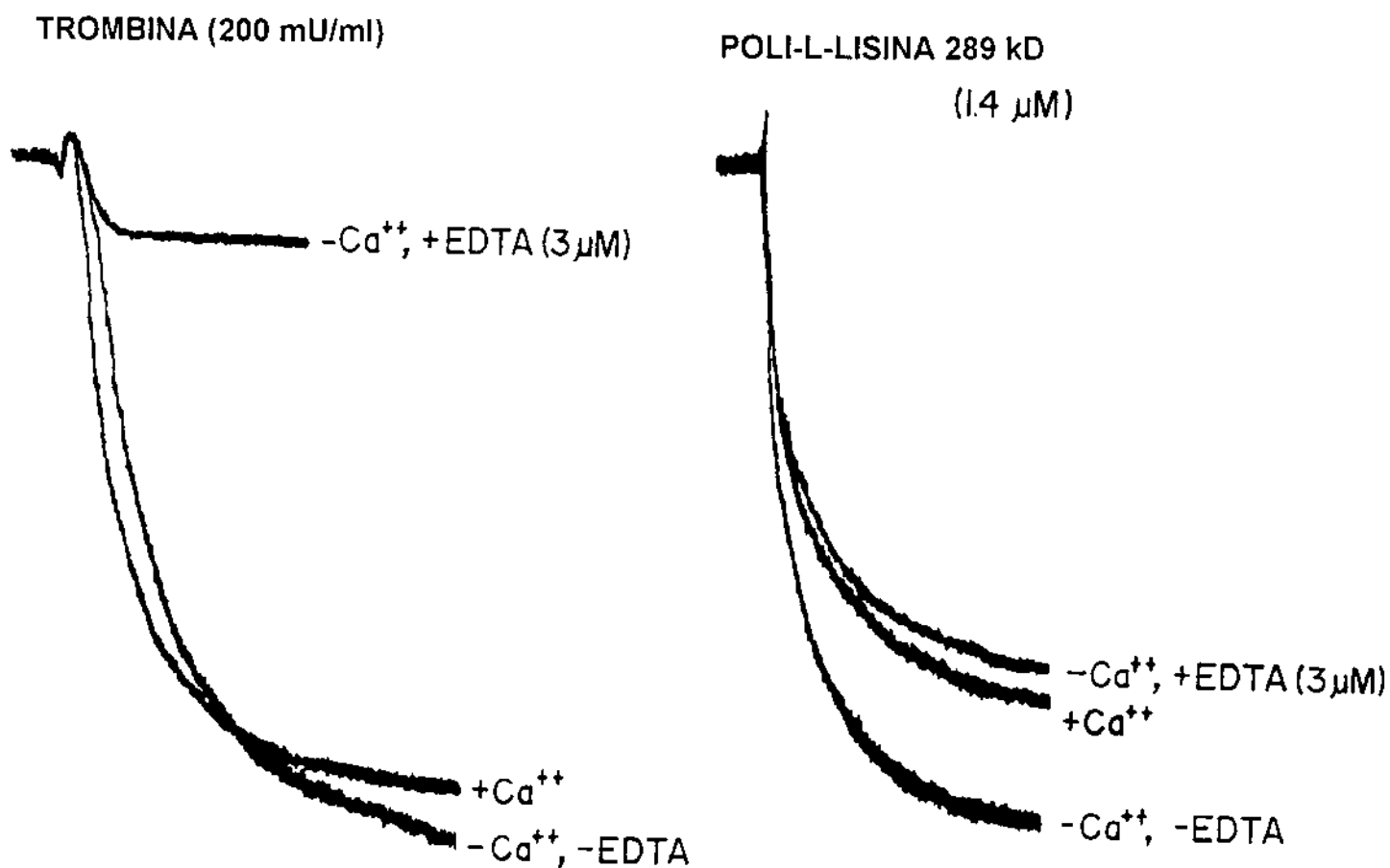


Fig. 19 - A importância do cálcio no efeito plaquetário induzido pela poli-L-lisina 289 kD (1.4 μM) e trombina (200 mU/ml) em plaquetas lavadas humanas. As plaquetas foram suspensas em solução de Krebs desprovida de cálcio (-Ca²⁺, -EDTA), ou solução de Krebs desprovida de cálcio na presença de EDTA (Ca²⁺, EDTA 3 mM). O tempo de incubação foi de 3 min. Os traçados mostrados acima são representativos de 3 experimentos realizados.

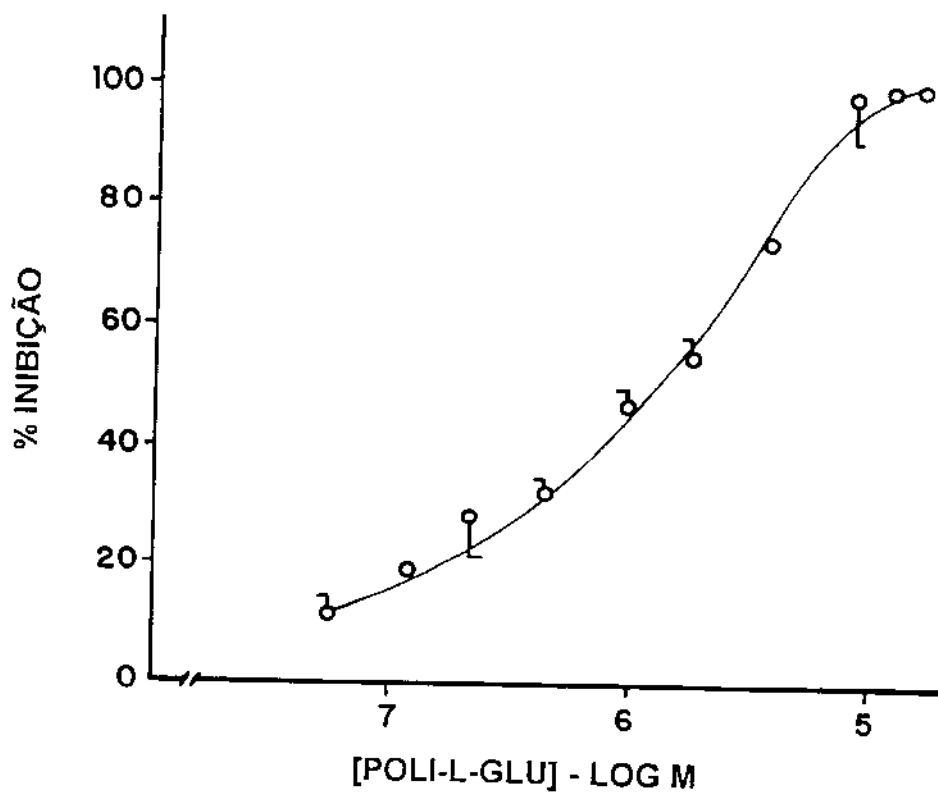


Fig. 20 - A pré-incubação do ácido poli-L-glutâmico (46.2 kD) a PL inibe de forma dose-dependente o efeito induzido pela poli-L-lisina 26.5 kD (7.6 mM). Cada ponto da curva representa a média de 3 experimentos.

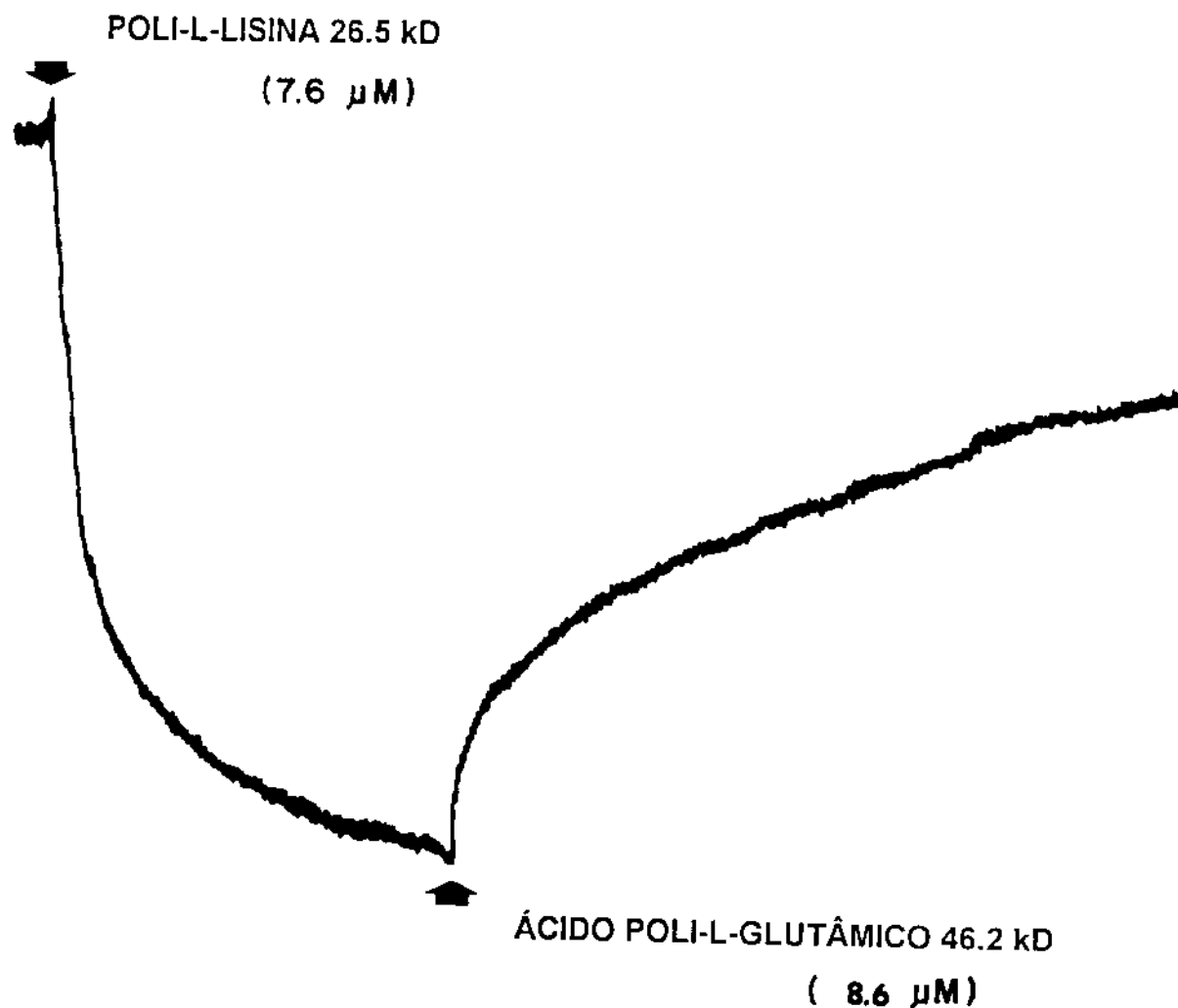


Fig. 21 - Com a adição do ácido poli-L-glutâmico 46.2 kD (8.6 μM) às plaquetas lavadas após obtenção de efeito máximo induzido por poli-L-lisina 26.5 kD (7.6 μM) observamos uma inibição total deste efeito. O traçado mostrado acima é representativo de 3 experimentos realizados.

TABELA 1. PRODUÇÃO DE TROMBOXANO A₂ DURANTE AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA INDUZIDA POR POLI-L-LISINA (26.5 kD) E POLI-D-LISINA (105.8 kD) EM PRP

Condições	Tromboxano A₂ (ng/ml)	n
Basal	1.5 ± 0.7	6
ADP (10 µM)	81.4 ± 22.6	6
Poli-L-lisina 26.5 kD (7.6 µM)	123.0 ± 15.8	3
Poli-D-lisina 105.8 kD (1.9 µM)	505.0 ± 146.8	3
ADP +Indometacina (10 µM)	0.5 ± 0.2	6
Poli-L-lisina 26.5 kD + Indometacina	0.4 ± 0.04	3
Poli-D-lisina 105.8 kD + Indometacina	0.9 ± 0.2	3

TABELA 2. EFEITO SINÉRGICO DA POLI-D-LISINA (105 kD) NA AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA INDUZIDA POR COLÁGENO, ADRENALINA E ADP

Agonista	ED ₅₀	n
ADP	1.8 ± 1.0 μM	4
ADP + poli-D-lisina	1.1 ± 0.4 μM	4
Adrenalina	2.5 ± 1.0 μM	4
Adrenalina + poli-D-lisina	1.1 ± 0.2 μM	4
Colágeno	3.8 ± 1.3 μg/ml	6
Colágeno + poli-D-lisina	1.7 ± 0.5* μg/ml	6

*, p<0.05 quando comparado com o valor correspondente

TABELA 3. POLI-L-LISINA (26.5 kD) E POLI-D-LISINA (105.8 kD) NÃO PRODUZEM TROMBOXANO A₂ EM PL

Condições	Tromboxano A₂ (ng/ml)	n
Basal	1.7 ± 0.3	6
Trombina (200 mU/ml)	87.8 ± 24.5	6
Poli-L-lisina 26.5 kD (7.6 μM)	12.1 ± 3.0	3
Poli-D-lisina 105.8 kD (1.9 μM)	3.0 ± 0.7	3
Trombina + Indometacina (10 μM)	3.5 ± 2.0	6
Poli-L-lisina 26.5kD + Indometacina	1.3 ± 0.2	3
Poli-D-lisina 105.8 kD +Indometacina	0.6 ± 0.2	3

5. DISCUSSÃO

5. 1. *Plasma rico em plaquetas*

Policátions são capazes de desencadear agregação plaquetária em plasma (Jenkins et al, 1971; Massini & Luscher, 1972; Massini et al, 1974; Guccione et al, 1976). Nossos resultados demonstraram claramente que a agregação induzida por polilisina em plasma rico em plaquetas foi dependente do peso molecular do policátion, mas não de sua forma enantiômera. Estes resultados são contrastantes com os resultados obtidos por Massini e colaboradores (1974), provavelmente por estes autores não terem levado em consideração a massa do policátion testado. Poliaminoácidos acídicos (ácido poliglutâmico e ácido poliaspártico) não induziram agregação em PRP. Estas evidências indicam a importância do conteúdo catiônico para que ocorra tal fenômeno.

À semelhança da prostaglandina PGE₁ (Guccione et al, 1976), o Iloprost e SNP também foram capazes de inibir a agregação induzida por polilisina em PRP, evidenciando que o efeito deste policátion em PRP é uma agregação, já que é uma resposta modulada pelos segundos mensageiros AMPc e GMPc.

Para reforçar esta hipótese, verificamos que polilisina também induziu a liberação de TXA₂, mostrando que a interação deste poliaminoácido com a plaqueta leva a uma ativação metabólica. Apesar de polilisina ser capaz de liberar TXA₂, assim como trombina (Smith & Willis, 1971) e PAF (Chignard et al, 1980), este metabólito da cicloxigenase não foi essencial para induzir agregação, já que a indometacina não interferiu com a agregação induzida pela polilisina. Estes resultados são contrários àqueles demonstrados por Guccione e colaboradores (1976) onde o ácido acetilsalicílico, outro inibidor da cicloxigenase, foi capaz de inibir a agregação induzida por polilisina. Apesar da agregação de polilisina ser independente de TXA₂, esta habilidade de liberá-lo

pode amplificar a resposta de outros agentes agregantes, o que pode explicar o sinergismo verificado entre ADP, adrenalina e, principalmente, colágeno e concentrações subagregantes de polilisina. É interessante notar que a agregação plaquetária induzida pelo colágeno é grandemente dependente de TXA_2 (Charo et al, 1977).

As substâncias capazes de induzir agregação plaquetária ligam-se primeiramente a um sítio específico da membrana, causando ativação metabólica da plaqueta. Assim, é pertinente acreditarmos que a polilisina atue em um sítio específico capaz de desencadear a agregação plaquetária.

Os resultados mostrando que polilisina foi capaz de agregar plaquetas em plasma após 24 h de estocagem, contrariamente a outros agonistas como ADP, PAF, adrenalina e colágeno, demonstram que dificilmente a polilisina agrega plaquetas em plasma por interação com os mesmos sítios da membrana plaquetária de ligação dos agonistas acima. Confirmando esta hipótese, temos que a adenosina, antagonista de receptores purinérgicos do tipo P_1 para ADP, assim como o ATP, antagonista de receptores purinérgicos do tipo P_2 para ADP (Gordon, 1986), não inibiram a agregação induzida por polilisina. Da mesma forma receptores de PAF e adrenalina também não estão envolvidos na agregação induzida por polilisina, pois WEB 2086 e yohimbina, antagonistas de PAF e adrenalina, respectivamente, não inibiram a agregação induzida por este polícatión. Com relação ao colágeno, sabe-se que esta substância atua em sítios não-específicos capazes de mediar a sua atividade agregante (Santoro & Cunningham, 1977). Estes sítios são representados principalmente pelas glicoproteínas Gp Ia (Santoro, 1986) e Gp IV (Tandon et al, 1989). Nossos resultados mostram, através do uso do anticorpo 6F1, que a glicoproteína Gp Ia também não é um sítio importante para a ligação de polilisina a plaqueta.

O efeito induzido por polilisina em PRP após 24 h de estocagem trata-se realmente de agregação pois esta foi acompanhada de liberação de TXA_2 e foi inibida por SNP e ILO. Este fato demonstra que, contrariamente aos receptores dos outros agonistas, este receptor para polilisina em plaquetas é muito estável.

Heparinase (degrada heparina), heparitinase I (degrada o sulfato de heparan) e heparitinase II (degrada o sulfato de heparan e a heparina) não modificaram a agregação induzida por polilisina em PRP, mostrando que estes proteoglicanos provavelmente não atuam como um "receptor" para a polilisina em plaquetas. Por outro lado, a condroitinase AC (degrada sulfato de condroitina) foi capaz de inibir significativamente a agregação induzida por polilisina em PRP. Este resultado mostra que o sulfato de condroitina é um sítio importante na interação polilisina-plaqueta. É interessante notar que este proteoglicano é responsável por 90% da quantidade de proteoglicanos presentes na membrana plaquetária (Nader, 1991). Entretanto, a agregação induzida pela polilisina não foi abolida mesmo com concentrações elevadas de condroitinase AC, indicando que, a exemplo do colágeno (Santoro & Cunningham, 1977), este polícatión deve interagir com outros sítos na membrana plaquetária, além do sulfato de condroitina.

A demonstração através da eletroforese da degradação do sulfato de condroitina em PRP da atividade da condroitinase AC reforça a hipótese que a inibição da agregação induzida pela polilisina deveu-se à remoção de sulfato de condroitina presente na membrana plaquetária. O fato de concentrações muito baixas de condroitinase AC inibirem a agregação induzida por polilisina nos leva a crer que o sulfato de condroitina tenha grande importância biológica na modulação da resposta plaquetária a este polícatión. O achado que a condroitinase AC inibe cerca de 20% da agregação induzida pelo ADP indica

que o sulfato de condroitina possa apresentar papel importante na modulação da atividade plaquetária por outros agonistas.

5.2. *Plaquetas lavadas*

Foi demonstrado que polilisina agrega plaquetas suspensas em Tyrode contendo gelatina ou albumina por formar pontes entre as plaquetas devido às suas cargas positivas (Guccione et al, 1976).

Nossos resultados demonstraram que o efeito induzido por polilisina em plaquetas lavadas também foi dependente do peso molecular do poliaminoácido, porém as concentrações utilizadas neste meio foram de 10 a 100 vezes menores que as utilizadas em PRP, provavelmente porque neste meio a polilisina pode interagir com proteínas aniônicas do plasma, diminuindo assim a concentração ativa de polilisina para desencadear a agregação.

O efeito de polilisina em PL não foi acompanhado de liberação de TXA_2 e também não foi afetado por EDTA. Estas evidências demonstram claramente que o efeito apresentado por polilisina em PL não é uma agregação, mas sim uma aglutinação, que é definida como um fenômeno onde não há participação ativa do metabolismo plaquetário e nem é dependente de cálcio (Marco et al, 1977).

Guccione e colaboradores (1976) observaram que a heparina é capaz de inibir o efeito induzido pela polilisina em PL. Isto não é surpreendente, já que a interação polication-plaqueta parece ser mediada por força eletrostática. Nossos resultados mostraram que tanto a heparina (poliânion contendo grupos SO_4^- e COO^-) como o ácido poliglutâmico (poliânion desprovido dos grupos SO_4^-) inibiram o efeito induzido pela polilisina. Isto indica que grupamentos negativos na molécula do poliânion, independente de sua natureza, são capazes de interagir com polications. Assim, grupos aniônicos estariam

neutralizando os policátions e, portanto, diminuindo a capacidade destes em causar seu efeito. Este resultado mais uma vez confirma que o efeito de polilisina em PL trata-se apenas de uma interação entre o policátion e a plaqueta e não de uma ativação, pois o poliânion consegue inibir este efeito tanto quando adicionado antes do policátion ou após o policátion ter induzido seu efeito em PL.

Em plaquetas lavadas o efeito de polilisina não foi afetado por Ilo. O SNP, em concentrações 30 vezes maiores que aquelas utilizadas para inibir a agregação induzida pela polilisina em PRP, foi capaz de inibir parcialmente o efeito de polilisina em PL. Considerando-se o fato do GMPc ter papel fundamental na adesão plaquetária (Radomski et al, 1987; Sneddon & Vane, 1988), é possível que estes resultados indiquem uma participação do GMPc na modulação de sítios aniônicos responsáveis pela aglutinação causada pela polilisina. Heparinase, heparitinase I, heparitinase II e condroitinase AC não modificaram o efeito induzido por polilisina em PL, mostrando que estes proteoglicanos não são sítios aniônicos importantes para este poliaminoácido se ligar às plaquetas. Visto que a membrana plaquetária possuem outros sítios aniônicos, tais como o ácido siálico (Bosmann, 1972), é possível que em plaquetas lavadas a polilisina interaja principalmente com este sítio. Alternativamente, glicoproteínas tais como GpIb, Gp IIb/IIIa, GpV (Hagen et al, 1976; Lawer et al, 1978), são responsáveis pelos outros sítios aniônicos da membrana plaquetária.

É importante notar que enzimas que degradam o sulfato de heparan podem ser liberadas no organismo por mastócitos (Bashkin et al, 1990), neutrófilos (Key et al, 1992), células mononucleares (Sewell et al, 1989) e plaquetas (Haimovitz-Friedman et al, 1991) quando ativados. Estes fatos levantam a interessante possibilidade destas células modularem a presença de

sítios aniônicos durante seu processo de ativação, assim como de interferirem na expressão dos mesmos por outras células. No caso da plaqueta, a alteração da carga aniônica do endotélio por ativação da mesma pode constituir-se em um mecanismo amplificador importante no processo da adesão plaquetária.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adelstein, R.S., Conti, M.A. & Barylko, B. (1978). The role of myosin phosphorylation in regulating actin-myosin interaction in human blood platelets. **Thromb. Haemost.** 40:241-244.
- Antunes, E., Mariano, M., Cirino, G., Levi, S. & de Nucci, G. (1990). Pharmacological characterization of polication-induced rat hind-paw oedema. **Br. J. Pharmacol.** 101:986-990.
- Armstrong, R.A., Jones, R.A. & Wilson, N.H. (1983). Ligand binding to thromboxane receptors on human platelets: Correlation with biological activity. **Br. J. Pharmacol.** 79:953-964.
- Ashby, B., Daniel, J.L. & Smith, B. (1990). Mechanisms of platelet activation and inhibition. **Hematology Oncology Clinics of North America.** 4:1-26.
- Ausprunk, H.D., Boudreau, C.L. & Nelson, D.A. (1981). Proteoglycans in the microvasculature. I- Histochemical localization in microvessels of the rabbit eye. **AJP.** 103:353- 366.
- Bangham, A.D., Pethica, B.A. & Seaman, (1958). G.V.P. The charged groups at the interface of some blood cells. **Biochem. J.** 69:12-19.
- Baskin, P., Razin, E., Eldor, A. & Vlodaysky, I. (1990). Degranulating mast cells secrete an endoglycosidase that degrades heparan sulfate in subendothelial extracellular matrix. **Blood.** 75:2204-2212.
- Bell, R.L. & Majerus, P.W. (1980). Thrombin-induced hydrolysis of phosphatidylinositol in human platelets. **J. Biol. Chem.** 255:1790-1796.
- Berndt, M.C., Gregory, C., Dowden, G. & Castaldi, P.A. (1986). Thrombin interactions with platelet membrane proteins. **Ann. NY Acad. Sci.** 485:374-386.

- Berndt, M.C. & Phillips, D.R. (1981). Purification and preliminary physicochemical characterization of human platelet membrane glycoprotein V. **J. Biol. Chem.** 256:59-65.
- Berridge, M.J. & Irvin, R.F. (1984). Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. **Nature.** 312:315-317.
- Billah, M.M. & Lapetina, E.G. (1982). Rapid decrease of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in thrombin-stimulated platelets. **J. Biol. Chem.** 257:12705-12708.
- Billah, M.M., Lapetina, E.G. & Cuatrecasas, P. (1980). Phospholipase A2 and phospholipase C activities of platelets. **J. Biol. Chem.** 255:10227-10231.
- Bills, T.K., Smith, J.B. & Silver, M.J. (1977). Selective release of arachidonic acid from the phospholipids of human platelets in response to thrombin. **J. Clin. Invest.** 60:1-6.
- Bishop, W.R. & Bell, R.M. (1986). Attenuation of sn-1,2-diacylglycerol second messengers. **J. Biol. Chem.** 261:12513-12519.
- Born, G.V.R. (1962). Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. **Nature.** 195:927-929.
- Bosmann, H.B. (1972). Platelet adhesiveness and aggregation. II- Surface sialic acid, glycoprotein: N-acetylneuraminic acid transferase, and neuraminidase of human blood platelets. **Biochimica et Biophysica Acta** 279:456-474.
- Brass, L.F. & Joseph, S.K. (1985). A role for inositol triphosphate in intracellular Ca^{+2} mobilization and granule secretion in platelets. **J. Biol. Chem.** 260:15172-15179.
- Brass, L.F. (1984). Ca^{+2} homeostasis in unstimulated platelets. **J. Biol. Chem.** 259:12563-12568.

- Brass, L.F., Shaller, C.C. & Belmonte, E.J. (1987). Inositol 1,4,5-triphosphate-induced granule secretion in platelets. **J. Clin. Invest.** 79:1269-1275.
- Buonassisi, V. & Colburn, P. (1982). Biological significance of heparan sulfate proteoglycans. **NYAS.** 22:76-84.
- Camussi, G., Tetta, C., Mazzucco, G., Monga, G., Roffnello, C., Alberton, M., Dellabona, P., Malavasi, F. & Vercellone, A. (1986). Platelet cationic proteins are present in glomeruli of lupus nephritis. **Kidney International.** 30:555-565.
- Cassey, P.J. & Gilman, A.G. (1988). G protein involvement in receptor-effector coupling. **J. Biol. Chem.** 263:2577-2580.
- Charo, I.F., Feinman, R.D. & Detwiler, T.C. (1977). Interrelations of platelet aggregation and secretion. **J. Clin. Invest.** 60:866-873.
- Chesney, C. M., Pifer, D.D., Byers, L.W. & Muishead, E.E. (1982). Effect of platelet-activating factor (PAF) on human platelets. **Blood.** 59:582-585.
- Chignard, M., Le-Couedic, J.P., Vargaftig, B.G. & Benveniste, J. (1980). Platelet-activating factor (PAF-acether) secretion from platelets: effect of aggregating agents. **Br. J. Hematol.** 46:455-464.
- Connolly, T.M., Lawing, W.J.Jr & Majerus, P.W. (1986). Protein kinase C phosphorylates human platelet inositol trisphosphate 5'-monoesterase, increasing the phosphatase activity. **Cell.** 46:951-958.
- Daniel, J.L., Molish, I.R., Rigmaiden, M. & Stewart, G. (1984). Evidence for a role of myosin phosphorylation in the initiation of the platelet shape change response. **J. Biol. Chem.** 259:9826-9831.
- Efferink, G.R. & Deierkauf, M. (1986). Protamine sulfate-induced enzyme secretion from rabbit neutrophils. **Inflammation.** 10:413-423.

- Ennis, M., Pearce, F.L. & Weston, P.M. (1980). Some studies on the release of histamine from mast cells stimulated with polylysine. **Br. J. Pharmacol.** 70:329-334.
- Erne, P., Mittelholzer, E. & Rogg, H. (1986). Vasodilating agents and platelet function: Intracellular free calcium concentration, cyclic nucleotides, and shape-change response. **J. Cardiovasc. Pharmacol.** 8:S102-S106.
- Feinstein, M.B., Egan, J.J. & Opas, E.E. (1983). Reversal of thrombin-induced myosin phosphorylation and the assembly cytoskeletal structures in platelets by the adenylate cyclase stimulants prostaglandin D2 and forskolin. **J. Biol. Chem.** 258:1260-1267.
- Fujimoto, T., Ohara, S. & Hawiger, J. (1982). Thrombin-induced exposure and prostacyclin inhibition of the receptor for factor VIII/von Willebrand factor on human platelets. **J. Clin. Invest.** 69:1212-1222.
- Gaarden, A., Jonsen, J. & Laland, S. (1961). Adenosine diphosphate in red cells as a factor in the adhesiveness of human blood platelets. **Nature.** 192:531-533.
- Gilman, A.G. (1984). G-proteins and dual control of adenylate cyclase. **Cell.** 36:577-579.
- Gordon, J.L. (1986). Extracellular ATP: effects, sources and fate. **Biochem. J.** 233:309-319.
- Graber, S.E. & Hawiger, J. (1982). Evidence that changes in platelet cyclic AMP levels regulate the fibrinogen receptor on human platelets. **J. Biol. Chem.** 257:14606-14609.
- Grant, J.A. & Scrutton, M.C. (1980). Positive interaction between agonists in the aggregation response of human blood platelets: Interactions between ADP, adrenaline, and vasopressin. **Br. J. Haematol.** 44:109-112.

- Grant, P.G. & Colman, R.W. (1984). Purification and characterization of a human platelet cyclic nucleotide phosphodiesterase. **Biochemistry**. 23:1801-1807.
- Guccione, M.A., Packham, M.A., Kinlough-Rathbone, R.L., Perry, D.W. & Mustard, J.F. (1976). Reactions of polylysine with human platelets in plasma and in suspensions of washed platelets. **Thromb. Haemostas.** 36:360-375.
- Hagen, I. (1972). The release of glycosaminoglycans during exposure of human platelets to thrombin and polystyrenelate particles. **Biochem. Biophys. Acta.** 273:141-148.
- Hagen, I., Olsen, T. & Solum, N.O. (1976). Studies on subcellular fractions of human platelets by the lactoperoxidase-iodination technique. **Biochim. Biophys. Acta.** 455:214-218.
- Hagiwara, M., Endo, T., Kanayama, T. & Hidaka, H. (1984). Effect of 1-(3-chloroanilino)-4-phenylphtalazine (MY-5445), aspecific inhibitor of cyclic GMP phosphodiesterase, on human platelet aggregation. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 228:467-471.
- Haimovitz-Friedman, A., Falcone, D.J., Eldor, A., Schirmmacher, V., Vlodaysky, I. & Fuks, Z. (1991). Activation of platelet heparitinase by tumor cell-derived factors. **Blood.** 78:789-796.
- Hamberg, M., Svensson, J., Wakabayashi, T. & Samuelsson, B. (1974). Isolation and structure of two prostaglandin endoperoxides that cause platelet aggregation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 71:345-349.
- Hammarstrom, S. & Falaradeau, P. (1977). Resolution of prostaglandin endoperoxide syntase and thromboxane synthase of human platelets. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 74:3691-3695.

- Harker, L. (1978). Platelet survival time: its measurement and use. **Prog. Hemost. Thromb.** 4:321-326.
- Hashimoto, K., Im, T., Tatsumi, N., Okuda, K. & Yukioka, M. (1987). Modulation of actin polymerization by 47,000 dalton protein of human platelets. **Biochem. Int.** 14:759-767.
- Hathaway, D.R., Eaton, C.R. & Adelstein, R.S. (1981). Regulation of human platelet myosin light chain kinase by the catalytic subunit of cyclic AMP-dependent protein kinase. **Nature.** 291:252-253.
- Hedman, K., Johansson, S., Vartio, T., Kjellén, L., Vaheri, A. & Hook, M. (1982). Estructure of the pericellular matrix: Association of heparan and chondroitin sulfates with fibronectin-procollagen fibers. **Cell.** 26:663-671.
- Holmsen, H. & Weiss, H.J. (1979). Secretable pools in platelets. **Annu. Rev. Med.** 30:119-130.
- Holmsen, H. (1972). The platelet: Its membrane, physiology, and biochemistry. **Clin. Haematol.** 1:235-240.
- Hook, M. (1984). Cell-surface glycosaminoglycans. **Ann. Rev. Biochem.** 53:847-869.
- Huang, E.M. & Detwiler, T.C. (1981). Characteristics of the synergistic actions of platelets. **Blood.** 57:685-689.
- Imai, A., Hattori, H., Takahashi, M. & Nozawa, Y. (1983). Evidence that cyclic AMP may regulate Ca²⁺-mobilization and phospholipases in thrombin-stimulated human platelets. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 112:693-700.
- Jenkins, C.S.P., Packman, M.A., Kinlough-Rathbone, R.L. & Mustard, J.F. (1971). Interactions of polylysine with platelets. **Blood.** 37:395-412.

- Katchalsky, A., Danon, D. & Nevo, A. (1959). Interactions of basic polyelectrolytes with the red blood cell. II- Agglutination of red blood cells by polymeric bases. **Biochimica et Biophysica Acta.** 33:120-138.
- Kawahara, Y., Yamanishi, J. & Fukazaki, H. (1984). Inhibitory action of guanosine 3',5'-monophosphate on thrombin-induced calcium mobilization in human platelets. **Thromb. Res.** 33:203-208.
- Key, N.S., Platt, J.L. & Vercellotti, G.M. (1992). Vascular endothelial cell proteoglycans are susceptible to cleavage by neutrophils. **Arterioscleros. Thromb.** 12:836-842.
- Kroll, M.H. & Schafer, A.I. (1989). Biochemical mechanisms of platelet activation. **Blood.** 74:1181-1195.
- Lawer, J.H., Slayter, H.S. & Coligan, J.E. (1978). Isolation and characterization of a high molecular weight glycoprotein from human blood platelets. **J. Biol. Chem.** 253:8609-8614.
- Lebowitz, E.A. & Cooke, R. (1978). Contractile properties of actomyosin from human blood platelets. **Thromb. Haemost.** 40:241-246.
- Lerea, K.M., Glomset, J.A. & Krebs, E.G. (1987). Agents that elevate cAMP levels in platelets decrease thrombin binding. **J. Biol. Chem.** 262:282-288.
- Li, E.H.H., Fenton, J.W. & Feinman, R.D. (1976). The role of heparin in the thrombin-antithrombin III reaction. **Arch. Biochem. Biophys.** 175:153-159.
- Lindahl, V. & Hook, M. (1978). Glycosaminoglycans and their binding to biological macromolecules. **Ann. Rev. Biochem.** 47:385-417.
- Linhardt, R.J., Turnbull, J.E., Wang, H.M., Loganathan, D. & Gallagher, J.T. (1990). Examination of the substrate specificity of heparin and heparan sulfate lyases. **Biochem.** 29:2611-2617.

- Loeb, L. & Gross, R. (1986). Identification and purification of sheep platelet phospholipase A₂ isoforms. **J. Biol. Chem.** 261:10467-10470.
- Loscalzo, J. (1985). N-acetylcysteine potentiates inhibition of platelets aggregation by nitroglycerin. **J. Clin. Invest.** 76:703-708.
- Marco, L. (1977). The effect of heparin on the interaction of factor VIII and human platelets in vitro. **Haemostasis** 6:163-170.
- Marcus, A.J., Ullman, H.L. & Safier, L.B. (1969). Lipid composition of subcellular particles of human blood platelets. **J. Lipid Res.** 10:108-111.
- Massini, P. & Luscher, E.F. (1972). On the Mechanism by which cell contact induces the release reaction of blood platelets; the effect of cationic polymers. **Thromb. Diathes. Haemorrh.** 27:121-133.
- Massini, P., Metcalf, L.C., Naf, V. & Luscher, E.F. (1974). Induction of aggregation and of the release reaction in human platelets by polylysine. **Haemostasis** 3:8-19.
- Meyer, K. (1938). The chemistry and biology of mucopolysaccharides and glycoproteins. **Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.** (1938). 6:91-96.
- Mills, D.C.B. & Smith, J.B. (1972). The control of platelet responsiveness by agents that influence cyclic AMP levels. **Ann. NY Acad. Sci.** 201:391-399.
- Moncada, S. & Korbet, R. (1978). Dipyridamole and other phosphodiesterase inhibitors act as antithrombotic agents by potentiating endogenous prostacyclin. **Lancet** 1:1286-1288.
- Moncada, S., Gryglewski, R., Bunting, S. & Vane, J.R. (1976). An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. **Nature** 263:663-665.

- Nader, H.B. (1991). Characterization of a heparan sulfate and a peculiar chondroitin 4-sulfate proteoglycan from platelets. **J. Biol. Chem.** 266: 10518-10523.
- Nakashima, S., Tohmatsu, T. & Hattori, H. (1986). Inhibitory action of cyclic GMP on secretion, polyphosphoinositide hydrolysis and calcium mobilization in thrombin-stimulated human platelets. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 135: 1099-1104.
- Nishikawa, M. Tanaka, T. & Hidaka, H. (1980). Ca²⁺-calmodulin-dependent phosphorylation and platelet secretion. **Nature** 287:863-865.
- Nurden, A.T. & Caen, J.P. (1975). Specific roles for platelet surface glycoproteins in platelet function. **Nature** 255:720-722.
- O'Brien, J.R. (1963). Some effects of adrenaline and anti-adrenaline compounds on platelets *in vitro* and *in vivo*. **Nature** 200:763-764.
- O'Rourke, F.A., Halenda, S.P. & Zavoico, G.B. (1985). Inositol 1,4,5-trisphosphate releases Ca²⁺ from a Ca²⁺-transporting membrane vesicle fraction derived from human platelets. **J. Biol. Chem.** 260:956-960.
- Okumura, T.A. & Jamieson, G.A. Platelet glycoalbumin. I. (1976). Orientation og glycoproteins of platelet surface. **J. Biol. Chem.** 251:5944-5949.
- Palmer, R.M.J., Ferrige, A.G. & Moncada, S. (1987). Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature** 327:524-526.
- Purdon, A.D. & Smith, J.B. (1985). Turnover of arachidonic acid in the major diacyl and ether phospholipids of human platelets. **J. Biol. Chem.** 260:12700-12704.
- Radomski, M.W. & Moncada, S. (1983). An improved method for washing human platelets with prostacyclin. **Thromb. Res.** 30:383-389.

- Radomski, M.W., Palmer, R.M.J. & Moncada, S. (1987). Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium. **Lancet.** 2:1057-1058.
- Radomski, M.W., Palmer, R.M.J. & Moncada, S. (1990). An L-arginine to nitric oxide pathway in human platelets regulates aggregation. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 87:5193-5197.
- Rosemberg, R.D. & Damus, P.S. (1973). The purification and mechanism of action of human antithrombin-heparin cofactor. **J. Biol. Chem.** 248:6490-6505.
- Rosenberg, S., Stracher, A. & Lucas, R.C. (1981). Isolation and characterization of actin and actin-binding protein from human platelets. **J. Cell Biol.** 91:201-211.
- Roskam, J., Hugues, J. & Bounameaux, Y. (1959). The part played by platelets in the formation of an efficient hemostatic plug. **Thromb. Diath. Haemorrh.** 3:510-516.
- Salmon, J.A. (1978). A radioimmunoassay for 6-keto-prostaglandin F_{1a1}pha. **Prostaglandins** 15:383-397.
- Samuelsson, B., Goldyne, M., Granstrom, E., Hamberg, M., Hammarstrom, S. & Malmsten, C. (1978). Prostaglandins and thromboxanes. **Ann. Rev. Biochem.** 47:997-1029.
- Santana, A., Hyslop, S., Antunes, E., Mariano, M., Bakhle, N., & Nucci, G. (1993). Inflammatory responses induced by poly-L-arginine in rat lungs in vivo. In press **Agents Actions**.
- Santoro, S.A. & Cunningham, L.W. (1977). Collagen-mediated platelet aggregation. Evidence for multivalent interactions of intermediated specificity between collagen and platelets. **J. Clin. Invest.** 60:1054-1060.

- Santoro, S.A., (1986). Identification of a 160.000 dalton platelet membrane protein that mediates the initial divalent cation-dependent adhesion of platelets to collagen. **Cell** 46:951-958.
- Sewell, R.F., Brenchley, P.E.C. & Mallick, N.P. (1989). Human mononuclear cells contain an endoglycosidase specific for heparan sulphate glycosaminoglycan demonstrable with the use of a specific solid-phase metabolically radiolabelled substrate. **J. Biochem.** 264:777-783.
- Shattil, S.J. & Brass, L.F. (1987). Induction of the fibrinogen receptor on human platelets by intracellular mediators. **J. Biol. Chem.** 262:992-1000.
- Shukla, S.D. (1985). Platelet activating factor-stimulated formation of inositol trisphosphate in platelets and its regulation by various agents including Ca²⁺, indomethacin, CV-3988 and forskolin. **Arch. Biochem. Biophys.** 240:674-681.
- Simionescu, M., Simionescu, N., Silbert, J.E. & Palade, G.E. (1981). Differentiated microdomains on the luminal surface of the capillary endothelium. II- Partial characterization of their anionic sites. **J. Cell. Biol.** 90:614-621.
- Skutelsky, E., Rudich, Z. & Danon, D. (1975). Surface charge properties of the luminal front of blood vessel walls: an electron microscopical analysis. **Thromb. Res.** 7:623-634.
- Smith, J.G. & Willis, A.L. (1971). Aspirin selectively inhibits prostaglandin production in human platelets. **Nature** 231:235-237.
- Sneddon, J.M. & Vane, J.R. (1988). Endothelium-derived-relaxing factor reduces platelet adhesion to bovine endothelium cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 85:2800-2804.
- Suzuki-Nishimura, T., Sekino, H., Yoshino, Y., Nagaya, K., Oku, N., Nango, M. & Uchida, K.M. (1989). Synthetic polycations, polyethylenimines and

- polyallylamines release histamine from rat mast cells. **Japan. J. Pharmacol.** 51:279-290.
- Takai, Y., Kaibuchi, K., Matsubara, T. & Nishizuka, Y. (1981). Inhibitory action of guanosine 3',5'-monophosphate on thrombin-induced phosphatidylinositol turnover and protein phosphorylation in human platelets. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 101:61-67.
- Tandon, N.N., Kralish, V. & Jamielson, G.A. (1989). Identification of glycoprotein IV (CD36) as a primary receptor for platelet-collagen adhesion. **J. Biol. Chem.** 264:7576-7583.
- Tetta, C., Coda, R. & Camussi, G. (1985). Human platelet cationic proteins bind to rat glomeruli, induce loss of anionic charges and increase glomerular permeability. **Agents Actions** 16:24-26.
- Tollefsen, D.M., Feagler, R.J. & Majerus, P.W. (1974). The binding of thrombin to the surface of human platelets. **J. Biol. Chem.** 249:2646-2651.
- Waldman, R., Nieberding, M. & Walter, U. (1987). Vasodilator-stimulated protein phosphorylation in platelets is mediated by cAMP- and cGMP-dependent protein kinases. **Eur. J. Biochem.** 167:441-448.
- Wight, T.N. & Ross, R.J. (1975). Proteoglycans in primate arteries. I- Ultrastructural localization and distribution in the intima. **Cell Biol.** 67:675-686.
- Wilner, G.D., Nossel, H.L. & LeRoy, E.C. (1968). Aggregation of platelets by collagen. **J.Clin. Invest.** 47:2616-2621.
- Wright, J.T. (1906). The origin and nature of blood platelets. **Boston Med. Surg. J.** 154:643-646.
- Zucker-Franklin, D. (1969). Microfibrils of blood platelets: Their relationship to microtubules and the contractile protein. **J. Clin. Invest.** 48:165-171.

SUMMARY

The aim of this thesis was to pharmacologically characterize the platelet aggregation induced by polylysine, a polyamino acid, in human platelet-rich plasma (PRP) and in washed platelets (WP) and to examine the importance of cell membrane anionic sites in mediating the responses to this polycation.

Platelet aggregation was monitored using a two-channel Payton or a one-channel Chrono-Log aggregometer. The release of TXA₂ by stimulated platelets was quantified by measuring the levels of its degradation product TXB₂ using an appropriate radioimmunoassay. The platelet membrane chondroitin sulfate profile was determined by agarose gel electrophoresis.

In PRP, polylysine induced a concentration- and molecular weight-dependent aggregation which was accompanied by the release of TXA₂ and was inhibited by sodium nitroprusside (SNP) and iloprost. Antagonists to platelet receptors for ADP, adrenaline, collagen and platelet activating factor (PAF) had no influence on the aggregation induced by polylysine.

In WP, the aggregation induced by polylysine was also dependent on the polycation molecular weight. This response was not inhibited by EDTA or iloprost but was partially inhibited by SNP. There was no accompanying formation of TXA₂. Polyanions such as polyglutamic acid inhibited or reversed the action of polylysine when added before or after the polycation, respectively.

Neither the aggregation induced by polylysine in PRP nor the response induced in WP was modified by preincubation of the platelets with heparinase, heparitinase I or heparitinase II. In contrast, chondroitinase dose-dependently inhibited the aggregation in PRP but had no effect on the response in WP.

These results suggest that polylysine induces aggregation in PRP but not in WP. The aggregation in PRP is due to the cationic charge of the polycation

and depends, at least in part, on the presence of chondroitin sulfate in the platelet membrane. In WP, the agglutination induced by polylysine does not involve an interaction with chondroitin sulfate. These observations indicate that chondroitin sulfate may function as a type of platelet membrane receptor since the electrostatic interaction of a polycation such as polylysine can lead to metabolic activation of these cells. The expression of anionic sites on the surface of the platelet membrane could therefore be a means by which the platelet regulates its responsiveness to a variety of agonists.