

A RELAÇÃO DAS INTEGRINAS PLAQUETÁRIAS COM O ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO ISQUÊMICO
THE ASSOCIATION OF PLATELET'S INTEGRINS WITH ISCHEMIC STROKE

Rafael Moreira Torquato Pinheiro, Denise Harumi Silva Yamashita, Archangelo Padreca Fernandes

Centro Universitário das Faculdades Metropolitanas Unidas – Núcleo de Ciências Biológicas e da Saúde – FMU. Avenida Santo Amaro, 1239 – Vila Nova Conceição – São Paulo/SP.

Resumo

O acidente vascular encefálico está entre as maiores causas morte e invalidez na atualidade. Dentre os casos de AVE, a maior prevalência está associada ao acidente vascular encefálico isquêmico, desencadeado por eventos de obstrução vascular de artérias carótidas ou encefálicas. A formação de trombos obstrutivos é seguramente relacionada à aterosclerose, que por sua vez é um processo inflamatório crônico que induz ao remodelamento da parede vascular pela interação entre leucócitos, plaquetas, endotélio e fatores de coagulação. As plaquetas são importantes elementos na hemostasia primária e trombose, interagindo com a matriz extracelular e outros elementos do sangue através de processos de adesão, agregação e secreção de grânulos. A maioria desses processos é realizado ou modulado por uma classe específica de receptores transmembrana, as integrinas. Neste trabalho relacionamos as funções e interações das integrinas presentes nas plaquetas, visando esclarecer e evidenciar sua importância na formação de trombos.

Palavras-chave: acidente vascular cerebral, aterosclerose, integrinas, plaquetas, trombo.

Abstract

Stroke is among the leading cause of death and disabilities in the present time. Most of these cases are related to the Ischemic Stroke, triggered by carotid and cerebral arteries vascular obstruction events. Occlusive thrombus formation is related to atherosclerosis, a chronic inflammatory process that leads to vessel wall remodeling through the interactions between leucocytes, platelets, endothelium and coagulation factors. Platelets are important elements in hemostasis and thrombosis, interacting with extra cellular matrix and other blood components through adhesion, aggregation and granule secretion. Most of this process fulfilled or modulated by a specific class of transmembrane proteins, the integrins. In this work we associated function and interactions of the platelet's integrins, aiming to clarify and point out its importance to thrombus formation.

Keywords: stroke, atherosclerosis, integrins, platelets, thrombosis.

INTRODUÇÃO

O acidente vascular encefálico está entre as maiores causas de morbidade e mortalidade no mundo, sendo responsável por cerca de 5,5 milhões de mortes e 44 milhões de casos de invalidez anualmente. ¹ Destes, estudos apontam uma prevalência de 70~80% de acidentes vasculares encefálicos isquêmicos, variando conforme etnia e fatores de risco prevalentes nas diferentes populações estudadas. Caracterizado pela interrupção do fluxo sanguíneo em vasos encefálicos, o AVE isquêmico é desencadeado por obstrução aterosclerótica local de grandes artérias cervicais e encefálicas, ou por trombos que se desprendem de placas ateroscleróticas e obstruem artérias encefálicas em seu trajeto, promovendo a morte dos tecidos privados dos componentes sanguíneos, se as condições de circulação não forem rapidamente restabelecidas. ²

A presença da placa de ateroma na parede do vaso é resultado de um processo inflamatório crônico, denominado como aterosclerose, no qual dislipidemias e redução nos controles de radicais livres estão associadas com o recrutamento de leucócitos e expressão de citocinas pró-inflamatórias, desencadeando o acúmulo de lipídios e elementos do sangue na camada subendotelial. ³ Este processo gradual está diretamente relacionado ao equilíbrio entre os fatores: hemodinâmica, inflamação e interação plaquetária, os quais contribuem para a progressão da placa de ateroma, originando lesões ateroscleróticas e estabelecendo a base para a formação de trombos oclusivos. ^{3, 4, 5}

A hemodinâmica compreende as interações entre forças hídras e mecânicas com estruturas do sistema vascular em relação ao fluxo sanguíneo, variando de acordo com a pressão fibrilar arterial, diâmetro do vaso e presença de estímulos vasodilatadores ou vasocompressores. ⁶ Sua relevância está no fato de que tais alterações induzem efeitos que influenciam na sinalização, adesão e agregação de leucócitos e plaquetas, pois promovem mudanças na estrutura de moléculas de adesão e receptores dispostos nas membranas endoteliais,

bem como na localização de elementos no sangue e nas tensões sobre as membranas citoplasmáticas.^{7, 8}

Os leucócitos desempenham um importante papel na aterosclerose e trombose, uma vez que a inflamação consiste no cerne da formação e remodelamento da placa de ateroma, em especial pela interação de monócitos e neutrófilos com o LDL, subprodutos da oxidação deste, plaquetas ou ainda micropartículas originadas de plaquetas.^{9, 10}

Plaquetas são pequenos fragmentos citoplasmáticos de megacariócitos, células residentes da medula óssea, atuando primariamente na reparação de lesões endoteliais, prevenindo o extravasamento do tecido sanguíneo da circulação. Desempenham importante papel na hemostasia e trombose, podendo também contribuir para diversos processos fisiológicos e patológicos, como inflamação, cicatrização, imunidade inata, crescimento tumoral e metástase, através da secreção de grânulos ou da interação célula-célula.¹¹

Dentre as diversas estruturas que participam nos processos de sinalização, recrutamento, adesão, agregação e proliferação, tanto nos processos fisiológicos quanto patológicos, uma família de receptores é comum a estes eventos e fundamental para a hemostasia, as integrinas.¹² Caracterizadas como proteínas transmembrana formadas por subunidades distintas Alfa (α) e Beta (β), podem ser encontradas em diferentes tipos celulares, funcionando como receptores de sinalização bidirecional reconhecem e transmitem alterações em sua estrutura, induzidas pela interação com ligantes específicos, ao citoesqueleto, desencadeando polimerização dos microfilamentos de actina e permitindo processos como: secreção de grânulos, aderência em superfícies, mudanças na membrana plasmática, proliferação e até mesmo diferenciação celular.^{12, 13} Nas plaquetas são encontradas 5 variações da subunidade α e 2 da subunidade β , que formam as seguintes integrinas: $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$, $\alpha 11\beta 3$, $\alpha v\beta 3$.¹⁴

Através da análise de informações obtidas em artigos experimentais, casos clínicos e revisões, sobre as integrinas plaquetárias e suas funções, este

trabalho tem como objetivo estabelecer correlações entre esses receptores e seu papel no complexo processo de formação de trombos oclusivos.

Receptores Integrina de subunidade $\beta 3$

O principal receptor da classe integrina nas plaquetas é o $\alpha \text{IIb}\beta 3$, também denominado como GPIIb/IIIa, é reconhecido como mediador dos processos de adesão, agregação plaquetária e composição da capa fibrótica.¹⁵ É a integrina plaquetária mais estudada e a principal função atribuída a ela é a ligação com peptídeos RGD (arginina-glicina-ácido aspártico) dos dímeros de fibrinogênio ou fator de Von Willebrand, atuando como ponto de ancoragem para estes ligantes e permitindo a ligação entre plaquetas através deles.¹⁶

Esse receptor transmembrana consiste em um heterodímero das subunidades distintas αIIb e $\beta 3$, cuja expressão na membrana plaquetária está estimada em até 80.000 cópias por plaqueta.¹⁵ Com os estudos da estrutura desta proteína, foi possível estabelecer uma organização cristalizada da porção extracelular da subunidade $\beta 3$, revelando uma diversidade de sítios de interação com diferentes ligantes e cofatores.¹⁷ São reconhecidos como ligantes da integrina $\alpha \text{IIb}\beta 3$: fibrinogênio, fator de Von Willebrand, fibronectina, vitronectina, CD40L, entre outros componentes da matriz extracelular, como Cyr61 e ICAM-4 que contém a sequência RGD.^{12, 18}

Suas interações dependem de alteração conformacional em sua estrutura com exposição de seus diversos sítios de ligação. Estímulos agonistas como ADP e TXA2, ativam vias de fosforilação intracelular, as quais convergem para a ativação das proteínas citoplasmáticas Talin-1 e Kindlin-3. Essas proteínas interagem com a cauda citoplasmática da subunidade $\beta 3$, irrompendo com interações regulatórias nos domínios transmembrana do receptor e causando o afastamento da cauda citoplasmática $\beta 3$ da subunidade αIIb , promovendo assim a ativação desse receptor e permitindo a interação dos ligantes com os sítios expostos. Esses eventos são denominados como sinalização *inside-out* (do meio intracelular para o meio extracelular) e permitem, em última estância,

a sinalização *outside-in* (do meio extracelular para o meio intracelular) através do receptor ativado.^{16, 17, 20}

Estudos mais recentes apontam, além dos agonistas já conhecidos, uma interação com o receptor da superfamília das imunoglobulinas, o FcγRIIIa (receptor gama de fração cristalizada de anticorpo), como fundamental para a ativação das integrinas, em especial a $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ por estímulos a vias de fosforilação.²¹ Essa interação complementa o complexo quadro de ativação e alteração nestes receptores, os quais são apontados como importantes efetores na sinalização para mudança do perfil plaquetário agregativo para o perfil pró-coagulante, caracterizado pelo acúmulo de grânulos plaquetários e aumento de expressão de fosfolípidios de carga negativa na membrana da plaqueta, como fosfatidilserina, estabelecendo uma superfície favorável para a conversão da pró-trombina em trombina.²² Existem evidências de que essa sinalização ocorre em resposta a interação do receptor $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ com multímeros de fibrina.²³

Neste cenário em que altas concentrações de fosfatidilserina estão presentes nessa região da membrana plaquetária, a atividade de $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ é inibida, suprimindo sua ligação ao fibrinogênio. Essa plaqueta passa então a tecer um arcabouço de fibrina que captura diversas proteínas presentes nos grânulos acumulados, permitindo sua incorporação no trombo pela interação de outros receptores com a rede fibrótica.²⁴ Todas essas alterações mecânicas e estruturais induzidas na membrana plaquetária, em grande parte pela ação da integrina $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$, contribuem para a instabilidade da mesma e pode ser o mecanismo por trás da formação de micropartículas plaquetárias, vesículas originadas da fragmentação de plaquetas ativadas ou degradadas que ainda possuem receptores e grânulos ativos e contribuem para a modulação da inflamação. Foi evidenciado que a ação das micropartículas está diretamente relacionada ao estímulo que a originou.²⁵

Outro receptor de subunidade β3 encontrado nas plaquetas é o $\alpha\text{V}\beta\text{3}$. Esta integrina também está presente em diversos outros tipos celulares e está

relacionada principalmente às células endoteliais e a neovascularização.¹² Sua importância foi denotada em casos de trombose em pacientes com Trombastenia de Glazmann, os quais não possuem integrinas $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ funcionais, embora ainda possuam a expressão fisiológica de integrinas $\alpha\text{V}\beta\text{3}$.¹⁶ Estudos experimentais suportam que este receptor é capaz de suportar adesão e agregação, especialmente em condições de fluxo sanguíneo reduzido, interagindo com fibronectina, fibrinogênio, vitronectina e fator de von Willebrand. Entretanto também foi demonstrado que, na ausência de $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$, a formação de prolongamentos citoplasmáticos plaquetários é limitada.^{23, 27}

Integrinas plaquetárias de subunidade β1

Nas plaquetas são reconhecidas as seguintes integrinas de subunidade β1 : $\alpha\text{2}\beta\text{1}$, $\alpha\text{5}\beta\text{1}$ e $\alpha\text{6}\beta\text{1}$. Embora a subunidade β1 seja comum entre as três, conservando a função de alteração do citoesqueleto, as subunidades α possuem estruturas peculiares, apresentando sítios de ligação específicos e limitados para cada variação.¹² Esses receptores de subunidade β1 representam um papel fundamental na adesão das plaquetas, e na agregação, participando da sinalização e secreção de grânulos, o que amplifica e suporta a agregação.²⁸

Para a formação do trombo oclusivo é fundamental a liberação dos agentes parácrinos e autócrinos contidos nos grânulos densos e alfa plaquetários. A integrina $\alpha\text{2}\beta\text{1}$ é descrita como um importante receptor de adesão ao colágeno, assim como a glicoproteína GPVI, atuando em conjunto com esta. São expressos de 2.000 a 4.000 cópias desses receptores na membrana plaquetária, caracterizando-o como a segunda integrina mais numerosa nas plaquetas. Estudos demonstraram que a interação entre o colágeno e a GPVI por si só, é o suficiente para permitir a adesão da plaqueta aos componentes da matriz extracelular, entretanto, somente essa interação não é suficiente para a indução da secreção de grânulos, associando importante evento dos processos de hemostasia e trombose às integrinas $\alpha\text{2}\beta\text{1}$.^{28, 29}

O receptor $\alpha 5\beta 1$ é descrito como uma integrina de alta afinidade com a fibronectina, participando da polimerização da capa fibrótica, embora interações com o colágeno e osteopondina também possam ocorrer através desta proteína transmembrana.¹² O receptor $\alpha 6\beta 1$ é o principal receptor para laminina, possuindo ainda sítios para interação com trombospondina, ADAM (desintegrina e metaloprotease) e Cyr61 (proteína de sinalização associada a matriz extracelular).¹²

CONCLUSÃO

Todos esses eventos de alteração na membrana e citoesqueleto das plaquetas, induzidos por diversas interações de ligantes com os receptores integrina, denotam um controle espacial e temporal da formação do trombo, em resposta à dinâmica de eventos que o cerca, permitindo estipular localização de subpopulações de plaquetas, de acordo com sua função em dado momento e o microambiente que as cercam. Diante de dados que correlacionam a espessura da capa fibrótica com o risco de um evento trombótico, onde quanto menor a espessura, maior o risco de trombos desprenderem-se de uma placa de ateroma, ou de um trombo em formação,^{30, 31} não podemos deixar de relacionar a ação das integrinas na manutenção desta capa fibrótica. Além do trombo em si, as plaquetas ainda induzem forte regulação inflamatória, estimulando até mesmo a diferenciação de monócitos em macrófagos residentes, através de interação desses com micropartículas originadas de apoptose plaquetária. Tanto a formação das micropartículas, quanto a localização de determinado grupo de plaquetas em um trombo, está relacionada à ação das integrinas. Através das análises e da compilação de informações acerca das integrinas nessa pequena revisão de literatura, podemos observar que os conhecimentos sobre as ações e interações desses receptores plaquetários são de extrema importância para a melhor compreensão e acompanhamento dos casos de acidente vascular isquêmico, ou mesmo de pacientes com aterosclerose. Além de informações sobre a dinâmica do processo de formação de um trombo oclusivo, este estudo

também aponta que as variações nas integrinas, em especial na $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ e $\alpha\text{2}\beta\text{1}$, podem ser correlacionadas com diferentes fenótipos trombogênicos, seja por sua expressão excessiva ou deficiente, sugerindo novas abordagens para as análises de grupos de risco para o acidente vascular isquêmico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Mukherjee D, Patil CG. Epidemiology and the global burden of stroke. *World Neurosurgery*. 2011;76(6 Suppl):S85-90.
- 2- Truelsen S, Begg S, Mathers C. The global burden of cerebrovascular disease. The World Health Organization. 2006.
- 3- Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*. 2002;420(6917):868-74.
- 4- Meadows TA, Bhatt DL. Clinical Aspects of Platelet Inhibitors and Thrombus Formation. *Journal of the American Heart Association*. 2007;100(9):1261-75.
- 5- Ni H, Freedman J. Platelets in hemostasis and thrombosis: role of integrins and their ligands. *Transfusion and Apheresis Science*, 2003;28(3):257-64.
- 6- Tsuji S, Sugimoto M, Miyata S, Kuwahara M, Kinoshita S, Yoshioka A. Real-time of mural thrombus formation in various platelet aggregation disorders: distinct shear-dependent roles of platelet receptors and adhesive proteins under flow. *Blood*, 1999;94(3):968-75.
- 7- Savage B, Almus-Jacobs F, Ruggeri ZM. Specific synergy of multiple substrate-receptor interactions in platelets under flow. *Cell*, 1998;94(5):657-66
- 8- Page C, Pitchford S. Neutrophil and platelet complexes and their relevance to neutrophil recruitment and activation. *International Immunopharmacology*, 2013;17(4):1176-84.
- 9- Gargiulo S et al. Molecular Signaling Involved in Oxysterol-Induced β1 -Integrin Over-Expression in Human Macrophages. *International Journal of Molecular Sciences*, 2012;17(4):1176-84.
- 10- Vasina EM, Cauwenberghs S, Feijge MAH, Heemskerk JWM, Weber C, Koenen RR. Microparticles from apoptotic platelets promote resident macrophage differentiation. *Cell Death and Disease*, 2011;2:e211.
- 11- Michelson A D. *Platelets*. 3ed. Boston: Elsevier, 2010.
- 12- Takada Y, Ye X, Simon S. The Integrins. *Genome Biology*, 2007;8(5):215.

- 13- Hynes RO. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*, 2002;110(6):673-87.
- 14- Kasirer-Friede A, Kahn ML, Shattil SJ. Platelet integrins and immunoreceptors. *Immunol*, 2007;218:247-64.
- 15 – Huynh KC, Stoldt VR, Scharf RE. Contribution of distinct platelets integrins to binding, unfolding, and assembly of fibronectin. *Biology Chemistry*, 2013;394(11):1485-93.
- 16 – McCarty OJ, Zhao Y, Andrew N, Machesky LM, Stauton D, Frampton J, Watson SP. Evaluation of the role platelets integrins in fibronectin-dependent spreading and adhesion. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 2004;2(10):1823-33.
- 17 – Kim C, Kim MC. Differences in α - β transmembrane domain interactions among integrins enable diverging integrin signaling. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2013;436(3):406-12.
- 18 – Andre P et al. CD40L stabilizes arterial thrombi by a beta3 integrin-dependent mechanism. *Nature Medicine*, 2002; 8(3):247-52.
- 19- van der Meijden PE et al. Key role of integrin α IIb β 3 signaling to Syk kinase in tissue factor-induced thrombin generation. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2012;69(20):3481-92.
- 20- Jallu V, Poulain P, Fuchs PFJ, Kaplan C, Brevern AG. Modeling and Molecular Dynamic of HPA-1a and -1b Polymorphisms: Effects on the Structure of the β 3 Subunit of the α IIb β 3 Integrin. *PLOS one*, 2012;7(11):e47304.
- 21- Zhi H et al. Cooperative integrin/ITAM signaling in platelets enhances thrombus formation in vitro and in vivo. *Blood*, 2013;121(10):1858-67.
- 22- Abaeva AA et al. Procoagulant platelets form na α -granule protein-covered 'cap' on their surface that promotes their attachment to aggregates. *Journal of Biological Chemistry*, 2013;288(41):29621-32.
- 23- Brzoska T, Suzuki Y, Mogami H, Sano H, Urano T. Binding of Thrombin-Activated Platelets to a Fibrin Scaffold through α IIb β 3 Evokes Phosphatidylserine Exposure on Their Cell Surface. *PLOS one*, 2013;8(2):e55466.
- 24- Morel O, Jesel L, Freyssinet JM, Toti F. Cellular Mechanisms Underlying the Formation of Circulating Microparticles. *Arteroscler Thromb Vasc Biol*, 2011;31(1):15-26.

- 25- Vasina EM et al. Aging- and activation-induced platelet microparticles suppress apoptosis in monocytic cells and differentially signal to proinflammatory mediator release. *Am J Blood Res*, 2013;3(2):107-23.
- 26 - Nurden A, Merci P, Zely P, Nurden P. Deep vein thrombosis, Raynauds Phenomenon, and Prinzmetal Angina in a Patient with Glazmann Thrombasthenia. *Case Report in Hematology*, 2012;2012:156290.
- 27- Cooley BC. In vivo fluorescence imaging of largevessel thrombosis in mice. *Arterioscler Thromb.Vasc, Biol.* 2011;31(6):1351-6.
- 28- Petzold T et al. β 1 integrin-mediated signals are required for platelet granule secretion and hemostasis in mouse. *Blood*, 2013;122(15):2723-31.
- 29- Chen H, Kahn ML. Reciprocal Signaling by Integrin and Nonintegrin Receptors during Collagen Activation of Platelets. *Molecular an Cellular Biology*, 2003;23(14):4764-77.
- 30- Virmani R, Kolodgie FD, Burke AP, Farb A, Schwartz SM. Lessons from sudden coronary death: a comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2012; 20(5):1262-75.
- 31- Redgrave JN, Gallagher PJ, Lovett JK, Rothwell PM. Critical cap thickness and rupture in symptomatic carotid plaques: the Oxford Plaque Study. *Stroke*, 2008;39(6):1722-9.