

1522

MECANISMO ADRENÉRGICO DA FUNÇÃO PLAQUETÁRIA (*)

Efeito do Verapamil e da Fentolamina

DR. OTONI M. GOMES (**)
DRA. LYDIA U. YOSHIDA (***)
DR. ROBERTO R. PANDO SERRANO (****)
DR. NELSON L. T. BARROS MORAES (*****)
DR. BERILO LANGER (*****)
DR. FRANCISCO ANTONÁSCIO (*****)
DR. RUY V. G. DO AMARAL (*****)
DR. E. J. ZEBINI (*****)

Em amostras sanguíneas obtidas de doadores humanos, voluntários, estudou-se o efeito do verapamil e da fentolamina na agregação plaquetária. Os resultados obtidos demonstram importante inibição plaquetária pelas drogas testadas e possibilitam as seguintes interpretações farmacodinâmicas principais:

a - a agregação plaquetária induzida pelo ADP provavelmente também inclua mecanismo adrenérgico por α — receptores.

b - a liberação de ADP para iniciar a agregação plaquetária pela adrenalina ou completar aquela iniciada pelo ADP exógeno também inclui fenômeno de inibição enzimática ou da mobilização de cálcio.

As plaquetas contribuem para o processo de coagulação adsorvendo fatores em sua superfície liberando, quando ati-

(*) Trabalho realizado no Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

(**) Docente-Livre de Clínica Cirúrgica.

(***) Bioquímica.

(****) Médico-estagiário.

(*****) Interno.

(*****) Professor-Assistente-Doutor.

(*****) Docente-Livre de Anestesiologia. Especialista S.B.A.

(*****) Prof. Titular, Chefe do Departamento de Cirurgia.

AP1919

vadas fosfolipídio pró-coagulante, conhecido como Fator III. No entanto, o papel mais importante dos trombocitos na hemostasia provavelmente seja devido à propriedade que possuem de aderirem e agregarem-se quando expostos a superfícies endoteliais alteradas. Assim, após traumatismo vascular com lesão endotelial formam-se agregados plaquetários, que à maneira de rolhas impedem sangramentos.

A demonstração por Hellem (1) e Gaarder e col. (2), de que os fenômenos de adesão e agregação plaquetária poderiam ser reproduzidos "in vitro" pela adição de ADP, motivou a realização de inúmeras pesquisas sobre doença tromboembólica e função plaquetária.

Alguns investigadores (3,4) demonstraram importante correlação entre função plaquetária e alguns agentes bloqueadores ou inibidores adrenérgicos, concluindo pela existência de receptores específicos na membrana plaquetária.

O presente relato descreve os resultados do estudo da adesividade e agregação plaquetária, induzida por ADP e adrenalina, realizado para análise da influência do verapamil e da fentolamina, como possíveis bloqueadores plaquetários.

MATERIAL E MÉTODOS

Para estudo da função plaquetária, foram colhidas amostras sanguíneas, de 10 indivíduos adultos, do sexo masculino, sadios e voluntários.

A agregação plaquetária foi avaliada com base na resposta ao ADP (10 μ g/ml) e à adrenalina (100 μ g/ml), associadas ou não ao verapamil* (0,23 mg/ml) ou à fentolamina** (1 mg/ml), empregando-se agregometro modelo Corning-EEL 169.

As curvas obtidas foram interpretadas em função do índice: $I = Y$, onde I = índice de agregação; Y = seguimento da ordenada de α intensidade de transmitância, delimitado entre o ponto inicial da curva e a projeção de seu ponto de estabilização (agregação máxima); α = ângulo formado pela ordenada de intensidade e por uma reta traçada entre a origem da curva e seu ponto de estabilização (Fig. 1).

A adesividade plaquetária foi estudada pelo método de Salzman (5) modificado (6,7).

* Dilacorón — Knoll

** Regitine — CIBA

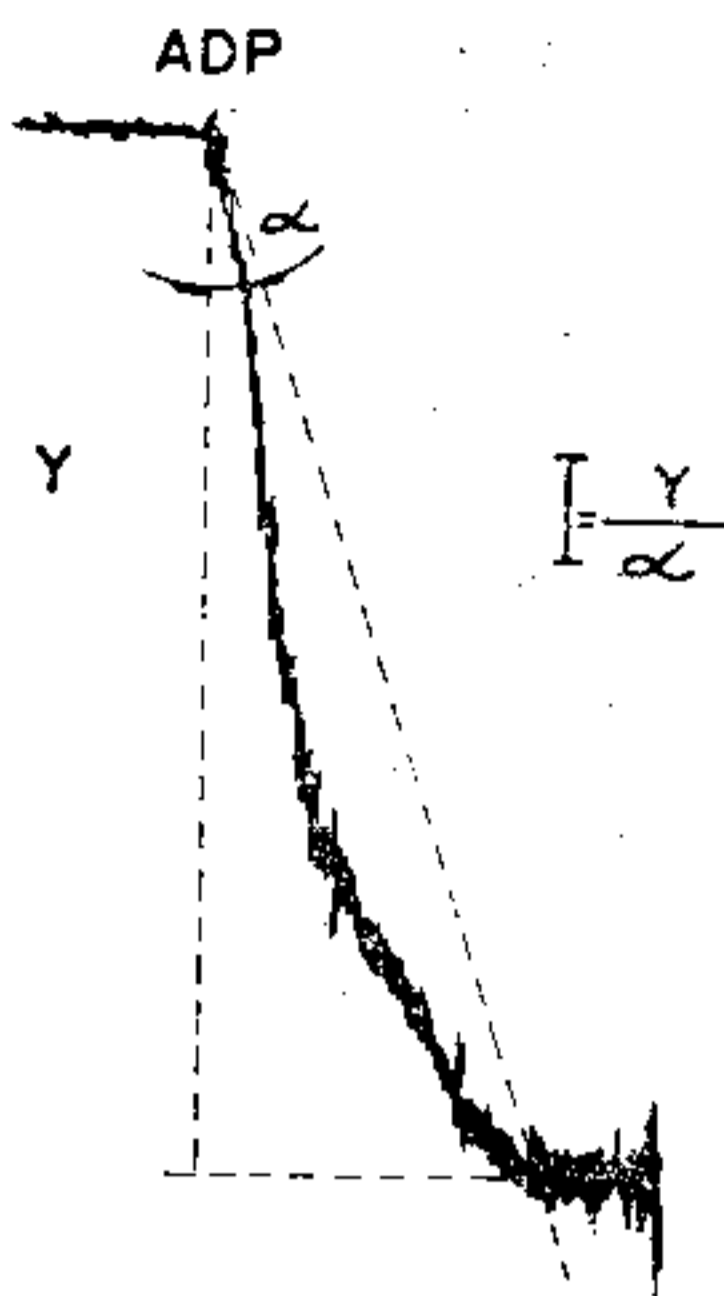


FIGURA 1
Avaliação do índice de agregação

RESULTADOS

O estudo da agregação plaquetária induzida pelo ADP resultou em índices de agregação com valores variáveis de 12,60 a 26,00 e média de 19,10 (controle). A adição do verapamil determinou redução da agregação para índice médio de 6,08, verificando-se ainda 41,2% de desagregação dentro do período considerado (5 minutos) (Fig. 2).

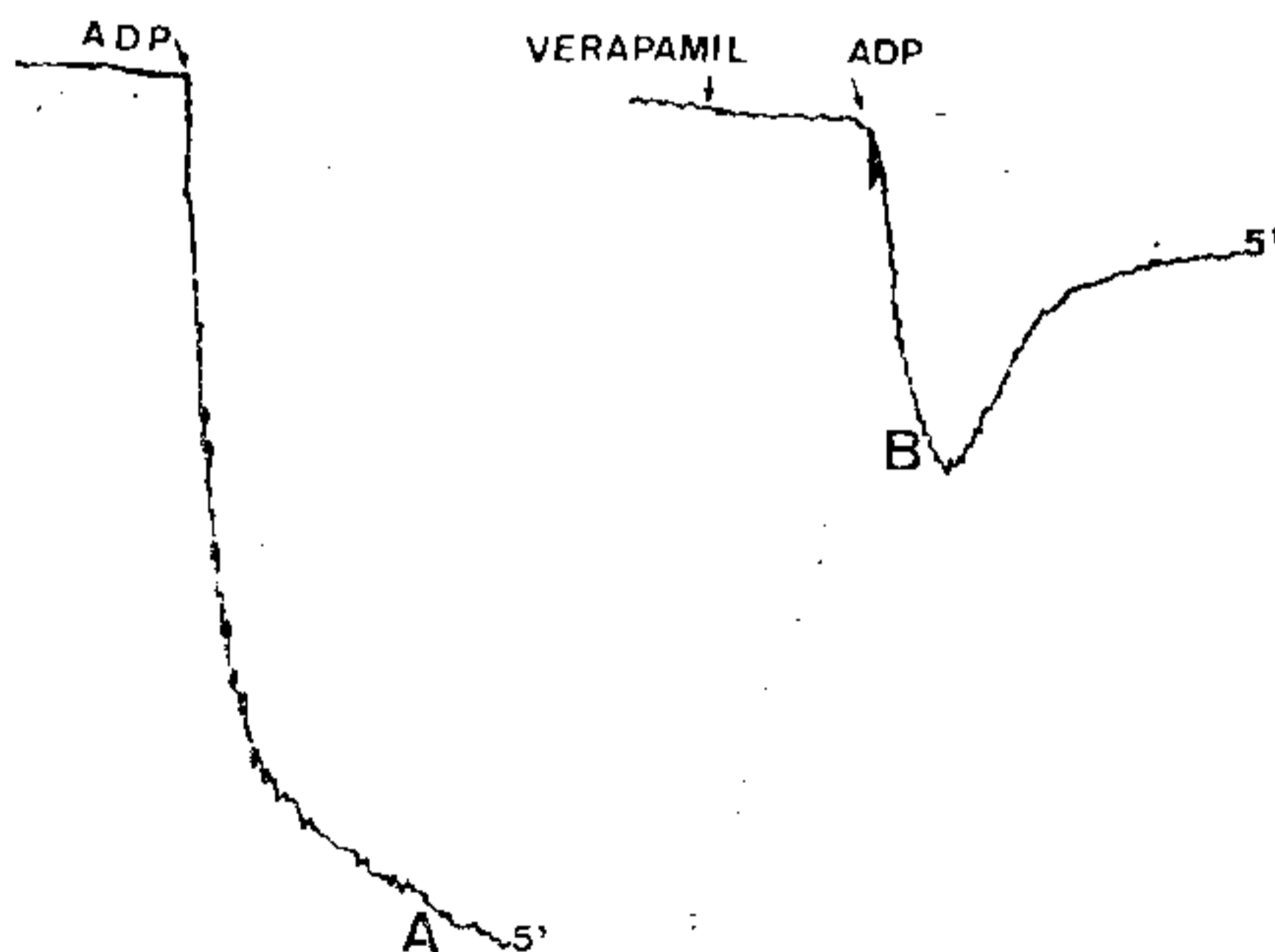


FIGURA 2
Agregação Plaquetária e Verapamil
A — antes B — após

QUADRO I
VARIAÇÃO DA AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA INDUZIDA PELA ADP (10 ug/ml)

1 cm/min — 5 mv.

OBS. N.º	CONTROLE	VERAPAMIL (0,23 mg/ml)	FENTOLAMINA (1 mg/ml)	PLAQUETAS mil/mm ³
1	19,50*	10,00*	65,6**	200
2	24,00	3,50	66,7	200
3	26,00	7,00	59,7	160
4	15,00	7,50	25,5	200
5	16,20	9,50	20,8	195
6	25,80	5,20	45,5	270
7	21,60	0,40	28,4	385
8	14,20	6,40	6,1	240
9	12,60	2,90	53,49	210
10	16,10	8,40	39,7	220
Média	19,10	6,08	41,2	228

* índice de agregação.

** % de desagregação.

Nas mesmas condições, a fentolamina determinou importante bloqueio plaquetário, reduzindo o índice de agregação para valores máximos de 0,20 (obs. n.º 1) e 0,24 (obs. n.º 7) com média de 0,09 (Quadro I).

O estudo da agregação plaquetária induzida pela adrenalina resultou em índices de agregação com valores variáveis

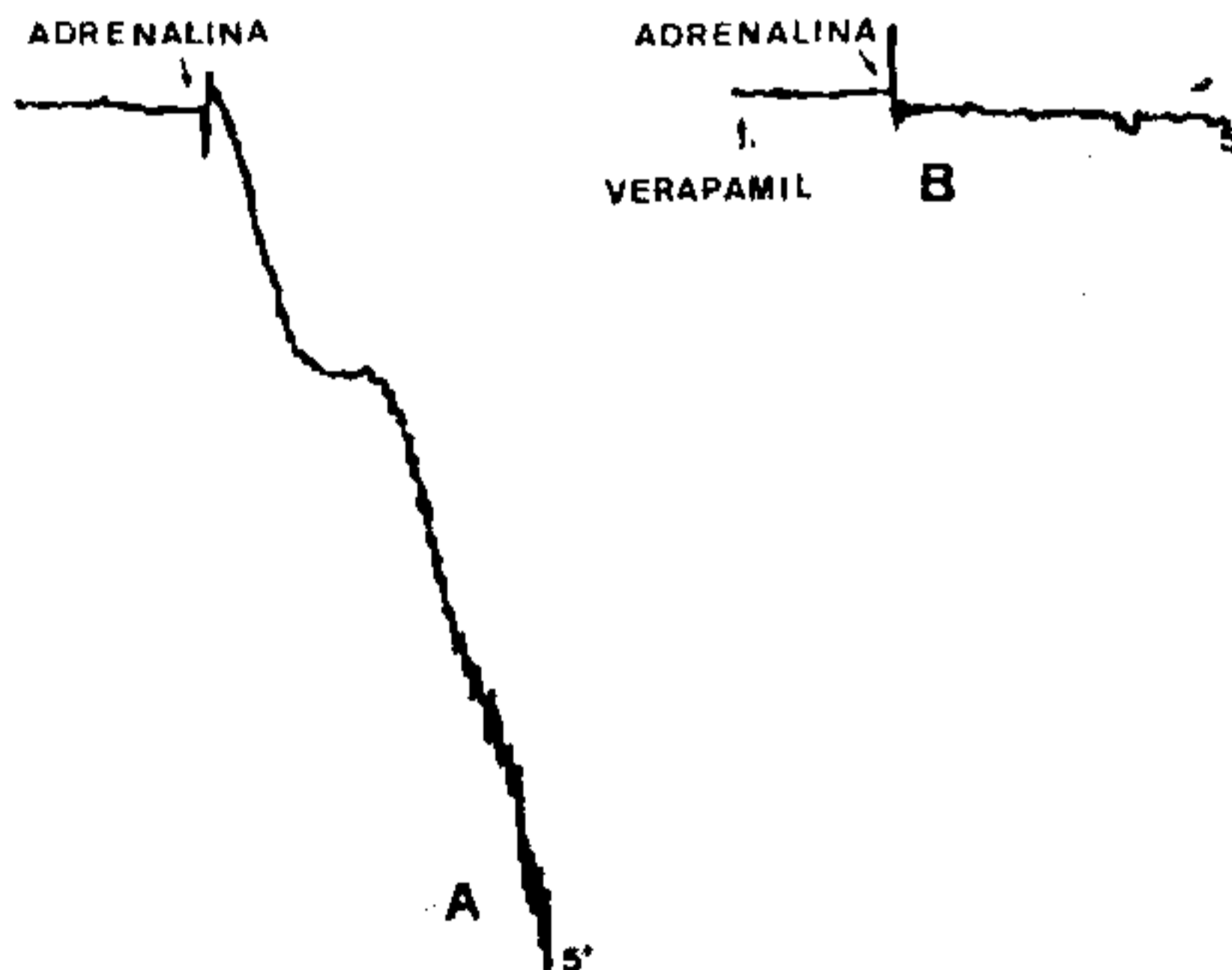


FIGURA 3
Agregação Plaquetária e Verapamil
A — antes B — após

entre 2,00 e 23,00 com média de 7,41 (controle). A adição do verapamil determinou redução da agregação para índice médio de 0,10 (Fig. 3): valor semelhante foi obtido pelo emprego da fentolamina nas mesmas condições de estudo (Quadro II).

QUADRO II
VARIAÇÃO DA AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA INDUZIDA PELA
ADRENALINA (100 µg/ml)

OBS. N.º	CONTROLE	VERAPAMIL (0,23 mg/ml)	(1 mg/ml) FENTOLAMINA	(mil/mm ³) PLAQUETAS
1	2,00	0,14	0,18	200
2	6,50	0,18	0,25	200
3	2,30	0,04	0,06	160
4	23,00	0,00	0,00	200
5	3,20	0,00	0,00	195
6	7,90	0,00	0,00	270
7	11,60	0,64	0,48	385
8	9,20	0,00	0,03	240
9	4,70	0,00	0,00	210
10	3,70	0,04	0,00	220
Média	7,41	0,10	0,10	228

A adesividade plaquetária variou entre 71,1% e 90,4% com média de 82,2% (controle). Este valor declinou para 38,2% nas amostras sanguíneas estudadas após adição do verapamil (Quadro III).

QUADRO III
VARIAÇÃO (%) DA ADESIVIDADE PLAQUETÁRIA

OBS. N.º	CONTROLE	VERAPAMIL 0,23 mg/ml.
1	78,9	26,9
2	84,0	36,1
3	90,4	23,8
4	80,6	75,0
5	82,8	35,7
6	81,6	27,6
7	89,5	33,3
8	71,1	50,0
9	83,4	32,8
10	79,3	42,2
Média	82,2	38,2

DISCUSSÃO

Após a primeira descrição das plaquetas por Donné, em 1841 e a correlação das mesmas com os fenômenos de trombose por Bizzozero, em 1881 (citados por Mamen e col. ⁽⁸⁾), inúmeras pesquisas foram realizadas evidenciando sua importância na prevenção de processos hemorrágicos e na gênese de distúrbios circulatórios oclusivos.

Atualmente, acha-se bem estabelecido o conceito de que os processos tromboembólicos venosos dependem mais de fenômenos inerentes à coagulação protéica que das plaquetas, beneficiando-se consideravelmente da farmacodinâmica dos anticoagulantes; os processos trombóticos arteriais, por outro lado, dependem fundamentalmente da função plaquetária, sendo relativamente precários os benefícios da anticoagulação convencional.

Aspecto particularmente interessante de envolvimento fisiopatológico das plaquetas, a coagulação intravascular disseminada, contribui para o agravamento acentuado de inúmeras condições mórbidas como fenômeno imuno-alérgicos e estado de choque, dentre outras.

O emprego de anticoagulantes orais para profilaxia das manifestações tromboembólicas arteriais tem mostrado resultados desalentadores. Igualmente pode-se dizer do emprego da heparina para tratamento da coagulação intravascular disseminada, em grande número de casos. Provavelmente esses resultados fossem consideravelmente melhorados pelo uso de droga capaz de bloquear a função plaquetária, com efeitos colaterais pouco importantes.

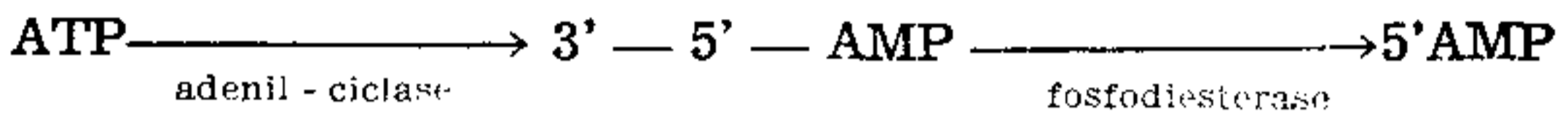
Os mecanismos bioquímicos envolvidos no fenômeno de agregação plaquetária ainda parecem obscuros, contudo existem evidências denotando importante papel do ADP liberado pelas próprias plaquetas. Com efeito, a agregação induzida por qualquer agente, exceto soro antiplaquetário, parece dever-se à liberação do ADP ⁽⁹⁾.

A adrenalina determina agregação plaquetária bifásica quando testada a 37°C. Embora também se admita que esta agregação pela adrenalina dependa da liberação de ADP, nesse caso o fenômeno difere do induzido pelo ADP exógeno, porquanto a primeira fase já é irreversível e não ocorre a metamorfose determinada pelo ADP. A reação de liberação e a segunda fase de agregação por ADP ou adrenalina, parecem depender do mesmo mecanismo ⁽¹⁰⁾.

Salzman e col. ⁽¹¹⁾ e Booyse e Rafelson ⁽¹²⁾ explicam o papel do ADP na agregação, inibindo nas plaquetas a atividade da ATP-ase, enzima responsável pela conversão ATP —

ADP, supostamente necessária à preservação da forma e desagregação plaquetária. Para Dawber e Roberts (13) e Grotum (14), o ADP agiria alterando as causas negativas superficiais de repulsão.

O mecanismo adrenérgico de agregação plaquetária foi explicado por Marquis e col. (15), com base nas concentrações do 3' — 5' — AMP, que dependem das seguintes reações:



A inibição de adenil-ciclase ou o estímulo da fosfodiesterase diminuem a concentração do AMP cíclico determinando agregação plaquetária e vice-versa. Os estimulantes α — adrenérgicos, como a adrenalina, inibem a adenil-ciclase e os α — bloqueadores como a regitina a estimulam.

Mills e col. (16) demonstraram o efeito inibidor plaquetário da Dihidroergotamina e da Fentolamina. Relataram também que a fenoxibenzamina e a dibenammina, igualmente α — bloqueadores, são inativos quanto à função plaquetária.

Na presente investigação pode-se verificar importante efeito bloqueador plaquetário da fentolamina,, que reduziu o índice de agregação para valores médios de 0,09 e 0,10 com ADP e adrenalina respectivamente. Sendo a regitina droga α — bloqueadora, a inibição da agregação pela adrenalina é facilmente compreensível, confirmando as pesquisas anteriormente enunciadas. Diferentemente das hipóteses acima enunciadas, o bloqueio da agregação pelo ADP sugere a participação também de mecanismo adrenérgico neste tipo de resposta plaquetária.

O emprego do verapamil determinou importante efeito de bloqueio funcional plaquetário, reduzindo de 82,2 para 38,2 o porcentual médio de adesividade, de 7,41 para 0,10 o índice médio de agregação pela adrenalina e de 19,10 para 6,08 o de agregação pelo ADP. Neste caso o estudo das curvas obtidas sugere ainda a hipótese de bloqueio da segunda fase de agregação, com significativo efeito de desagregação (41,2%).

No que se refere às fibras musculares cardíacas e lisas, o verapamil atua como cálcio-antagonista, bloqueando o influxo desse ion, necessário ao acoplamento eletromecânico (17). Nas plaquetas, pode-se verificar pelos resultados expostos, que a droga impede a agregação induzida pela adrenalina de maneira semelhante à obtida com a fentolamina, sendo contudo diferentes as respostas resultantes da indução com ADP.

Peirce e col. (18) defendem a existência de dois mecanismos principais de ativação da musculatura lisa vascular. O

primeiro depende da estimulação α — adrenérgica e o segundo de fenômenos de acoplamento relacionados ao influxo de cálcio. Este sendo bloqueado por deficiência de cálcio ou adição de verapamil e aquele pelos alfa-bloqueadores. Na agregação plaquetária, vários mecanismos parecem existir, dificultando a compreensão definida do fenômeno.

Em análise global, dos diferentes aspectos e resultados comentados e expostos pode-se concluir, nas condições da presente investigação, que o ADP desencadeia agregação plaquetária envolvendo também mecanismo adrenérgico mediado por α — receptores e que a liberação do ADP, para desencadear a agregação pela adrenalina ou completar a iniciada pelo ADP exógeno, depende de fenômenos relacionados à mobilização de cálcio ionizado ou à inibição da fosfodiesterase. Este último processo considerado menos provável, já que Vighdahl e col. (19) demonstraram que concentrações altas de verapamil são necessárias para bloqueio relativamente pouco significativo da enzima em questão.

Por outro lado, a confirmação dos estudos experimentais de Kreiskott e Hofman (20), mostrando bloqueio plaquetário pelo Verapamil, sugere a aplicação da droga, para essa finalidade, em algumas condições clínicas, conforme pesquisa em desenvolvimento no serviço.

SUMMARY

ADRENERGIC MECHANISM OF THE PLATELET FUNCTION

Verapamil and phentolamine effects

Verapamil and phentolamine effect on platelet aggregation was studied in human blood samples voluntarily offered.

The results demonstrate important platelet inhibition by drugs studied with the following pharmacodynamics interpretations:

a - platelet aggregation induced by ADP probably also includes adrenergic mechanism by α — receptors.

b - ADP liberation to start platelet aggregation by adrenalin or to complete that one started by exogenous ADP also includes calcium mobilization or enzymatic inhibition phenomenon.

REFERÊNCIAS

1. Hellem A J — The adhesiveness of human blood platelets in vitro. *Scand J Clin Lab Invest* 12:51 (supl) 1960.
2. Gaarder A M, Johnsen J, Laland S, Hellem A & Owren P A — Adenosine diphosphate in red cells as a factor in the adhesiveness of human blood platelets. *Nature* 192:531, 1961.
3. Mills D C B & Roberts G C K — Effects of adrenaline on human blood platelets. *J Physiol* 193:443, 1967.

4. Abdulla Y H — Adrenergic receptors in human platelets. *J Atheroscler Res* 9:171, 1969.
5. Salzman E W — Measurement of platelet adhesiveness: a simple in vitro technique demonstrating an abnormality in von Willebrand's disease. *J Lab Clin Med* 62:724, 1963.
6. Bowie E J W, Owen C A, Thompson J H & Didisheim P — A test of platelet adhesiveness. *Mayo Clin Proc* 44:306, 1969.
7. Gomes O M, Castagna R C, Antonáscio F, Bittencourt D, Verginelli G, Langer B, Chamone D A F & Zerbini E J — Modificação do método de Salzman para estudo da adesividade plaquetária. Ação «in vitro» do Dipiridamol. Apresentado no IV Congresso Brasileiro de Hematologia — Curitiba, Paraná, 1973.
8. Mammen E F, Anderson G F & Barnhart M I — Platelet adhesion and aggregation in thrombosis: countermeasures. F K Schattauer Verlag, Stuttgart, 1970.
9. Haslam R J — Mechanism of blood platelet aggregation. In, Johnson S A & Seegers W H, Ed — *The Physiology of Hemostasis and Thrombosis*. Thomas, Springfield, 1967.
10. Zucker M B — Test of platelet adhesion, aggregation and release. In Mammen E F, Anderson C F & Barnhart M I — *Platelet adhesion and aggregation in thrombosis: countermeasures*. F K Schattauer Verlag, Stuttgart, 1970.
11. Salzman E W, Ashford T P, Chambers D A, Neri L L & Dempster A P — Platelet volume: effect of temperature and agents affecting platelet aggregation. *Am J Physiol* 217:1330, 1969.
12. Booyse F M & Rafelson M E Jr — Studies on human platelets. III. A contractile protein model for platelet aggregation. *Blood* 33:100, 1969.
13. Dawber J G & Roberts J C — An electrical double layer theory for platelet adhesiveness and initiation of intravascular thrombosis. *Thromb Diath. Haemorrh* 19:451, 1968.
14. Grottum K A — Platelet surface charge and aggregation. Effects of polyelectrolytes. *Thromb Diath Haemorrh* 21:450, 1969.
15. Marquis N R, Becker J A & Vigdahl R L — Platelet aggregation III. An epinephrine induced decrease in cyclic AMP synthesis. *Biochem Biophys Res Commun* 39:783, 1970.
16. Mills D C B, Smith J B & Born G V R — Pharmacology of platelet aggregation inhibition. In Mammen E F, Anderson G F & Barnhart M I — *Platelet adhesion and aggregation in thrombosis: countermeasures*. F K Schattauer Verlag, Stuttgart, 1970.
17. Fleckenstein A, Doring H J & Kammermeier H — Einflu von Beta - Rezeptorenblockern und verwandten Substanzen auf Erregung, Kontraktion und Energiestoffwechsel der Myokardfaser. *Klini Wschr* 46:343, 1968.
18. Peiper U, Griever L & Wende W — Activation of vascular smooth muscle of rat aorta by noradrenaline and depolarization: Two different mechanisms. *Pflugers Arch* 330:74, 1971.
19. Vigdahl R L, Mongin J & Marquis N R — Platelet aggregation IV. Platelet phosphodiesterase and its inhibition by vasodilators. *Biochem Biophys Res Commun* 42:1080, 1971.
20. Kreiskott H & Hofmann H P — Tierexperimentelle Untersuchungen zur Hemmung der Thrombozytena-aggregation durch Verapamil in vitro und in vivo. *Arzneim - Forsch (Drug Res)* 23:1555, 1973.