

BASES BIOQUÍMICAS DA ATIVIDADE PLAQUETÁRIA NA HEMOSTASIA E NA TROMBOGÊNESE. PARTE II.

PEDRO JOSÉ DE ALMEIDA *, JOSÉ GUILHERME PINHEIRO PIRES *, ADÉRCIO JOÃO MARQUEZINI *

Na primeira parte deste trabalho ¹ abordamos especialmente a interação das glicoproteínas (GPs) da membrana com os elementos do citoesqueleto (CK) plaquetário, a “exposição” dos receptores do fibrinogênio (Fg), assim como a sua participação como cofator indispensável à resposta de agregação. Neste trabalho, procuramos focalizar a estruturação filamental do CK, dando especial ênfase ao papel da actina, sua interação com as demais proteínas plaquetárias e a energética das respostas funcionais.

PLAQUETAS NÃO-ATIVADAS E ATIVADAS. ASPECTOS ULTRA-ESTRUTURAIS E BIOQUÍMICOS.

A figura 1 representa uma concepção tridimensional de uma plaqueta não ativada e ativada. Estudos com microscopia eletrônica, empregando técnicas especiais de fixação, têm demonstrado a presença de malha densa e filamentos de actina aleatoriamente distribuídos, porém com tendência à formação de aglomerados em torno dos grânulos, nas plaquetas submetidas a tratamento com o detergente Trinton X-100 e simultaneamente fixadas com glutaraldeído adicionado de lisina, concordam com os achados de que, em plaquetas não-ativadas, cerca de 40-50% da actina (a principal proteína plaquetária) encontra-se na forma filamentosa (ou polimerizada) de F-actina ². Com o advento de novas técnicas de quantificação dos níveis intraplaquetários de F-actina (e de G-actina), incluindo a centrifugação em altas velocidades e a técnica de inibição da DNase I ³⁻⁶ vários estudos têm confirmado que a polimerização da G-actina se faz em duas fases, com uma etapa limitante coincidente com a formação de núcleos de pelo menos três monômeros de actina. Sobre estes, monômeros adicionais associam-se sob determinadas condições para formar os filamentos. Como a plaqueta ativada apresenta um conteúdo de 60-80% de actina na forma filamentosa, deduz-se que a ativação envolve mecanismos que aumentam a polimerização de actina ^{2, 7, 8}.

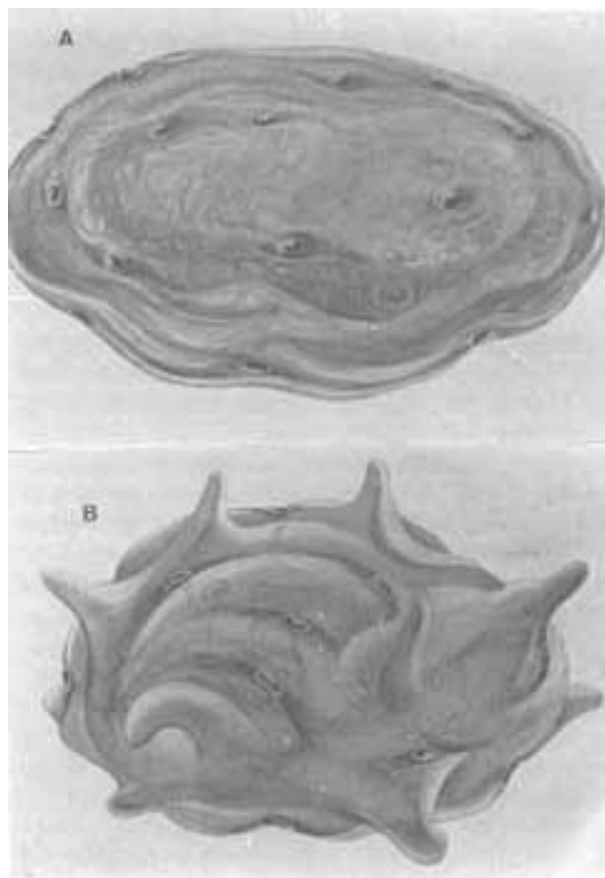


Fig. 1 - Concepção tridimensional da morfologia plaquetária na forma não-ativada (A) com a sua forma discóide e na forma ativada (B), onde aparecem as espículas ou filopódios com a centralização das organelas e grânulos, em consequência da contração do CK. Em ambas as formas, pode-se notar o sistema canalicular que se abre na superfície da membrana, responsável pela exposição direta do meio interno da plaqueta ao plasma.

Pelo fato de a polimerização ocorrer experimentalmente por ação do cátion-ionóforo A23187, além de ser inibida por ações que diminuem o cálcio do citosol (como, por exemplo, pela ação de agonistas que elevam os níveis de AMP cíclico), tem-se sugerido que

* Departamento de Ciências Fisiológicas, Centro Biomédico da UFES, Vitória, ES.

os mecanismos de polimerização são provavelmente regulados direta ou indiretamente pela concentração do cálcio citoplasmático^{2,9}.

Do ponto de vista ultra-estrutural, a plaqueta ativada exhibe filamentos e feixes de filamentos formando uma malha cuja densidade depende especialmente do tempo de incubação com o agonista. Em plaquetas incubadas com trombina (0,1 U/ml) durante 15 segundos, é possível demonstrar que o arranjo aleatório da malha de filamentos da plaqueta não-ativada se torna altamente estruturado, formando “conchas” concêntricas de filamentos, com diâmetro aproximado de 2,1 µm, em torno das organelas e dos grânulos que se encontram mais centralizados. Se o tempo de incubação é maior (2-30 minutos), tais “conchas” tornam-se mais condensadas, com redução do diâmetro para cerca de 1,5 µm. Esses achados constituem a base para a afirmativa de que a contração do CK envolvendo os grânulos plaquetários força sua centralização, ao mesmo tempo que contribui para a extrusão de seu conteúdo através do sistema canalicular que se abre na superfície da plaqueta^{2,7}.

Experimentalmente, sob determinadas condições de força iônica, filamentos de actina purificada despolimerizam-se, o que suscitou o imediato interesse em verificar-se a possibilidade de tal ocorrência em células intactas. Baseado na assimetria molecular da G-actina, passível de formar filamentos de F-actina com polaridade definida, a exposição de tais filamentos a moléculas de meromiosina pesada, forma um padrão característico de filamentos de actina em “cabeça de flechas”, onde a extremidade “plumada” e a extremidade da “ponta” são bem identificadas à microscopia eletrônica¹⁰. Os monômeros de actina adicionam-se a ambas as extremidades, porém são mais rapidamente incorporados à extremidade “plumada”, o que equivale a dizer que a concentração crítica de G-actina para a polimerização da extremidade “plumada” é menor do que a concentração para a polimerização da extremidade da “ponta”¹¹. Assim, sob determinadas condições iônicas (KCL 75mM e MgCL 1 mM), os monômeros de actina dissociam-se da extremidade da “ponta” e associam-se à extremidade “plumada”, um processo conhecido como “treadmilling” (fig. 2). Este, entretanto, embora evidenciado experimentalmente, parece não ocorrer no interior das células intactas, pois plaquetas tratadas com citocalasinas e estudadas por ensaios de sedimentação e inibição da DNase I, não têm seu conteúdo de G-actina alterado^{2,11}. As citocalasinas ligam-se às extremidades “plumadas” dos filamentos de actina. Assim, se o processo de dissociação e associação de monômeros de uma extremidade para outra ocorresse nas plaquetas intactas, os monômeros dissociados das extremidades das “pontas” não se ligariam às extremidades “plumadas”, que estariam ocupadas pelas citocalasinas⁹. Isso resultaria numa diminuição do conteúdo dos filamentos de actina. Alguns estudos foram então encetados para explicar a ausência do processo de “treadmill”

nas plaquetas intactas, porém as maiores evidências atuais são as de que proteínas capazes de se ligarem às extremidades dos filamentos de actina, em condições fisiológicas intraplaquetárias, bloqueiam o intercâmbio de monômeros entre as extremidades.

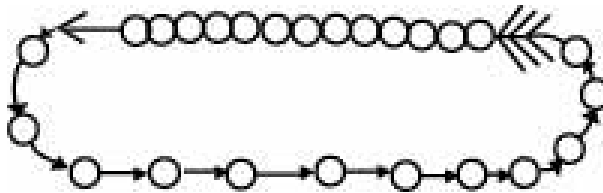


Fig. 2 - Visão esquemática do processo de “Treadmilling”, segundo o qual, sob determinadas condições (experimentais) iônicas (KCl 75 mM e MgCl² 1mM), os monômeros de G-actina dissociam-se da extremidade da “ponta” do filamento polimerizado (F-actina) e se adiciona à extremidade “plumada”. Para maiores detalhes, ver o texto.

REGULAÇÃO DA POLIMERIZAÇÃO DA ACTINA. PROTEÍNAS MODULADORAS

A concentração de actina nas plaquetas tem sido estimada entre 0,25 e 1,0 x 10⁻³M, representando, globalmente, 15-20% de todas as suas proteínas. Essa concentração é muito superior àquela capaz de desencadear a polimerização (cerca de 30 x 10⁻⁶M) em meio iônico equivalente ao intraplaquetário, o que significa que, nas plaquetas discóides, existe um mecanismo mantenedor de grande parte da actina na forma não polimerizada, assegurando que apenas 40-50% esteja sob a forma filamentosa. Seria, assim, um mecanismo capaz de restringir a adição de monômeros às extremidades dos filamentos ou núcleos de actina já presentes nas plaquetas discóides. Baseado em dados experimentais, duas possibilidades, ambas envolvendo a participação de proteínas associadas à actina, existiram para explicar o mecanismo: na primeira, os monômeros de G-actina estariam ligados a estas proteínas e, assim, não ficariam livres para a ligação com as extremidades dos filamentos ou núcleos já formados; a segunda possibilidade seria a ligação das proteínas às extremidades dos filamentos e núcleos, bloqueando a adição de monômeros na plaqueta não-ativada^{2,6-8}. Essa última hipótese, atualmente em maior evidência, fornece meios para o entendimento das modificações no conteúdo e organização dos filamentos de actina dependentes da estimulação plaquetária, as quais ocorreriam em resposta ao aumento da concentração do cálcio citoplasmático. Além de mediar a fosforilação da miosina de cadeia leve de 20 kd (um dos pares de cadeias leves da miosina essencial à interação da miosina com a actina) e acompanhar-se de um aumento de F-actina (por mecanismos ainda obscuros), o influxo de cálcio seria o responsável pela ativação de uma protease dependente deste íon, que atuaria na reorganização dos filamentos.

Várias proteínas moduladoras do processo de polimerização e reorganização dos filamentos de actina

têm sido descritas. As principais acham-se relacionadas na tabela I.

Profilina - É uma proteína básica, com baixa afinidade para a G-actina. Em presença de actina purificada apresenta efeito inibitório muito mais acentuado sobre a nucleação do que sobre o alongamento dos filamentos. Isso sugere que a profilina tenha uma ação “tamponante”, evitando a formação de núcleos. Ao contrário dos complexos (1:1) formados com a G-actina nas plaquetas não-ativadas, a profilina acha-se dissociada nos lisados de plaquetas ativadas pela trombina, o que faz supor que haja sua liberação da ligação com os monômeros durante a ativação, favorecendo a formação de núcleos ¹².

TABELA I - Proteínas moduladoras da polimerização e reorganização estrutural dos filamentos de actina ^{2,12-14}.

Proteína	Peso Molecular	Comentários
Profilina	16.000	Forma complexos 1:1 com a G-actina em plaquetas discoides, evitando a formação de núcleos
Gelsolina	90.000	Liga-se a F-actina em presença de concentrações de cálcio da ordem de 10^{-6} M/litro
Vinculina	130.000	Liga-se a extremidade “plumada” dos filamentos de actina. Considerada como um sítio de ligação dos filamentos de actina na membrana.
α - actinina	105.000	Liga-se aos filamentos de actina na presença de concentrações menores do que 10^{-6} M/litro de cálcio.
Actin Binding protein	250.000	Liga-se os filamentos de actina e estabelece ligações cruzadas entre eles. É também capaz de formar núcleos de actina.

Gelsolina - Compete com a citocalasinas pela ligação com os filamentos de actina, o que ocorre somente em presença de concentrações de cálcio da ordem de 10^{-7} M. Atua provavelmente como proteína reguladora das estruturas dos filamentos formados durante a ativação plaquetária, quando os níveis de cálcio citoplasmático chegam a cerca de 3×10^{-6} M¹³.

Vinculina - É uma proteína associada à membrana, capaz de ligar-se à extremidade “plumada” dos filamentos de actina, sendo por isso considerada como um sítio de ligação dos filamentos de actina à membrana ¹⁴.

Alfa-actinina - Estudos de imunofluorescência têm revelado que a alfa-actinina, que se liga aos filamentos de actina, localiza-se na trama de filamentos submembranosos e na membrana plasmática. Isso sugere que ela atue como sítio de ligação dos filamentos de actina à membrana. Duas formas de alfa-actinina têm sido isoladas, sendo que ambas se ligam aos filamentos de actina em presença de baixas concentrações de cálcio (menores do que 10^{-6} M), embora tal ligação não seja capaz de inibir a polimerização da actina.

Por outro lado, em concentrações de cálcio similares às encontradas em plaquetas ativadas (cerca de 3×10^{-6} M) a alfa-actinina é liberada das ligações com os filamentos de actina, sugerindo um papel regulador ainda não elucidado ^{2, 14}.

“Actin Binding Protein” (ABP) - Liga-se à extremidade “plumada” dos filamentos de actina, formando núcleos. Os filamentos formados com ABP apresentam-se muito ramificados, sendo que à microscopia eletrônica tem-se evidenciado sua localização nos pontos de ramificação. A ligação com os filamentos faz-se muito rapidamente durante a ativação plaquetária. Apresenta-se universalmente distribuída na plaqueta discóide, porém aparece particularmente concentrada nos filopódios das plaquetas ativadas. Tem-se sugerido que a ABP ligada aos filamentos sofreria uma hidrólise durante a ativação plaquetária, por ação de uma protease cálcio-dependente (a qual atuaria em concentrações da ordem de 10^{-6} M). Tal hidrólise favoreceria a reorganização subsequente dos filamentos de actina ¹⁴⁻¹⁵.

Algumas proteínas, além da vinculina e da alfa-actinina, têm sido cogitadas como sítios de ligação de filamentos de actina com a membrana plaquetária. A espectrina, a ankyrina e a “banda-3” (uma glicoproteína integral da membrana) das hemácias ligam-se à actina de tal maneira que o sistema actina-espectrina-ankyrina “banda-3” é importante na manutenção da estrutura hemática. A demonstração imunológica de ankyrina em plaquetas levantou a hipótese de que o sistema de ligação com a espectrina também esteja presente ².

INTERAÇÃO ACTINA-MIOSINA

A miosina plaquetária é constituída de 3 pares de polipeptídios, sendo 1 par de cadeia pesada (200 kd) e dois de cadeias leves (20 e 16 kd respectivamente). Tem-se sugerido que, durante a ativação plaquetária, o par de polipeptídio de cadeia leve com 20 kd e rapidamente fosforilado por ação de uma quinase de miosina de cadeia leve (MLCK), que contém calmodulina (CaM) como parte integrante de sua estrutura ¹⁶. Essa enzima é ativada na presença de concentrações micromolares de cálcio e promove a fosforilação com o mesmo curso temporal (embora com intensidades diferentes) para a ativação com trombina, colágeno, ADP e ionóforo A23187. Isso sugere que a interação miosina-actina é regulada pelo nível de fosforilação das cadeias leves de miosina. Realmente, em plaquetas ativadas pela trombina, demonstrou-se que os níveis de miosina fosforilada aumentam com o tempo de exposição a este agonista ^{17, 18}. Além disso, verificou-se que somente as formas fosforiladas de miosina se associam com os filamentos de actina. Por outro lado, a fosforilação da miosina aumenta sua atividade ATPásica, ativável pela actina ¹⁷, além de aumentar a tensão isométrica em feixes isolados de actina-mio-

sina. Portanto, pode-se dizer que a fosforilação induzida pelo agonista modifica o estado contrátil da plaqueta¹⁹. A distribuição dos microfilamentos de miosina e actina em torno dos grânulos parece ser adequada para explicar a secreção de seus conteúdos através do sistema canalicular que se abre na superfície da plaqueta. Isso também parece estar de acordo com o fato de que em plaquetas estimuladas por Phorbol12-myristato-13-acetato e por ADP (dois agentes capazes de produzir agregação e mudança de forma com, respectivamente, pouca ou nenhuma secreção), a miosina não se associa à actina^{18, 20}.

ENERGÉTICA DAS RESPOSTAS FUNCIONAIS

O metabolismo das plaquetas, semelhante ao dos músculos, é adaptado à liberação rápida de quantidades de energia, convertida principalmente nos processos de manutenção da integridade, transporte através de membranas, sínteses, agregação, secreção e retração do coágulo, sendo que a glicose oriunda do plasma é a principal fonte energética. O armazenamento e a liberação da energia utilizável faz-se através de dois “pools” de nucleotídeos da adenina: o “pool” metabólico e o “pool” de armazenamento. O primeiro, constituído principalmente de ATP de rápida renovação (contendo também ADP e AMP) é governado principalmente pela atividade da adenilato-quinase. O segundo, contendo cerca de 2/3 do total de nucleotídeos, principalmente nas formas de ATP e ADP, é metabolicamente inativo, equilibrando-se lentamente com o

“pool” metabólico. Os nucleotídeos do “pool” de armazenamento são liberados durante a “release reaction” sem afetar a viabilidade metabólica da plaqueta²¹.

Muitos esforços têm sido encetados no sentido de detectar os gastos energéticos dispendiosos em cada resposta plaquetária específica. A comparação do consumo energético em cada resposta funcional (principalmente a agregação e a secreção dos grânulos alfa e densos), induzida por agonistas que atuam por diferentes mecanismos, tem sido a base de onde advêm as estimativas da energia dispendida nessas respostas. Assim, o uso de doses equipotentes, padronizadas, de diversos agonistas mostrou que, para a agregação, o consumo energético, expresso como micromoles de equivalentes de ATP por 10¹¹ plaquetas, ocorre na seguinte ordem: A23187 (4,9), trombina (2,8) = ADP (2,8), colágeno (2,0). Isso significa que, para essa resposta específica (agregações) agonistas “mais fisiológicos”, como o colágeno, exigem um custo energético inferior ao de agonistas “menos fisiológicos”, como o ionóforo A23187. Entretanto, a relevância desta diferença ainda não foi estabelecida. Por outro lado, para a secreção dos grânulos densos, o custo energético é de apenas 25% da agregação, com pouca diferença entre os agonistas. Ao que parece, a secreção dos grânulos alfa faz-se à custas de um consumo energético bem superior ao da secreção dos grânulos densos. É interessante ressaltar que a elevação dos níveis plasmáticos do AMP cíclico, que inibe tanto a agregação como a secreção, acompanha-se de rápida redução do incremento do consumo de energia induzido pelos agonistas²².

TABELA II - Comparação do consumo energético basal de plaquetas não-estimuladas com o consumo energético, agregação e secreção em plaquetas estimuladas pela trombina, na presença de diversos inibidores (22).

Inibidor	Principal mecanismo de ação	Consumo Basal	Plaquetas estimuladas p/trombina (5 U/ml)		
			consumo energético	agregação	secreção (g. denso)
Ausência	-	-	-	-	-
Indometacina	Inibição da ciclooxigenase	N	↓	N	N
PEP/Pkase	Depleção da ADP	N	↓	↓	N
D-AMPC	Elevação dos níveis de AMPc	↑	↓↓↓↓↓	↓↓↓↓↓↓↓↓↓	↓↓↓↓↓↓↓↓↓
Ttep + POE ₁	Inibição da Fosfodiesterase + elevação dos níveis de AMPc	↓↓	↓↓↓↓↓↓↓	↓↓↓↓↓↓↓↓↓	↓↓↓↓↓↓↓↓↓
Citocalasina B	Inibição de “treadmilling” de actina + Inibição polimerização da actina	↓↓↓↓↓	↑	↓	N
Colchicina	Inibição da polimerização de actina	↓↓↓	N	↓↓↓↓↓↓↓	↓↓↓
Quabaína	Inibição da Na ⁺ , K ⁺ -ATPase	N	N	N	N
Quercetina	Inibição da Na ⁺ K ⁺ -ATPase	↓	N	↓↓↓↓↓↓↓	N

PEP/PKase - Sistema fonfoeno/piruvato/piruvato quinase; Teo + PGE₁ - mistura de Teofilina e prostaglandina E₁; D-AMPC - Dibutilil, 3,5 - AMP cíclico.

A comparação do consumo energético em plaquetas não-estimuladas (consumo energético basal estimado em cerca de 6,5 μ moles equivalentes a ATP/min por 10¹¹ plaquetas) com o consumo energético, a agregação e a secreção de grânulos densos e plaquetas estimuladas por doses relativamente altas (5 U/ml) de trombina, na presença de diversos inibidores, encon-

tra-se sumariada na tabela II. Pode-se observar que, para a maioria dos inibidores, verifica-se um acoplamento consumo energético-função das plaquetas ativadas. Entretanto, a colchicina promove um desacoplamento entre consumo energético/agregação e secreção. O mesmo ocorre com a quercetina, porém apenas em relação à secreção. Por outro lado, a colchicina

e a citocalasina B promovem uma redução do consumo basal, o que leva à suposição de que o processo de "treadmill" se faça às custas de um consumo energético importante nas plaquetas não-estimuladas. Alguns achados (como a redução do consumo basal pela mistura teofilina + prostaglandina E1 (Teo + PGE₁) e a inibição da agregação pela quercentina) carecem de explicação.

A utilização de baixas doses de trombina (0,1 U/ml) no mesmo estudo comparativo permitiu conclusões adicionais em relação ao acoplamento energético-função. Postulou-se que a agregação e a secreção de grânulos densos se relacionam com o consumo energético segundo padrões curvilíneo e linear, respectivamente. Para a secreção, o padrão de acoplamento é mantido mesmo durante forte inibição por agentes como o dibutilil-AMPC e a mistura Teo + PGE₁. Entretanto, o consumo energético e a agregação variaram independentemente na presença de diversos inibidores. Esse desacoplamento pode ser explicado pelas múltiplas etapas energéticas e fisiologicamente distintas do processo de agregação²².

REFERÊNCIAS

- Almeida, P. J.; Pires, J. G. P. - Bases bioquímicas da atividade plaquetária na hemostasia e na trombogênese. Parte I. Arq. Bras. Cardiol.
- Fox, J. E. B.; Phillips, D. R. - Polymerization and organization of actin filaments within platelets. *Sem Hematol.* 20: 243, 1983.
- Fox, J. E. B.; Boyles, J. K.; Reynolds, C. C.; Phillips, D. R. - Actin filament content and organization in unstimulated platelets. *J. Cell Biol.* 98: 1985, 1984.
- Pribulda, V.; Laub, F.; Rotman, A. - The state of actin in activated human platelets. *Eur J. Biochem.* 116: 293, 1981.
- Pribulda, V.; Rotman, A. - Dynamics of membrana cytoskeleton interactions in activated blood platelets. *Biochemistry*, 21: 2825, 1982.
- Blikstad, I.; Markey, F.; Carlsson, L. et al. - Selective assay of monomeric and filamentous actin in cell extracts using inhibition of deoxyribonuclease I, *Cell*, 15: 935, 1978.
- Pollard, T. T.; Craig, S. W. - Mechanism of actin polymerization. *Tends Biochem. Sci.* 7: 55, 1982.
- Korn, E. D. - Actin polymerization and its regulation by proteins from nonmuscle cells. *Physiol. Rev.* 62: 672, 1982.
- Fox, J. E. B.; Phillips, D. R. - Inhibition of actin polymerization in blood platelets by cytochalasins. *Nature*, 292: 650, 1981.
- Ishikawa, H.; Bischoff, R.; Holzer, H. - Formation of arrowhead complexes with heavy meromyosin in a variety of cell types. *J. Cell. Biol.* 43: 312, 1969.
- Pollard, T. D.; Mooseker, M. S. - Direct measurement of actin polymerization rate constant by electron microscopy of actin filaments nucleated by isolated microvillus cores. *J. Cell. Biol.* 88: 654, 1981.
- Blikstad, I.; Sundkvist, I.; Eriksson, S. - Isolation and characterization of profilactin and profilin from calf thymus and brain. *Eur. J. Biochem.* 105: 425, 1980.
- Lind, S. E.; Yin, H. L.; Stossel, T. P. - Human platelets contain gelsolin, a regulator of filament acting length. *J. Clin. Invest.* 69: 1384, 1982.
- Geiger, B.; Dutton, A. H.; Tokuyasu, K. T. et al. - Immunoelectron microscope studies of membrana-micro-filament interactions: Distributions of α -actinin, tropomyosin, and vinculin in intestinal epithelial brush border and chicken gizzard smooth muscle cells. *J. Cell. Biol.* 91: 614, 1981.
- Tuszyski, G. P.; Daniel, J. L.; Stewart, G. - Association of proteins with the platelet cytoskeleton. *Sem Hematol.* 22: 303, 1985.
- Daniel, J. L.; Molish, I. R.; Holsmen, H. - Myosin phosphorylation in intact platelets. *J. Biol. Chem.* 256: 7510, 1981.
- Adelstein, R. S.; Conti, M. A. - Phosphorylation of platelet myosin increases actin-activated myosin ATPase activity. *Nature.* 256: 597, 1975.
- Fox, J. E. B.; Phillips, D. R. - Role of phosphorylation in mediating the association of myosin the cytoskeletal structures of human platelets. *J. Biol. Chem.* 257: 4120, 1982.
- Lebowitz, E. A.; Cooke, R. - Contractile properties of actomyosin from human blood platelets. *J. Biol. Chem.* 253: 5443, 1978.
- Carroll, R. C.; Butler, R. G.; Morris, P. A. - Separable assembly of platelet pseudopodal and contractile cytoskeletons. *Cell*, 30: 385, 1982.
- Wintrobe, M. M. et al. - *Clinical Hematology*, 8th. Philadelphia. Lea & Febiger, p. 355. 1981.
- Verhoeven, A. J. M.; Monnersteeg, M. E.; Akkerman, J. W. N. - Comparative studies on the energetics of platelet responses induced by different agonists. *Biochem. J.* 236: 879, 1986.