

A PIRULÁRIA TIONINA E A FOSFATIDILSERINA DE BIOMEMBRANAS

Valdemar O. Castro *

A pirulária tionina (PT) é um peptídeo fortemente básico constituído de 47 aminoácidos, que foi recentemente isolado da castanha da Pyralaria pubera (1,2). É a seguinte a sua estrutura:

KSCCRNTWARNCYNVCRLLPGFISREICAKKCDCKIISFTTCPSDYPK

É um peptídeo hemolítico, citotóxico e neurotóxico (2,3) e as suas propriedades hemolíticas foram estudadas com algum detalhe (3). O PT extensivamente iodinado mantém a sua capacidade de ligação aos eritrócitos, mas não é hemolítico. As actividades hemolíticas do PT e da cardiotoxina (CTX) da cobra Naja naja Kaouthia são inibidas competitivamente pelo PT iodinado, indicando que tanto o PT quanto o CTX se ligam ao mesmo sítio da membrana (4,5). Esta competição para o mesmo local receptor da membrana dos eritrócitos humanos foi também demonstrada recentemente através de estudos de ligação (6.). Com as células P388 de rato o PT determina despolarização da membrana e influxo de Ca^{2+} (7), e com as células Swiss 3T3 ativa a fosfolipase A_2 (PLA_2) (7,8). Também tem actividade na junção neuromuscular, induzindo despolarização da membrana.

As actuais evidências indicam que o PT reconhece um domínio fosfolipídico, muito provavelmente contendo PS, devido aos seguintes resultados:

- 1) O tratamento de células P388 com uma preparação de PS descarboxilase determina o decréscimo de locais de ligação para o PT.
- 2) Adicionando PS a membranas de eritrócitos há um aumento da velocidade de hemólise e da ligação do PT a essas membranas.
- 3) Vesículas de eritrócitos (contendo mais PS na superfície externa) ligam mais PT do que os eritrócitos intactos.

* Docente da ESA do IP de Castelo Branco

ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL E MÉTODOS

1- Métodos gerais

Hemólise. O sangue de doadores sadios, recolhido em citrato, era usado no mesmo dia. Cinco diferentes amostras eram lavadas 4 vezes (1000 g durante 10 min) em 10 volumes de PBS a pH = 7,4 (tampão fosfato de sódio 5 mM com NaCl 150 mM) com eliminação dos linfócitos.

Para cada experiência 0,10 ml de sedimento de células vermelhas eram inicialmente diluídas para completar 100 ml em PBS pH = 7,4.

Cada ensaio em triplicata era constituído de 3,0 ml dessa suspensão que era incubada a 37°C durante 1 h com agitação suave, após o que as células eram sedimentadas a 150 g durante 15 min. e a densidade óptica do sobrenadante medida a 416 nm.

Ligação do PT. O PT liga-se avidamente a tubos de plástico e de vidro bem assim como às pipetas, o que exige um teste para controlar esse problema. A ligação não específica aos tubos pode ser diminuída, mas não eliminada, pela adição de PT não radioativo, ou simplesmente colocando as células nos tubos antes de se colocar o PT. O procedimento que se segue foi desenvolvido no laboratório para os estudos de ligação.

Aos eritrócitos (6×10^8) em 0,4 ml de PSS contidos em tubos Eppendorf, é colocado, após 5 min., ^{125}I -PT em quantidades adequadas para conseguir-se concentrações entre 0,5 a 15 ng/ml. Após outro período de 5 min. as células são centrifugadas e a radioatividade no sobrenadante é determinada em uma alíquota. O bico de plástico usado para transferir essa alíquota é também colocado no amostrador para contagem radioativa. Esta etapa mede o PT em excesso e não é influenciada pelo PT radioativo adsorvido nas paredes do tubo de Eppendorf. As células sedimentadas são lavadas duas vezes e então ressuspensas em PSS. Este tratamento não remove o PT radioativo adsorvido nos tubos ou ligado às células.

Com estas informações preliminares desenvolvemos, desde 15 de Setembro até 27 de Novembro* no Departamento de Bioquímica da Universidade de Brigham Young nos USA, um plano de trabalho tendo como objectivo fundamental a determinação do PS exposto na superfície externa de biomembranas (eritrócitos e respectivas vesículas, plaquetas, células P388) utilizando a reacção com o complexo da protrombinase. Paralelamente estudos de ligação do PT a essas membranas foram iniciados para correlacionar com a quantidade exposta de PS.

Significado do trabalho

- 1- O PT é citotóxico para células de mamíferos, induzindo despolarização das membranas, influxo de Ca^{2+} e activação da PLA_2 . Em eritrócitos causa hemólise. É importante entender a natureza dessa interacção, determinar se o local de ligação é específico, se contém PS e descobrir como se desencadeia a perturbação da bicamada da membrana.
- 2- A informação obtida poderá permitir o uso do PT em estudos bioquímicos e biofísicos da estrutura da membrana, particularmente no estudo da assimetria dos fosfolípidios da bicamada e na formação de domínios específicos de fosfolípidios.
- 3- Amplia-se o interesse na importância do PS exposto na fase externa das membranas celulares, na regulação celular. Fidler (9) fez uma revisão dessa importância no reconhecimento dos lipossomas pelos macrofagos e no reconhecimento dos eritrócitos pelo fígado. Há também uma correlação do PS externo com o grau de diferenciação das células (10). Do mesmo modo a ligação do factor da necrose do tumor e de interferons aos lipossomas é modulada pelo conteúdo de PS (11). Se for possível demonstrar que o PT é específico para o PS da membrana celular, isso poderá constituir-se num instrumento útil para estudar o efeito do PS superficial nos processos celulares.

* Ano de 1992

Transfere-se então uma alíquota desta suspensão, que contém ^{125}I -PT ligado às células, para o recipiente destinado à contagem radioativa. Inclui-se também o bico de plástico usado na transferência anterior. O PT marcado radioativamente contém aproximadamente 10^6 contagens/(min.ng). A ligação não específica é determinada na presença de um excesso (100 vezes) de PT não radioativo.

Determinação do PS externo em membranas celulares. Para realizar experiências significativas afim de relacionar actividades celulares, induzidas pelo PT, com a concentração de PS exposto, é necessário utilizar um teste para medir esse PS. Neste método o complexo da protrombinase reage especificamente com a serina externa para formar a trombina a partir da protrombina. Finalmente é utilizado o cromóforo S 2238, cuja hidrólise é catalizada pela trombina fornecendo um produto detectado a 405 nm, cuja velocidade inicial de formação está relacionada com a concentração de PS exposto.

Connor e colaboradores (11) discutem este método, achando-o mais vantajoso do que o que utiliza a fosfolipase A_2 (PLA_2), que converte os fosfolipídios externos nos correspondentes lisofosfolipídios ou o uso de reagentes químicos para formar derivados dos fosfolipídios externos. As vantagens do método da protrombinase são a sensibilidade, a especificidade e a simplicidade em termos da medida do composto produzido na hidrólise do cromóforo S 2238. Além disso não perturba as membranas o que poderia conduzir à redistribuição do PS na bicamada lipídica.

A cor produzida pelo complexo da protrombinase é proporcional ao PS exposto na parte externa das membranas. A quantificação exacta da concentração desse fosfolipídio é criticamente dependente da área da superfície dessas membranas (11). Nas experiências com o complexo da protrombinase é importante relacionar o PS externo com os efeitos celulares já conhecidos provocados pelo PT, tais como a hemólise, a ativação de PLA_2 e o influxo de Ca^{2+} . Para isso são necessárias curvas de calibração relativas à formação do cromogénio em função do conteúdo de PS, em grandes vesículas unilamelares (LUV)

contendo quantidades conhecidas desse fosfolipídio. Estas informações permitem comparar a produção do cromogénio produzido na presença de membranas celulares, sem ser necessário medir a superfície dessas células.

O método da protrombinase foi utilizado na medida do PS externo com células P 388, plaquetas e vesículas de eritrócitos preparadas com vários graus de simetria relativamente ao PS. Connor e colaboradores (11) referiram que os eritrócitos não apresentam PS externo pelo método da protrombinase, mas isso será objecto de revisão.

Obtenção de ghosts com vários graus de simetria relativamente ao PS. As células vermelhas eram obtidas no mesmo dia, de doadores normais, e lavadas por 4 vezes com 4-5 volumes do tampão PBS (fosfato de sódio 5 mM a pH = 7,4). Os eritrócitos eram finalmente ajustados a 50% (V/V) no mesmo tampão e assim conservados no gelo para serem utilizados na preparação dos ghosts.

Os ghosts eram preparados tendo como base o método de J. Connor e colaboradores (16) com algumas modificações. Nesse objectivo misturava-se 50 μ l da suspensão de eritrócitos preparada anteriormente, com 950 μ l do tampão 5P8 (fosfato de sódio 5 mM a pH = 8,0 tendo EDTA sódico 0,1 mM), sob agitação, durante 20 s, em agitador "VORTEX" e logo se deixava em gelo picado durante 15 min. Na hemólise em presença de cationes juntava-se também o respectivo catione (CaCl_2 , MgSO_4), utilizando-se 15 μ l de soluções 100 mM, obtendo-se assim esses cationes na concentração de 1,5 mM. O MgATP, quando presente, era adicionado no estado sólido na quantidade de 1,5 mg para cada ml de suspensão, para se obter a concentração final de 3,0 mM. Após a incubação no gelo adicionava-se ao hemolisado 100 μ l de PBS 10 vezes concentrado e contendo MgCl_2 1 mM. A suspensão adquiria assim a isotonicidade e nestas condições permanecia incubada a 37°C durante 20-30 min. Procedia-se em seguida a uma centrifugação em microcentrífuga Eppendorf, durante 3 min., na posição 8. O sedimento era então lavado 2 vezes com 100 μ l de PBS a 4°C e finalmente ressuspensão com 225 μ l deste tampão. Obtinha-se assim uma suspensão de ghosts na concentração de 10% relativa ao volume de sedimento de hemácias utilizadas para a hemólise.

EXPERIÊNCIAS COM AS VESÍCULAS DE ERITRÓCITOS (ghosts)

Ao passo que os eritrócitos não apresentam PS externo, de acordo com a literatura (12), o PS interno é distribuído durante o processo da hemólise e respectiva formação das vesículas, para fornecer várias distribuições de PS. Isto tem sido extensivamente estudado por Schlegel e colaboradores (13,14) e também por Williamson e colaboradores (15). A distribuição do PS tem sido determinada pelo tratamento com PLA_2 e a análise dos fosfolípidios resultantes (15). A redistribuição do PS pode ser geralmente acompanhado utilizando o corante merocianina 540 (15) o qual não marca a bicamada altamente organizada dos eritrócitos, mas fixa as vesículas simétricas, as quais apresentam uma bicamada muito menos organizada devido ao PS na parte externa.

Estudos preliminares de ligação mostraram que os eritrócitos ligam ^{125}I -PT (10,600 contagens/min.) e os "ghosts" simétricos apresentam 93.400 contagens/min. Este acréscimo tão grande na ligação do ^{125}I -PT já era esperado, mas os "ghosts" "assimétricos" preparados nas mesmas condições, mas sem Ca^{2+} , mostraram a ligação correspondente a 73.300 contagens/min. Isto representa menos que os "ghosts" simétricos, mas muito mais que os eritrócitos. Parece que os "ghosts" "assimétricos" não são inteiramente assimétricos no sentido em que os eritrócitos o são.

O importante é que a distribuição de PS pode ser controlada pela composição do tampão utilizado na fase de formação das vesículas ("ghosts") e isto pode permitir modificar as condições para produzir "ghosts" de distribuições diferentes de PS. Os resultados obtidos após determinação do PS pelo método do complexo da protrombinase podem ser correlacionados com a ligação do PT radioativo aos diferentes "ghosts".

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Efeito de catiões divalentes e do ATP na distribuição da fosfatidilserina em vesículas de eritrócitos (ghosts)

Uma das metas do presente trabalho pretende relacionar a concentração de PS externo com o efeito produzido pela toxina obtida da *pyricularia pubera*, conforme relatado no item relativo aos objectivos da investigação. Com esse fim foram preparados ghosts na presença de catiões divalentes, nomeadamente o Ca^{2+} e o Mg^{2+} e também sob o efeito do MgATP isoladamente ou em conjunto com tais catiões. É que esses iões determinam a formação de ghosts com diferentes simetrias no que diz respeito ao conteúdo de PS externo relativamente ao PS interno.

Conforme se pode observar na fig. 1 os ghosts obtidos por hemólise hipotónica diluindo 40 x com o tampão 5P8 os eritrócitos em suspensão isotónica no tampão PBS a pH = 7,4, apresentam conteúdos diferentes de PS externo na presença de Mg^{2+} , de Ca^{2+} , de MgATP e de Ca^{2+} mais MgATP. Tal conteúdo está relacionado com o efeito catalítico produzido na conversão da protrombina em trombina na presença do complexo da protrombinase, medido pela velocidade da variação da absorvância a 405 nm do cromóforo produzido pelo peptídeo S2234, cuja hidrólise é catalisada pela trombina. Como se pode concluir da fig.1 os ghosts produzidos na presença de Ca^{2+} 1,5 mM apresentam uma maior concentração de PS externo do que os obtidos com Mg^{2+} , com MgATP ou com Mg^{2+} mais MgATP. Por sua vez a presença de MgATP minimiza a tendência à simetria provocada pelo Ca^{2+} e torna menores os valores de PS externo apresentados pelos ghosts preparados com Mg^{2+} .

Ghosts com conteúdos diferentes de PS externo foram também obtidos por Connor e colaboradores (16) mas não inteiramente idênticos aos nossos. De facto estes investigadores não mostraram o efeito do MgATP na redução da simetria produzida pelo Ca^{2+} durante a hemólise. A técnica descrita para a preparação

desses ghosts não está devidamente clara particularmente na fase da restauração da isotonicidade, após a hemólise hipotônica, o que pode determinar diferenças na qualidade das vesículas obtidas. Outros investigadores (17) usando o método da marcação da superfície externa dos ghosts com a substância MC 540 que se fixa tanto mais quanto mais fluída estiver a face externa da membrana, demonstraram que os ghosts produzidos na presença de Ca^{2+} 1,5 mM e de MgATP 3,0 mM também apresentam baixo conteúdo de PS externo. Na verdade o aumento de fluidez produzido pelo Ca^{2+} vai decrescendo na presença de concentrações crescentes de ATP. Embora este método seja menos específico do que o da protrombinase ele permite acompanhar a translocação do PS interno para a face externa, que acontece quando o Ca^{2+} está presente durante o processo de hemólise e "resealing". O MgATP associado a esses processos determina uma diminuição da fluidez externa, à medida que o PS é translocado de volta à parte interna da vesícula, restaurando assim a assimetria. Este método, embora menos específico que o nosso, permitiu obter resultados inteiramente coerentes com os deste trabalho.

Estabelecidas as condições para preparar ghosts com diferente PS externo torna-se possível estudar a sua interação com o ptox e relacionar o efeito obtido com o PS existente e com a capacidade de ligação à superfície dessas vesículas, conforme descrição que se segue.

Efeito do ptox em ghosts

Fica aparente da fig.2 que o ptox age nos vários tipos de ghosts no sentido de aumentar a quantidade de PS externo. Isso constitui-se numa surpresa inicial já que, se o ptox tem afinidade com domínios PS, estes seriam detectados em menor número, uma vez aplicado o método da protrombinase. Tal não acontece e o que se observa é um aumento crescente de PS acessível com o acréscimo de concentração da toxina. Esse aumento atinge um valor constante que, no caso dos ghosts preparados com os cátions divalentes e MgATP, é menor do que no na ausência deste anião.

Uma das possibilidades para explicar o maior nº de PS nas vesículas após reação com a toxina, seria admitir um efeito secundário do ligando após inicial interação. Para testar essa possibilidade procedeu-se à incubação durante um tempo muito curto, mas suficiente para a toxina ligar-se com as vesículas, conforme informações publicadas anteriormente (5,6).

Após essa rápida incubação os ingredientes seriam adicionados à mistura da protrombinase e acompanhar-se-iam durante os 3 min. seguintes de incubação a quantidade de PS detectável sob a forma de $\Delta\Delta$ /s do cromogênio S2234, hidrolisado de acordo com as condições desenvolvidas e relatadas atrás. O resultado disso é apresentado na fig.3 que permite concluir existir já no 1º min. de interação com a protrombinase, após pré-incubação de 30 s com a toxina, maior concentração de PS (comparar com ensaio control). A fig.5 corrobora esta conclusão para duas concentrações diferentes de ptox (0,04 $\mu\text{g/ml}$ e 40 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente nas curvas 3 e 4). Isto permitiu também alterar o procedimento para acompanhar a alteração de PS após reação das vesículas com a toxina, evitando a remoção do seu excesso após o curto período de interação, fazendo uso das exaustivas lavagens e microcentrifugação exigidas antes do ensaio com o complexo da protrombinase, conforme foi realizado nas experiências da fig.2, mas eliminadas nos ensaios correspondentes à fig.3 e 5 já relatados.

Para excluir de vez a existência de efeitos secundários, não instantâneos, na ação da toxina, foi estudado o efeito do tempo de sua interação com os ghosts até o limite de 10 min. A fig.6 mostra claramente que se mantém constante a quantidade de PS detectável, e a um valor muito superior ao do respectivo control. Com isso há que concluir que o ptox desencadeia, logo após a sua ligação à superfície da vesícula, a translocação do PS interno para a face externa. A magnitude com que isso acontece é dependente do tipo de ghost, sendo menor para os ghosts preparados na presença de MgATP.

É sabido que o ptox é hemolítico, citotóxico e neurotóxico (2,3), causando também despolarização da membrana e influxo de Ca^{2+} em células P388 (7) além de ativar a fosfolipase A_2 (7,8) nas células swiss 3T3. Acresce a isso o efeito posto em evidência neste trabalho, ou seja, causar o deslocamento de PS da face interna da bicamada lipídica para a externa agindo, provavelmente, no sistema responsável pela manutenção da assimetria. Nos ghosts preparados com MgATP

esse efeito é menor, o que sugere envolvimento da aminofosfolipídio transferase, dependente de ATP, na transferência, de volta à face interna, de parte do PS mobilizado para o exterior, ou mesmo evitar que ele seja transferido, significativamente, do interior para o exterior. Outras experiências, focando o MgATP, serão necessárias para desenvolver o seu mecanismo de ação e esclarecer o seu efeito na mobilização do PS.

Efeito do Iptox em ghosts

O PT extensivamente iodinado também se liga aos eritrócitos embora não seja hemolítico (4,5). Nessa iodinação o PT (ptox) perde a capacidade de provocar efeitos secundários na biomembrana os quais determinam a hemólise. Seria de interesse verificar se o PT extensivamente iodinado (Iptox) tem uma ação semelhante à do ptox, isto é desencadear o transporte de PS da face interna para a face externa dos ghosts.

Observando a fig.4, que ilustra o efeito do tempo de incubação da protrombinase após rápida reação de vários ghosts com Iptox, conclui-se que, no caso dos ghosts preparados com Ca^{2+} na presença de MgATP, o Iptox determina uma menor quantidade de PS sensível ao complexo da protrombinase, sugerindo ter havido ligação desta toxina modificada a grupos PS externo (comparar curvas 3 e 4 entre si). Já com ghosts também obtidos com Ca^{2+} , mas na ausência de MgATP, observa-se um aumento do PS externo relativo ao control (comparar as curvas 1 e 2 entre si).

Conclui-se, pois, que o Iptox tem também capacidade para induzir a transferência de PS para a superfície externa, isso em ghosts preparados na presença de Ca^{2+} sem MgATP, mas quando presente o MgATP a ação do Iptox é bloqueada. Tudo se passa como se o MgATP permitisse que a aminofosfolipídio transferase catalisasse a reposição, para a face interna dos ghosts, do PS que eventualmente tivesse sido deslocado pelo efeito do Iptox. Já na ausência do MgATP, mas com Ca^{2+} , aquela reposição não é possível uma vez que a aminofosfolipídico transferase exige a presença de MgATP no seu processo catalítico e é inibida pelo Ca^{2+} (17).

Quando os ghosts são preparados na presença de Mg^{2+} o Iptox não determina aumento do PS externo, pelo contrário, faz diminuir a quantidade de PS reconhecido pela protrombinase, mesmo em concentrações relativamente elevadas, nas quais o efeito do ptox é francamente intenso, conforme se pode observar na fig. 6. Neste tipo de ghosts o Iptox parece ligar-se a quase 75% do PS disponível (comparar curvas 1 e 2 entre si).

O efeito do Iptox não está ainda totalmente esclarecido, pois, como se observou, há uma dependência dos Ca^{2+} , Mg^{2+} e MgATP na assimetria do PS nos ghosts, conduzindo ou não à mobilização desse fosfolípido do interior para o exterior. Também, neste caso, é importante esclarecer alguns pontos, particularmente o envolvimento da aminofosfolípido transferase dependente de MgATP. Como hipótese de trabalho poderia utilizar-se o vanadato, que é um conhecido inibidor dessa enzima, para testar se o Iptox, na presença de Ca^{2+} e MgATP, induz de facto a transferência de PS para a superfície dos ghosts.

Efeito do ptox e Iptox em plaquetas

A membrana plasmática das plaquetas sanguíneas é, como os eritrócitos, caracterizada por uma distribuição assimétrica entre as duas faces da biomembrana no que diz respeito às várias classes de fosfolípidios. A face interna contém praticamente toda a fosfatidilserina (PS) juntamente com a fosfatidiletanolamina, ao passo que na superfície externa estão contidas a maior parte da fosfatidilcolina e da esfingomielina, (18-20). Esta assimetria na bicamada pode ser profundamente alterada, através de uma ativação da célula, com a consequente exposição do PS na face externa da membrana plasmática. Esta alteração tem uma grande importância fisiológica pois é responsável pela aceleração da coagulação sanguínea (21-28).

O ptox tem também um efeito de alterar a distribuição dos fosfolípidios através da membrana plasmática das plaquetas, particularmente o PS que, de acordo com a fig.5, é muito exposto (comparar curvas 1,3 e 4 entre si) não deixando dúvidas

de que, como nos eritrócitos, a toxina provoca uma transposição do PS para a face externa da bicamada. O Iptox, por outro lado, tem um efeito muito menor confirmando o mesmo tipo de comportamento encontrado para os eritrócitos.

Considerações finais

Os que estão familiarizados com as propriedades das membranas dos eritrócitos devem achar haver uma incoerência nos objectivos e nos fundamentos desta investigação. É que o trabalho em questão foca, fundamentalmente, a possibilidade da interação da toxina a um domínio constituído de fosfatidilserina (PS) e a literatura tem estabelecido que tal aminofosfolipídio não existe na superfície das células vermelhas e sim, na sua totalidade, na face interna.

Esta hipótese foi considerada pelos motivos já expostos na introdução deste relatório, pelos estudos de ligação que forneceram valores de K_M (6) mais apropriados a uma interação com domínios fosfolipídicos e, também, por não ter sido possível encontrar na bicamada lipídica um receptor proteico para a toxina (Fracki, W.S., Tese de Ph.D., Brigham Young University, 1991).

Uma outra hipótese seria a de admitir que, após a interação inicial do PT a um local não específico da biomembrana, haveria uma perturbação da bicamada lipídica, que desencadearia a transposição do PS para a face externa, ficando então acessível para ligar-se a mais PT, especificamente.

Na verdade nossos resultados mostraram que os eritrócitos contêm na superfície externa uma pequena quantidade de PS, conforme pode ser observado na fig.8. Aumentando a concentração de células vermelhas foi possível concluir, através do método da protrombinase, que aquele fosfolipídio está também presente no lado externo dessas células. Um outro laboratório (16) também apresenta resultados positivos nessa determinação, utilizando suspensões de eritrócitos a 1%. O resultado obtido é comparável ao do respectivo valor da fig.8.

No caso dos ghosts está mais documentada a existência de PS na face externa, que nós também confirmamos nas condições estabelecidas para as várias hemólises e que foram anteriormente discutidas. Resta determinar a percentagem desse fosfolípido o que exige relacionar os dados obtidos nas determinações do PS nos ghosts com valores conhecidos em vesículas sintéticas. Com essa finalidade foi traçada uma curva de calibração, mostrada no fig.7, em que se observa, para vesículas unilamelares grandes (LUV), os valores de $\Delta A/s$ em função da percentagem de PS relativamente ao DPPC, quando se utiliza $20\mu g$ de fosfolípido. Resta agora fazer as determinações de PS nos ghosts obtidos nas várias condições de hemólise, utilizando $20\mu g$ de fosfolípido e, através da curva, determinar a respectiva percentagem do fosfolípido. Evidentemente neste cálculo é pressuposto que a área dos ghosts seja igual ou próxima à dos LUV, o que é importante considerar, porque a atividade procoagulante da protrombinase depende da área da vesícula ou da célula, que participa com o PS superficial (11).

As informações obtidas com o ptox em ghosts apontam para uma transposição do PS para a face externa. Experiências preliminares indicaram que a referida toxina tem uma capacidade de ligação aos ghosts tanto maior quanto maior o conteúdo superficial de PS. Essas experiências ainda prosseguem no sentido de dar consistência a essa relação.

Após essa ligação a um domínio PS há uma perturbação da bicamada lipídica, que determina as respostas bioquímicas mencionadas na introdução e o efeito, demonstrado nesta investigação, traduzido no aumento de PS na superfície dos ghosts. Já o ptox extensivamente iodinado limita-se, em certos tipos de ghosts, a ocupar quase completamente os locais PS existentes, sem provocar a transposição interna-externa desses aminofosfolípidios e sem provocar os mesmos efeitos bioquímicos que o ptox não iodinado determina.

Relativamente aos efeitos observados não há ainda explicação experimental para estabelecer o mecanismo envolvido. Pode acontecer que o ptox introduza modificações na estrutura do citoesqueleto, resultando daí uma menor estabilidade do PS e com isso a participação deste fosfolípido no movimento através da bicamada. Outra possibilidade seria o envolvimento dos produtos da ação da PLA_2

endógena, que é sabidamente ativada pelo ptox na biomembrana. Tais produtos poderiam formar fases hexagonais na estrutura normal da bicamada à semelhança do efeito provocado pelos diglicerídeos (29-31) e desencadear em seguida todo o processo de transposição.

Tais estruturas podem formar-se com os lipídios de forma cônica, tais como os diacilgliceróis e ácido fosfatídico, que não adoptam estruturas em bicamada. Nessa forma parecem ser importantes em vários efeitos celulares, para o estímulo exógeno, por alteração dos estados físicos da membrana (30,32).

No caso das plaquetas que, como foi visto, também sofrem transposição do PS, o mecanismo envolvido deve ser semelhante ao dos ghosts. Aliás o mesmo tipo de fenómeno parece passar-se com essas células quando sofrem o processo de ativação, que precede todo o funcionamento da cascata bioquímica que conduz à coagulação sanguínea. Neste caso é a trombina a responsável pelo movimento do PS da face interna para a face externa. Tal reorientação é mais significativa se estiver presente o colagénio (33).

Outra questão importante está relacionada com a velocidade de transposição do PS. Como foi observado as condições do método da protrombinase exigem uma incubação de 3 min. após o período de ação da própria toxina, que foi limitado a 30 s. Mesmo acompanhando a ação do complexo enzimático para tempos curtos, operacionalmente é muito difícil fazê-lo para instantes inferiores a 1 min. e já nestas condições é possível observar a reorientação do PS. Acreditamos que melhores informações de carácter cinético poderão ser fornecidas usando derivados fluorescentes de PS, como por exemplo o NBD-PS (16), inserido previamente na face interna dos ghosts. Com tais ghosts pode-se acompanhar a reorientação do NBD-PS da face interna para a face externa, imediatamente após a interação com a toxina, pois o aumento de fluorescência resultante pode ser instantaneamente medido por fluorimetria. Experiências nesse sentido serão programadas em futuro próximo.

É curioso que o PS superficial, que surge devido à transposição face interna-face externa, permaneça livre sem interagir com eventual ptox presente, já que a concentração utilizada dessa toxina em grande número de experiências, foi mais do que suficiente para ocupar todos os locais originais (6). Entretanto, no caso em que essa concentração não foi excessiva (ver fig.1), o PS transposto era também significativo e em quantidade comparável ao das experiências em que a toxina estava presente em muito maior quantidade. Pode-se admitir que o PS responsável pela interação inicial e específica ao ptox, esteja constituindo domínios adequados para essa ligação e que o PS que aparece devido à transposição não esteja devidamente agrupado e, portanto, não mais em condições de se ligar especificamente. A idéia de que o primeiro evento possa não envolver o PS deve ser excluída pois, como foi observado para o caso da interação com a toxina amplamente iodinada (fig.6), há ocupação de grande parte dos PS expostos existentes nos ghosts. Acreditamos que isso ficará mais claro com as experiências que deverão estar em curso no laboratório, em futuro próximo, em que vesículas grandes unilamelares (LUV), de percentagens variadas de PS em relação ao DPPC, serão objecto de estudo na interação com a toxina PT.

Observações:

- 1- PS: fosfatidilserina.
- 2- ptox: peptídio tóxico da pyrularia pubera.
- 3- Iptox: peptídio tóxico da pyrularia pubera, extensivamente iodinado.
- 4- PT: ptox.
- 5- NBD-PS: 1-oleoil-2-(N-(7-nitrobenzeno-2-oxo-1,3-diazol-4-il)amino)caproil) fosfatidilserina.
- 6- DPPC: L- α -fosfatidilcolina, dipalmitoil (C16:0).

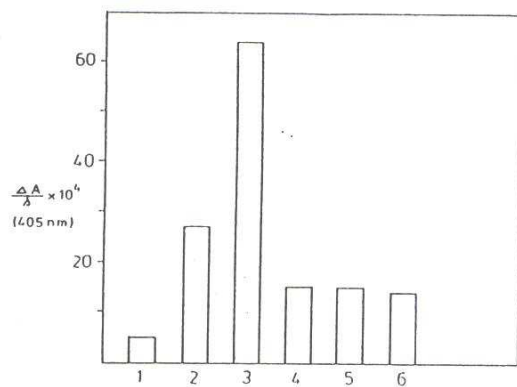


Fig.1- Efeito de cátions divalentes e do ATP na distribuição da fosfatidilserina após hemólise hipotônica. Células humanas vermelhas lavadas 4 vezes com PBS a pH = 7,4 eram submetidas a uma hemólise, diluindo 40 vezes tais células com o tampão 5P8 (fosfato de sódio 5 mM a pH = 8,0 contendo EDTA 0,1 mM) na ausência ou na presença de vários cátions. O PS localizado na parte externa era medido pelo método da protrombinase.

1 - RBC (células vermelhas intactas). Nos demais casos têm-se os "ghosts" (10% v/v) obtidos na presença dos cátions: 2 - 1,5 mM Mg^{2+} ; 3 - 1,5 mM Ca^{2+} ; 4 - 3,0 mM Mg.ATP; 5 - 1,5 mM Mg^{2+} + 3,0 mM Mg.ATP; 6 - 1,5 mM Ca^{2+} + 3,0 mM Mg ATP.

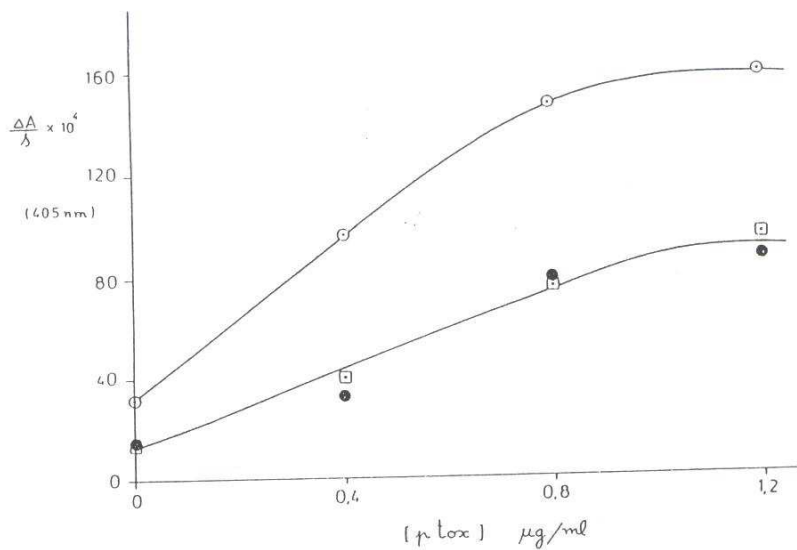


Fig.2- Efeito do ptox em ghosts normais (G) e preparados na presença de MgATP (G - MgATP) e de Ca^{2+} + MgATP (G - Ca, MgATP). Os ghosts (10% v/v) preparados conforme técnica descrita na fig.1 eram incubados com ptox nas concentrações indicadas. As várias incubações (G) (-o-), (G - MgATP) (-●) e (G - Ca, MgATP) (-□-) eram conduzidas durante 2 min. à temperatura ambiente e, após arrefecimento em gelo e centrifugação em microcentrífuga a alta velocidade durante 3 min., o sedimento era ressuspendido para ensaios da protrombinase.

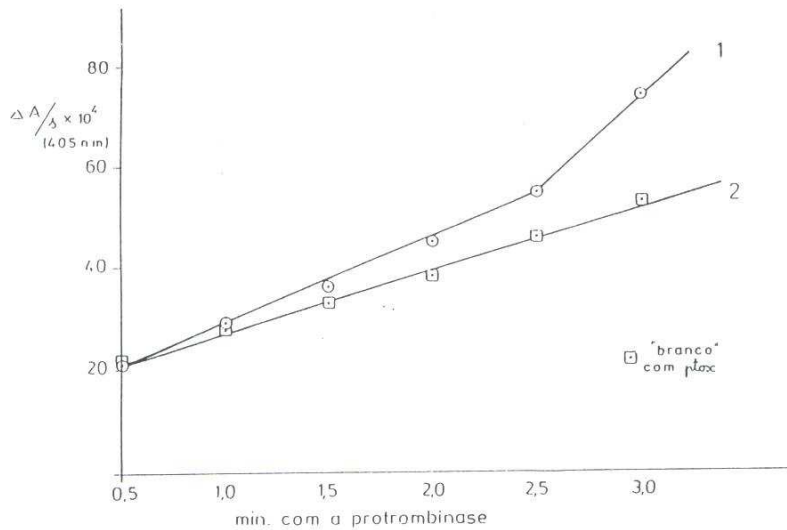


Fig.3- Efeito do tempo de incubação da protrombinase após reação dos ghosts com ptox. Células vermelhas humanas lavadas 4 vezes com PBS a pH = 7,4 eram submetidas a uma hemólise, diluindo 40 vezes tais células com o tampão 5P8 (fosfato de sódio 5 mM a pH = 8,0 contendo EDTA 0,1 mM). A formação das vesículas na presença de 1 mM de MgSO₄ era conduzida de acordo com o método citado na parte experimental. O tratamento dos ghosts (10% v/v) com o ptox 0,4 μg/ml durante 30s a 37^oC era seguido da adição à solução do complexo da protrombinase. Alíquotas retiradas nos instantes indicados eram adicionadas ao EDTA para inativar a protrombinase e analisadas para a determinação da atividade procoagulante a 405 nm. A curva 1 representa a reacção com o ptox 0,4 μg/ml e a curva 2 o respectivo ensaio control.

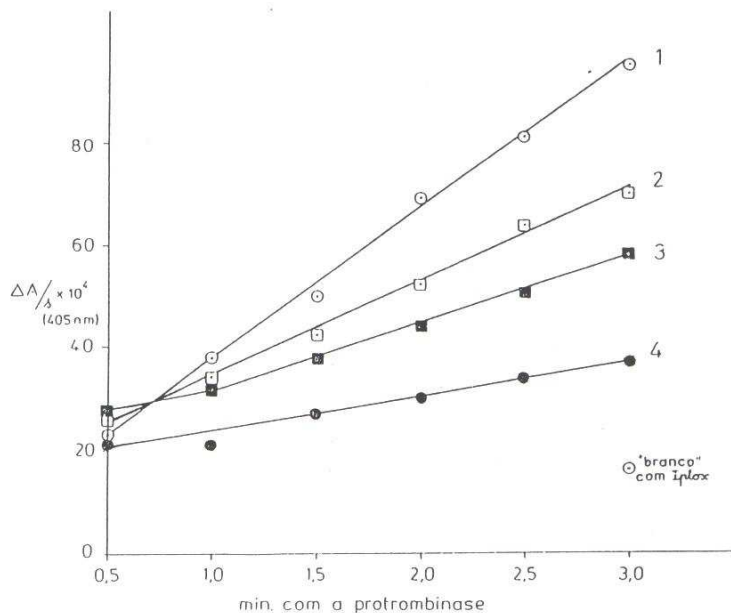


Fig. 4- Efeito do tempo de incubação da protrombinase após reação dos ghosts com Iptox. Células humanas vermelhas lavadas 4 vezes com PBS a pH = 7,4 eram submetidas a uma hemólise diluindo 40 vezes tais células com o tampão 5PB (fosfato de sódio 5 mM a pH = 8,0 contendo EDTA 0,1 mM) na presença de Ca^{2+} 1,5 mM (curvas 1 e 2) e na presença de Ca^{2+} 1,5 mM com MgATP 3,0 mM (curvas 3 e 4). A formação das vesículas na presença de MgSO_4 1 mM era conduzida de acordo com o método citado na parte experimental. O tratamento dos ghosts (10% v/v) com o Iptox 40 mg/ml durante 30s a 37°C era seguido da adição, à solução, do complexo da protrombinase. Aliquotas retiradas nos instantes indicados eram misturadas com EDTA, para inativar a protrombinase e analisadas para a determinação da atividade procoagulante a 405 nm. As curvas 1 e 2 referem-se a ghosts preparados na presença de Ca^{2+} 1,5 mM seguido da reação com o Iptox (curva 1) e sem reação com o Iptox (curva 2). As curvas 3 e 4 estão relacionadas com ghosts preparados na presença de Ca^{2+} 1,5 mM e de ATP 3,0 mM sem ter havido seguidamente reação com o Iptox (curva 3) e após reação com o Iptox (curva 4).

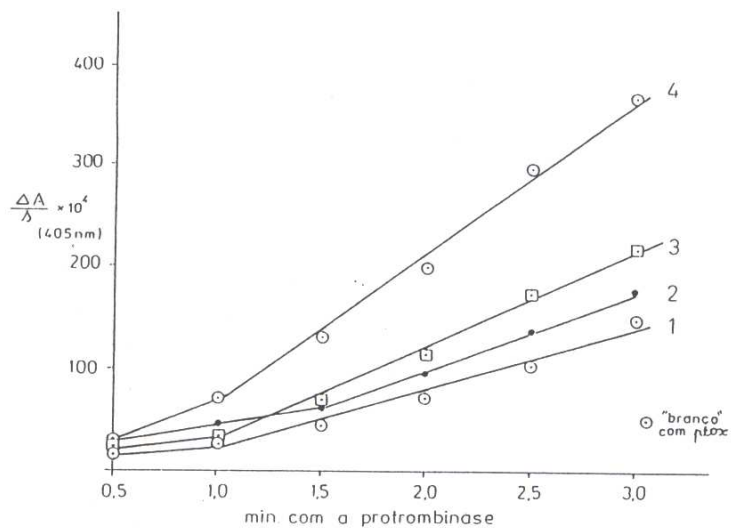


Fig.5- Efeito do tempo de incubação da protrombinase após reação de plaquetas humanas com ptox e Iptox. Plaquetas humanas adequadamente preparadas foram incubadas com a toxina, a 37°C, durante 30s, em solução de TSS a pH = 7,4. Essa suspensão contendo $0,5 \times 10^8$ células/ml era então misturada ao complexo da protrombinase. Aliquotas eram retiradas nos instantes indicados, misturadas com EDTA para inativar a protrombinase e analisadas para a determinação da atividade procoagulante a 405 nm. A curva 1 refere-se ao control, a 2 à reação com o Iptox 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$, a 3 à reação com o ptox 0,04 $\mu\text{g}/\text{ml}$ e a 4 à reação com o ptox 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

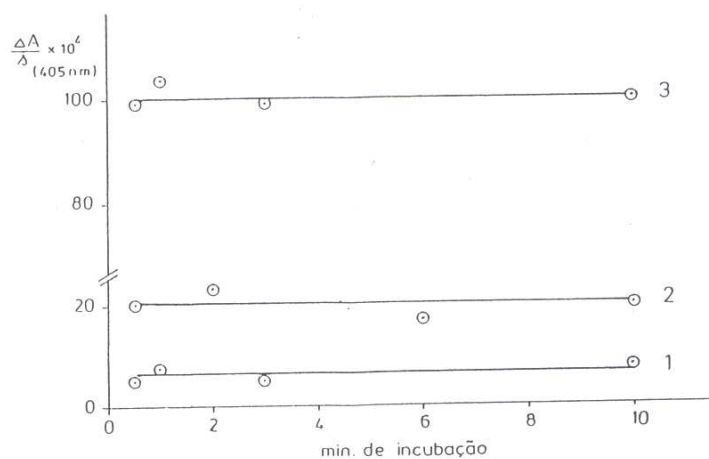


Fig. 6- Efeito do tempo de incubação de ghosts com ptox e Iptox na atividade procoagulante. Células vermelhas humanas lavadas 4 vezes com PBS a pH = 7,4 eram hemolisadas diluindo 40 vezes tais células com o tampão 5P8 (fosfato de sódio 5 mM a pH = 8,0 contendo EDTA 0,1 mM). A formação das vesículas na presença de Mg^{2+} 1 mM era conduzida de acordo com o método citado na parte experimental. O tratamento dos ghosts (10% v/v) com a toxina (Iptox 40 $\mu g/ml$ - curva 1, ptox 40 $\mu g/ml$ - curva 3 e control - curva 2) a 37°C nos tempos indicados era seguido da incubação com a mistura do complexo da protrombinase para a determinação da atividade procoagulante a 405 nm.

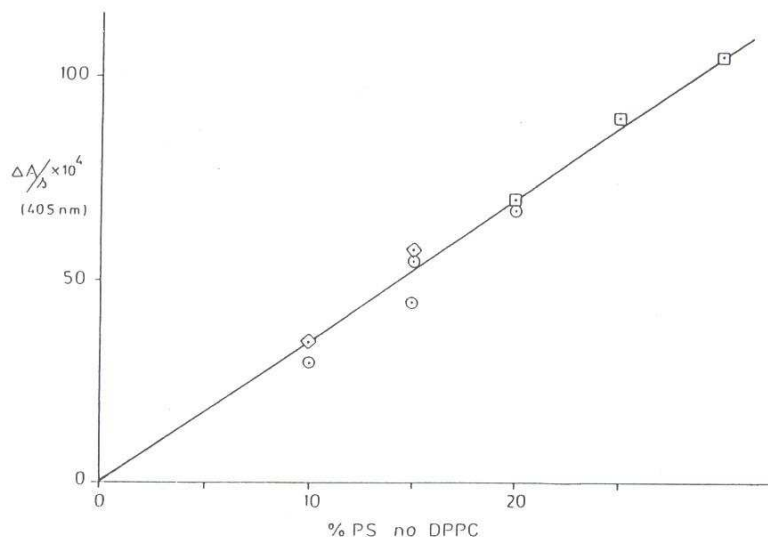


Fig. 7- Curva de calibração para determinar PS em LUV pelo método da protrombinase.

Eram inicialmente preparadas vesículas com multicamadas (MLV), por aquecimento a 55°C de um filme de L- α -fosfatidil serina, em tubo de ensaio contendo TSS a pH = 7,4 e de um filme de L- α - fosfatidilcolina (dipalmitoil) nas mesmas condições. A partir destes MLV (0.01 m mol/mL) preparavam-se misturas DPPC/PS, em proporções definidas, contendo no total 0,5 mg/mL em fosfolípido no mesmo tampão TSS. Em seguida submetiam-se essas misturas a radiações ultrassônicas a 55-60°C, por períodos de 3 minutos, com interrupções de aproximadamente 3 minutos, afim de obter vesículas pequenas com uma só lamela (SUV). Após arrefecimento procedia-se a uma centrifugação a alta velocidade, em microcentrífuga, para separar as partículas metálicas provenientes da sonda do aparelho de ultrasom. O sobrenadante límpido era ajustado a 5 mM com Ca²⁺ e guardado na câmara fria, em cujas condições surgem vesículas grandes com uma lamela (LUV) e de tamanho estável. O PS contido em 20 μ g de fosfolípido dessas vesículas era determinado pelo método da protrombinase, depois de 5 dias de sua preparação, para garantir adequada estabilização (○- 13 dias, ◇- 5 dias, e □- 11 dias após estocagem na câmara fria).

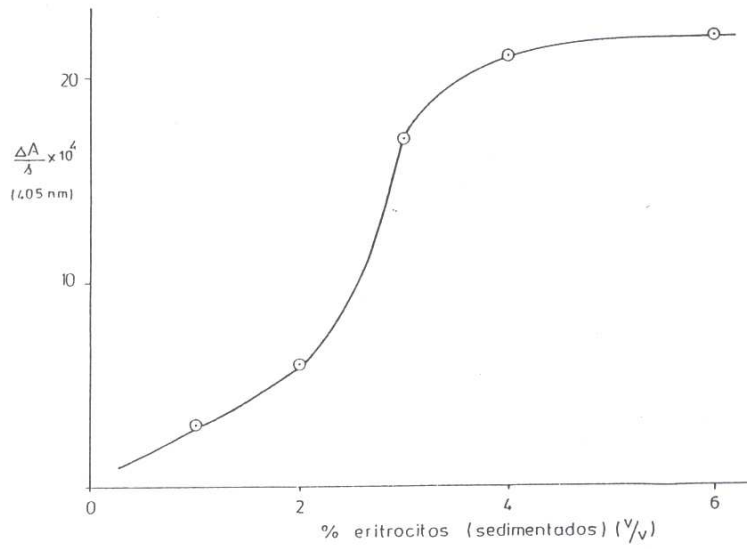


Fig.8- Determinação do PS externo de eritrócitos humanos. Suspensões de eritrócitos humanos, previamente lavados com PBS a pH = 7,4 eram preparados em diferentes concentrações para analisar o PS externo pelo método da protrombinase.

REFERÊNCIAS

- 1- Vernon, L.P., Evett, G.E., Zeikus, R.D. & Gray, W.R. (1985) Arch. Biochem Biophys., 238, 18-29.
- 2- Evett, G.E., Donaldson, D.M. & Vernon, L.P. (1986) Toxicon, 24,622-625.
- 3- Osório e Castro, V.R., Van Kuiken, B.A. & Vernon, L.P. (1988) Toxicon, 27, 501-510.
- 4- Osório e Castro, V.R. & Vernon, L.P. (1988) Toxicon, 27, 511-518
- 5- Vernon, L.P. & Rogers, A (1992) Toxicon, 30,701-709.
- 6- Vernon, L.P. & Rogers A.(1992) Toxicon,30,711-721.
- 7- Evans, J., Wang, Y., Shaw, K.P. & Vernon, L.P. (1989) Proc Nat Acad, US,86, 5849-5853.
- 8- Angerhofer, C.K., Shier, W.T. & Vernon, L.P. (1990) Toxicon, 28,547-557.
- 9- Fidler, I.J. (1985) Cancer Research, 45, 4714-4726.
- 10- Schroit, A.J., Madsen, J.W. & Tanaka, Y. (1985) J.Biol.Chem, 260, 5131-5138
- 11- Connor, J., Bucana, C., Fidler, I.J. & Schroit, A.J. (1989) Proc.Natl.Acad. Sci., USA, 86,3184-3188.
- 12- Williamson, P., Bateman, J., Kozarsky, K., Mattocks, K., Hermanowicz N., Choe, H.R., & Schlegel R.A. (1982) Cell, 30:725-733.
- 13- Schlegel, R.A. & McEvoy, L. (1987) Methods Enzymol., 149,293-300

- 14- Schlegel, R.A., Reed, J.A., McEvoy, L. & Algarin, L. & Williamson, P. (1987) *Methods in Enzymol.*, 149, 281-292.
- 15- Williamson, P., Algarin, L., Bateman, J., Choe, H-R. & Schlegel, R.A. (1985) *J.Cell.Physiol.* 123, 209-214.
- 16- Connor, J., Gillum, K. & Schroit, A.J. (1990) *Biochim Biophys. Acta* 1025, 82-86.
- 17- Verhoven, B., Schlegel, R.A. & Williamson, P. (1992) *Biochim. Biophys. Acta* 1104, 15-23.
- 18- Chap, H.J., Zwaal, R.F.A. & Van Deenen, L.L.M. (1977) *Biochim. Biophys. Acta* 467, 146-164.
- 19- Zwaal, R.F.A. (1978) *Biochim. Biophys. Acta* 515, 163-205.
- 20- Perret, B., Chap, H.J. & Douste - Blazy, L. (1979) *Biochim. Biophys. Acta* 556, 434-446.
- 21- Papahadjopoulos, J. & Manahan, D.J. (1964) *Biochim. Biophys. Acta* 90, 436-439.
- 22- Bull, R.K., Jevons, S. & Barton, P.G. (1972) *J. Biol.Chem.* 247, 2747-2754.
- 23- Memker, H.C. & Kahn, M.J.P. (1967) *Nature* 215, 1201-1202.
- 24- Gitel, S.N., Owen, W.G., Esmon, C.T. & Jackson, C.M. (1973) *Proc. Natl. Acad.Sci. USA* 70, 1344-1348.
- 25- Marcus, A.J. (1966) *Advan. Lipid Res.* 4, 1-37.

- 26- Van Diején, G., Tans, G., Rosing, J. & Hemker, H.C. (1981) *J.Biol. Chem.* 256, 3433-3442.
- 27- Rosing, J., Tans, G., Govers-Riemslog, J.W.P., Zwaal, R.F.A. & Henker, H.C. (1981) *J.Biol.Chem.* 255, 274-283.
- 28- Nesheim, M.E., Taswell, J.B. & Mann, K.G. (1979) *J.Biol.Chem.* 254,10952-10962.
- 29- Confurius, P., Bevers, E.M., & Zwaal, R.F.A. (1985) *Biochim.Biophys. Acta* 815, 143-148.
- 30- Cullis, P.R. & de Kruijff, B. (1979) *Biochim, Biophys. Acta* 559,399-420.
- 31- Cullis, P.R. & De Kruijff, B.(1978) *Biochim. Biophys. Acta* 507, 207-218.
- 32- Ohki, K., Sekiya, T., Yamanchi, T. & Nozawa, Y (1982) *Biochim. Biophys. Acta* 693, 341-350.
- 33- Bevers, E.M., Confurius, P., Van Rijn, J.L.M.L., Henker, H.Coenraad, & Zwaal, R.F.A. (1982) *Eur.J. Biochem.* 122, 429-436.