

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

ALTERAÇÃO DO FLUXO DE CÁLCIO EM MICROSSOMAS DE CÉREBRO POR
K⁺, Na⁺ E H⁺: MODULAÇÃO POR POLISSACARÍDEOS SULFATADOS E
TRIFLUOPERAZINA

BIBLIOTECA SETORIAL DO
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

JOÃO BATISTA TEIXEIRA DA ROCHA

ORIENTADOR

PROF. DIOGO ONOFRE GOMES DE SOUZA

Tese apresentada ao Curso de Pós Graduação em Ciências Biológicas-
Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito
para obtenção do título de Doutor em Bioquímica

Porto Alegre

1996

AGRADECIMENTOS

Agradeço especialmente as seguintes pessoas (em ordem alfabética):

-Herman Wolosker por toda ajuda, discussões e orientação durante a realização do meu trabalho.

-Leopoldo de Meis pela orientação e por mostrar que algumas horas podem ser mais proveitosas que uma infinidade de tempo. Por pelo menos ter tentado ensinar que a "ciência normal" ou "a lógica normal" é sem graça, quando comparada a ciência criativa ou "menos lógica".

-Maria Ester Pereira por ter cuidado da Maria Cecilia, quando estava fora.

Agradeço aos seguintes órgãos pelos auxílios concedidos: CAPES (minha bolsa), CNPq (pelas bolsas de iniciação científica), FAPERGS (pelas bolsas de iniciação científica e recém-mestre e pelo auxílio financeiro) e ao programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica CNPq/UFSM.

Agradeço ao Laboratório do Prof. Leopoldo De Meis, Departamento de Bioquímica Médica, Centro de Ciências da Saúde, Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro, onde este trabalho foi realizado.

Agradeço ao Herman e a Simone pelo carinho com que me trataram e pelas enormes perdas de tempo com as caronas até a Praia da Pitangueiras.

Agradeço ao Herman e ao De Meis pela revisão da versão original da Tese.

Agradeço ao Diogo pelo apoio durante todo o período de realização do doutorado.

Agradeço ao Prof. Paulo Mourão pela doação de vários polissacarídeos sulfatados.

Agradeço a todo pessoal do Laboratório do Prof. De Meis e, em especial, a Ana Paula por toda a atenção

Agradeço a todos os bolsistas que trabalharam comigo, especialmente ao Martin Gierus e Tatiana Emanuelli por efetivamente terem se envolvido com o laboratório tanto ao nível humano como profissional e por contribuírem para minha formação.

a place to stay
enough to eat
somewhere old heroes shuffle safety down the street
where you can speak out loud
about your doubts and fears
and what's more no one ever disappears
you never hear their standard issue kicking in your door
you can relax on both sides of the tracks
and maniacs don't blow holes in bandsmen by remote control
and everyone has recourse to the law
and no-one kills the children anymore
and no-one kills the children anymore
R. Waters

What is then that secret bond which couples our mind to Nature, or that hidden organ through which Nature speaks to our mind or our mind to Nature?...For what we want is not that Nature should coincide with the laws of our mind by chance (as through some third intermediary), but that she herself, necessarily and originally, should not only express, but even realize, the laws of our mind, and that she is, and is called, Nature only insofar as she does so. Nature should be Mind made visible, Mind the invisible Nature. Here then, in the absolute identity of Mind in us and Nature outside us, the problem of the possibility of a Nature external to us must be resolved.

F.W.J. Schelling

Ainda que eu falasse a língua dos homens
e falasse a língua dos anjos,
sem amor eu nada seria.
É só o amor, é só amor
que conhece o que é verdade
o amor é bom, não quer o mal
não sente inveja ou se invaidece.

R. Russo e alguma coisa do Tao-Te-King (o livro do Caminho Perfeito) de Láo-Tsé (da China Antiga) em algum lugar.

Ao Prof. Ivan Izquierdo: por ter vindo para o Rio Grande do Sul e ter mudado a História recente (e a futura) da ciência do nosso estado (e do Brasil). E principalmente por ter nos ensinado (ainda que de maneira relativamente indireta) que ciência se faz principalmente com cérebro, trabalho, simplicidade e poucos aparelhos.

INDÍCE

INTRODUÇÃO

I	Regulação do Cálcio Citosólico	01
II	ATPases Envolvidas na Manutenção do Ca^{2+} Citoplasmático	03
III	Um breve Histórico sobre a Descoberta da Cálcio ATPase	04
IV	O Mecanismo de Funcionamento de Bomba de Ca^{2+} ou Ca^{2+} ATPase	06
V	A Estrutura da Ca^{2+} ATPase de Reticulo Sarco/Endoplasmático	11
VI	A Ca^{2+} ATPase de Reticulo Endoplasmático de Sistema Nervoso	15
VII	As Diversas Isoformas da Ca^{2+} (SERCA) ATPase	18
VIII	O Fluxo Unidirecional de Ca^{2+} : A Bomba como Canal	22
IX	O Uso de Polissacarídeos Sulfatados como Ferramenta de Estudo da Ca^{2+} - ATPase	25
X	O Papel do Ca^{2+} como Indutor da Morte Celular	28
	OBJETIVOS DO ARTIGO 1	30
	ARTIGO 1	32
	ANEXO DO ARTIGO 1	39
	OBJETIVOS DO ARTIGO 2	44
	ARTIGO 2	45
	DISCUSSÃO E CONCLUSÕES	73
	REFERÊNCIAS	78
	ANEXOS - TRABALHOS PUBLICADOS DURANTE O PERÍODO DO DOUTORADO	90
	ABSTRACT	94
	RESUMO	96

I-Regulação do Cálcio Citosólico

A regulação dos níveis de Ca^{2+} citosólico, em células de eucariontes, é realizada por diversos mecanismos. Estes mecanismos envolvem basicamente dois processos: 1) transporte ativo de Ca^{2+} por ATPases localizadas em membranas, que bombeiam Ca^{2+} contra um gradiente osmótico e 2) uso de um sistema trocador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ localizados na membrana plasmática. A mitocôndria também pode transportar Ca^{2+} para o seu interior através de um sistema trocador $\text{Ca}^{2+}/2\text{H}^+$ ou $\text{Ca}^{2+}/3\text{Na}^+$. No entanto, a participação desta organela no tamponamento do Ca^{2+} citosólico, em condições fisiológicas, ainda não está esclarecida. Aparentemente o sistema transportador mitocondrial participaria da regulação do Ca^{2+} em situações patológicas, onde o Ca^{2+} teria a sua concentração elevada (Pietrobon et al., 1990). Desta forma, a concentração citoplasmática de Ca^{2+} das células eucarióticas é mantida em níveis que normalmente estão entre 10 e 100 nM. Estes níveis podem subir consideravelmente em respostas a diversos estímulos e esta elevação pode regular uma infinidade de processos intracelulares. Inicialmente esclareceu-se o papel do Ca^{2+} como um dos principais reguladores da contração muscular; todavia, atualmente o Ca^{2+} está bem estabelecido como um dos mais importantes moduladores dos processos intracelulares em todos os tipos celulares (Ebashi, 1993). No sistema nervoso, o Ca^{2+} tem um papel fundamental no processo de excitação neuronal e funciona como segundo mensageiro em vários processos (Pietrobon et al. 1990; Henzi e MacDermott 1992; Kostyuk e Verkhratsky 1994).

O aumento transitório nos níveis citoplasmáticos de Ca^{2+} pode ocorrer pela entrada de Ca^{2+} do meio extracelular (que possui uma concentração cerca de 10.000 vezes maior que o nível citoplasmático) ou pela liberação do Ca^{2+} armazenado em diferentes organelas (principalmente do retículo endoplasmático).

Um resumo esquemático dos componentes que participam da elevação e redução do Ca^{2+} citoplasmático é apresentado na Figura 1.

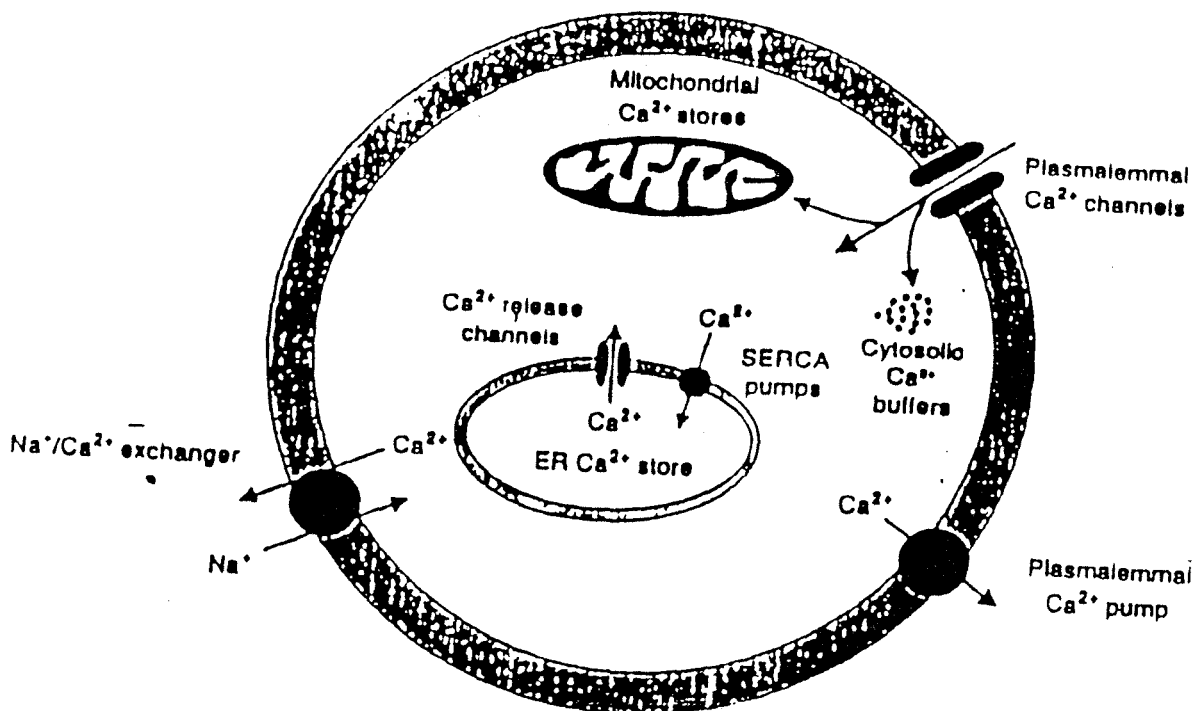


FIGURA 1 - Representação Esquemática dos Principais Componentes Celulares Envolvidos na Regulação do Cálcio Citosólico

II - ATPases Envolvidas na Manutenção do Ca^{2+} Citoplasmático

As principais ATPases que bombeiam Ca^{2+} contra gradiente pertencem a duas famílias de ATPases (de membrana celular e endomembranas). Estas duas ATPases pertencem a um grupo maior de enzimas que estão envolvidas no transporte de íons contra gradiente osmótico e são classificadas como ATPases do tipo P por apresentarem um intermediário fosforilado. Apesar de existir uma certa similaridade entre estas duas classes de ATPase, a localização celular e a regulação da atividade catalítica difere consideravelmente entre os dois tipos de ATPases.

A enzima localizada na membrana celular ejeta Ca^{2+} do citoplasma para o espaço extracelular (Figura 1) e a principal propriedade desta bomba reside na multiplicidade de mecanismos que podem regular sua atividade (Carafoli, 1991; Carafoli et al. 1992). O principal modulador fisiológico desta enzima é a calmodulina que produz um decréscimo no K_m da bomba para o Ca^{2+} de cerca de $30\mu\text{M}$ para menos de $1\mu\text{M}$ e aumenta a V_{max} cerca de 10 vezes (Carafoli, 1991). Além da calmodulina, fosfolípidios, ácidos graxos insaturados de cadeia longa e a fosforilação da enzima mediada por proteína cinase dependente de AMP cíclico podem modular a atividade da maioria das isoformas da Ca^{2+} -ATPase de membrana (Carafoli, 1991; Carafoli et al., 1992; Carafoli e Guerini, 1993). Até o presente momento, 4 genes distintos foram identificados para Ca^{2+} -ATPase de membrana plasmática, sendo que o produto destes genes pode sofrer processamento distintos dando origem a várias isoformas (Wuytack et al., 1992).

A enzima localizada no retículo endoplasmático bombeia Ca^{2+} do citoplasma para o interior do retículo (Figura 1). Como no caso da enzima de membrana celular, a Ca^{2+} ATPase de retículo endoplasmático é codificada por 3 grupos distintos de genes e por processamento alternativo pode originar diversas isoformas (Günteski-Hamblin et al. 1988; Murayama e MacLennan, 1988; Burk et al., 1989; MacLennan et al, 1992). As isoenzimas da Ca^{2+} ATPase de retículo endoplasmático são coletivamente conhecidas como SERCA (Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca^{2+} ATPase). A Ca^{2+} ATPase de retículo sarcoplasmático de fibras esqueléticas rápidas (brancas) é a mais estudada de todas as isoformas deste grupo de enzimas (De Meis, 1981; MacLennan et al. 1992; Inesi et al. 1992; Wuytack et al. 1992; Wolosker et al. 1995). Esta enzima desempenha um papel fundamental no funcionamento do músculo esquelético, tendo como função principal reestabelecer os níveis de Ca^{2+} no sarcoplasma para que o músculo relaxe (Hasselbach e Makinose, 1961; Ebashi e Lipman, 1962; Inesi 1972). A escolha preferencial do retículo sarcoplasmático como modelo de estudo foi consequência da abundância da Ca^{2+} -ATPase neste sistema, onde ela perfaz cerca de 50 % do peso da membrana e cerca de 80% das proteínas totais do retículo (Inesi, 1972 ; De Meis, 1981; Inesi 1985; Inesi et al. 1990)

III-Um breve histórico sobre a descoberta da Cálcio ATPase

Data de 1948 o primeiro relato da existência de uma atividade ATPásica em músculo esquelético não associada com proteínas contratéis (Kielley & Meyerhof, 1948). Estes autores demonstraram que esta nova atividade adenosinotri-fosfatase

era ativada por íons magnésio, mas aquela época nenhuma relação com o transporte de Ca^{2+} e com o controle da contração muscular foi estabelecida. Em 1951, Marsh demonstrou que a adição de homogeneizado de músculo a fibras glicerizadas na presença de ATP produzia o relaxamento muscular. Na época, passou-se a chamar esta fração de fator de relaxamento de Marsh. Somente alguns anos mais tarde, Ebashi e colaboradores (Kumagai et al., 1955) demonstrariam que a ATPase de Kielley-Meyerhof estava associada com os granulos do fator de relaxamento de Marsh e implicariam, embora sem evidências diretas, a esta ATPase um papel no relaxamento.

A participação do Ca^{2+} na contração muscular começou a ser melhor definida a partir dos trabalhos de Bozler (1954) através do uso de um "fator de relaxamento artificial", no caso o EDTA, que segundo o autor se ligaria ao cálcio firmemente ligado ao complexo actomiosina, inativando assim a sua função. Em 1960, Ebashi obteve um conjunto de dados similares ao de Bozler (1954), onde demonstrou que o relaxamento de fibras glicerizadas promovido por diversos quelantes (NTA, DTPA, EDTA, EGTA e outros) estava relacionado com a capacidade dos mesmos em ligar Ca^{2+} . Na mesma época, Ebashi (1961) demonstrou que o fator de Marsh ligava Ca^{2+} na presença de ATP de um modo tão potente que removeria o Ca^{2+} essencial à contração do complexo actomiosina, mas não foi capaz de demonstrar o acúmulo de Ca^{2+} pelo fator de relaxamento e nem aumento da hidrólise do ATP dependente de Ca^{2+} (Ebashi, 1961; para revisão detalhada ver Ebashi, 1993 e Wolosker et al. 1996). Estes aspectos fundamentais foram desvendados no mesmo período por

Hasselbach e Makinose (1961, 1962, 1963). Estes pesquisadores demonstraram que o fator de relaxamento acumulava Ca^{2+} concomitante com a hidrólise do ATP, quando o anion oxalato estava presente no meio de incubação (Hasselbach e Makinose, 1961; 1962). Demonstraram também que cada ATP hidrolisado possibilitava o transporte de 2 íons Ca^{2+} (Hasselbach e Makinose, 1963; para maiores detalhes sobre o histórico da descoberta da Ca^{2+} ATPase ver Wolosker et al. 1996). Assim, embora Ebashi (1993) tenha descrito que ele e colaboradores foram os primeiros a demonstrar que a ATPase microsomal de Kielley-Meyerhof era idêntica ao fator de relaxamento de Marsh, a demonstração clara de aumento da hidrólise do ATP por Ca^{2+} e o transporte e armazenamento deste íon por fragmentos do retículo sarcoplasmático devem ser atribuídas a Hasselbach e Makinose (1961; 1962).

IV- O Mecanismo de Funcionamento da Bomba de Ca^{2+} ou Ca^{2+} ATPase

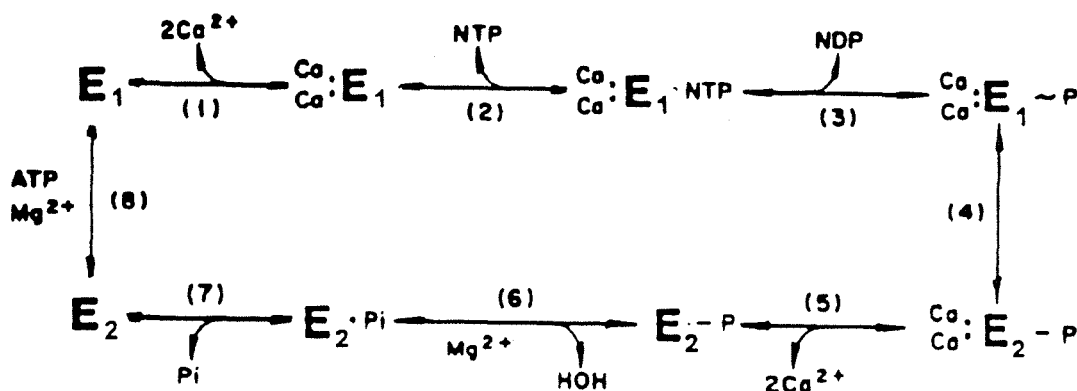
As Ca^{2+} -ATPase de retículo sarco/endoplasmático apresentam um mecanismo de funcionamento semelhante às demais enzimas transportadoras de íons, sendo a participação de um intermediário fosforilado e a existência de dois estados conformacionais as características mais marcantes destas enzimas (De Meis e Vianna, 1979). O princípio básico que norteia este ciclo está baseado na idéia que o transporte ativo contra-gradiente só poderia ser realizado por uma enzima que apresentasse pelo menos 2 estados distintos com diferentes afinidades pela substância transportada e cada estado deveria ter uma orientação oposta em relação

ao plano da membrana (Jardetzky, 1966). Em 1962, Hasselbach e Makinose já haviam proposto algo similar a este modelo de Jardetzky. Segundo Hasselbach e Makinose (1962) uma substância desconhecida tornava-se um transportador do íon cálcio após ser fosforilada na superfície externa do grânulo (microsoma), uma vez que a fosforilação deveria provocar um aumento na afinidade desta substância pelo Ca^{2+} . O complexo Ca^{2+} -transportador fosforilado difundiria para a superfície interna do grânulo, onde o fosfato seria removido e a afinidade da substância pelo Ca^{2+} diminuiria consideravelmente. Esta diminuição na afinidade permitiria a liberação do Ca^{2+} no interior do grânulo onde a concentração de Ca^{2+} é relativamente elevada. A formulação desta idéia por Hasselbach e Makinose (1962) estava baseada nas evidências indiretas que sugeriam a existência de um intermediário fosforilado no transporte de Ca^{2+} , uma vez que microsomas de músculo esqueléticos incubados na presença de Ca^{2+} , Mg^{2+} , ATP e $[^{14}\text{C}] \text{ADP}$ catalisavam a troca $\text{ATP} \leftrightarrow \text{ADP}$ (Hasselbach e Makinose, 1962; Ebashi e Lipmann, 1962). Pelo modelo proposto por estes autores, a energia liberada pela a hidrólise da fosfoenzima seria utilizada para transportar o Ca^{2+} , sendo este liberado no interior da vesícula somente após a hidrólise do intermediário fosforilado. Este modelo estava baseado no conceito clássico proposto por F. Lipmaan (1941) de que a hidrólise de um composto rico em energia (no caso a fosfoenzima que já havia “recebido” ou “absorvido” a energia do ATP) transferiria esta energia para realizar trabalho nas proximidades do seu centro ativo. A proximidade entre o centro catalítico e o local realizador do trabalho na enzima seria fundamental no modelo de Lipmann, uma vez que isto facilitaria a

transferência e melhoraria a eficiência do processo. Segundo este modelo, a energia liberada não seria utilizada para promover modificações significativas na conformação da proteína transportadora.

Embora o pressuposto da existência de pelo menos dois estados da proteína transportadora com diferente afinidade pelo Ca^{2+} viesse a ter confirmação experimental (Ikemoto, 1975; De Meis 1981; Taylor et al. 1986; Arondo et al. 1987; Blasie et al. 1992), a transferência de energia de acordo com o modelo de Lipmman não foi confirmado. Como pode ser observado no esquema do ciclo catalítico e de transporte de Ca^{2+} pela ATPase (Esquema 1), o Ca^{2+} é liberado no interior da vesícula antes da hidrólise da fosfoenzima. Assim, o trabalho é realizado sem que a “energia supostamente absorvida” pela enzima seja liberada. O estudo detalhado das diversas etapas do ciclo da Ca^{2+} -ATPase vieram a demonstrar que as alterações conformacionais na enzima são mais importantes que a energia liberada pela hidrólise da fosfoenzima. De algum modo, a fosforilação da enzima por ATP provoca uma modificação conformacional na enzima que resulta na diminuição da afinidade pelo íon Ca^{2+} . De Meis e colaboradores demonstraram que as alterações nos níveis de energia da fosfoenzima estão relacionadas com modificações na atividade da água no microambiente do centro catalítico da enzima e que durante o ciclo de transporte do Ca^{2+} ocorre uma mudança considerável na constante de hidrólise (K_{eq}) do fosfoaspartil da Ca^{2+} -ATPase e que o trabalho está relacionaddo com esta alteração na K_{eq} (para revisão recente e referências ver De Meis, 1993). Segundo o modelo proposto por De Meis, a modificação na atividade da água no centro ativo da

enzima provocariam modificações no grau de solvatação do resíduo fosforilado da enzima e, conforme o grau de hidrofobicidade do centro ativo da enzima, a hidrólise poderia ocorrer com ou sem liberação de energia. Evidências experimentais que sustentam esta hipótese foram obtidas em diversos laboratórios e demonstram que a variação de energia associada com a hidrólise ou formação de acilfosfatos varia consideravelmente se a concentração da água é modificada pela adição de solventes orgânicos (De Meis et al. 1980; e para mais referências ver De Meis 1993 e Wolosker et al. 1995).



Esquema 1 - Seqüência de Reações da Ca²⁺-ATPase de Reticulo Sarco/endoplasmático. O esquema acima, originalmente proposto por De Meis e Vianna (1979), mostra a seqüência de reações parciais que estão envolvidas no ciclo catalítico e de transporte do íon Ca²⁺ pela Ca²⁺ ATPase. Para mais detalhes ver texto.

Assim, a enzima de músculo, durante o seu ciclo catalítico, liga Ca^{2+} com alta afinidade (K_s para a associação do íon Ca^{2+} está entre 0.1 e 2 μM) no lado citoplasmático da membrana do retículo (Reação 1, ver Esquema 1). Sequencialmente, a enzima liga ATP (Reação 2) e é, então, fosforilada no resíduo 351 (aspartil) sem que ocorra alterações significativas na energia da ligação fosfoanidro (Reação 3). A forma $2\text{Ca}^{2+}:\text{E}1\sim\text{P}$ pode fosforilar o ADP, formando ATP. Esta forma da enzima é chamada de sensível ao ADP e seria uma forma de alta energia. Após a fosforilação ocorre uma modificação conformacional que reduz consideravelmente a afinidade da enzima pelo íon Ca^{2+} (o K_s aumenta de cerca de 1 μM para 1-2 mM) e o sítio de ligação que estava orientado para o lado citoplasmático da membrana do retículo orienta-se para o lúmen do retículo (Reação 4). Esta forma $2\text{Ca}^{2+}:\text{E}-\text{P}$ não pode fosforilar o ADP (sendo, portanto, a forma insensível ao ADP) e de baixa energia. Esta alteração na afinidade possibilita que o Ca^{2+} seja dissociado no interior da vesícula, onde a sua concentração é elevada (Reação 5). Após a dissociação do Ca^{2+} a enzima é desfosforilada (Reação 6 e 7) e pode, então, retornar ao estado conformacional que possui alta afinidade pelo íon Ca^{2+} (Reação 8). A passagem da enzima de uma conformação com baixa afinidade para uma com alta afinidade parece ser a etapa limitante do ciclo catalítico da Ca^{2+} -ATPase de músculo esquelético, sendo que o ATP pode acelerar esta etapa (Vieyra et al. 1979).

V - A Estrutura da Ca^{2+} ATPase de Retículo Sarco/Endoplasmático

O ciclo da Ca^{2+} ATPase apresentado no esquema 1 presuppõe a existência de pelo menos dois estados conformacionais da proteína com diferentes afinidades pelo íon Ca^{2+} , conforme a localização do sítio que liga o Ca^{2+} . Assim, quando o sítio que liga o Ca^{2+} está voltado para o citoplasma (superfície externa da vesícula), ele possui alta afinidade pelo íon; todavia, quando o sítio está voltado para o interior da vesícula a afinidade pelo Ca^{2+} é baixa (De Meis e Vianna, 1979; De Meis, 1981). Considerando esta "movimentação" que o sítio de Ca^{2+} tem que sofrer durante o transporte e o fato de que a fosforilação é fundamental para que ocorra a modificação na afinidade da enzima pelo Ca^{2+} , torna-se importante levar em consideração a topologia das regiões da enzima onde se ligam o Ca^{2+} e o ATP, bem como onde ocorre a fosforilação da Ca^{2+} -ATPase. A natureza geral tanto hidrofílica como hidrofóbica bem como a forma geral assimétrica da Ca^{2+} -ATPase foram estabelecida através do uso de solubilização com detergentes e reconstituição em lipossomos, microscopia eletrônica e difração de raio x e neutrons (Inesi e Asai, 1968; Deamer e Baskin, 1969; Dupont et al. 1973; Brady et al. 1981; 1982, Herbette et al. 1985; Blasie et al. 1992; Inesi et al. 1992). Através destes estudos ficou demonstrado que cerca de 25% da estrutura da Ca^{2+} -ATPase reside dentro da membrana do retículo, enquanto que 70% está em contato com o citoplasma e apenas cerca de 5% da ATPase está em contato com a porção luminal do retículo (Herbette et al. 1985; Taylor et al. 1986; Toyoshima et al. 1993). Após a obtenção do cDNA da enzima (Macienam et al. 1985) e a determinação completa da seqüencia

primária da proteína foi possível se estabelecer um modelo mais detalhado para estrutura da bomba de Ca^{2+} de retículo sarco/endoplasmático (Maclenam et al. 1989; 1992; Inesi et al. 1992; Inesi e Kirtley 1992). Este modelo é apresentado na Figura 2. Basicamente, a Ca^{2+} -ATPase possui 3 regiões distintas do ponto de vista

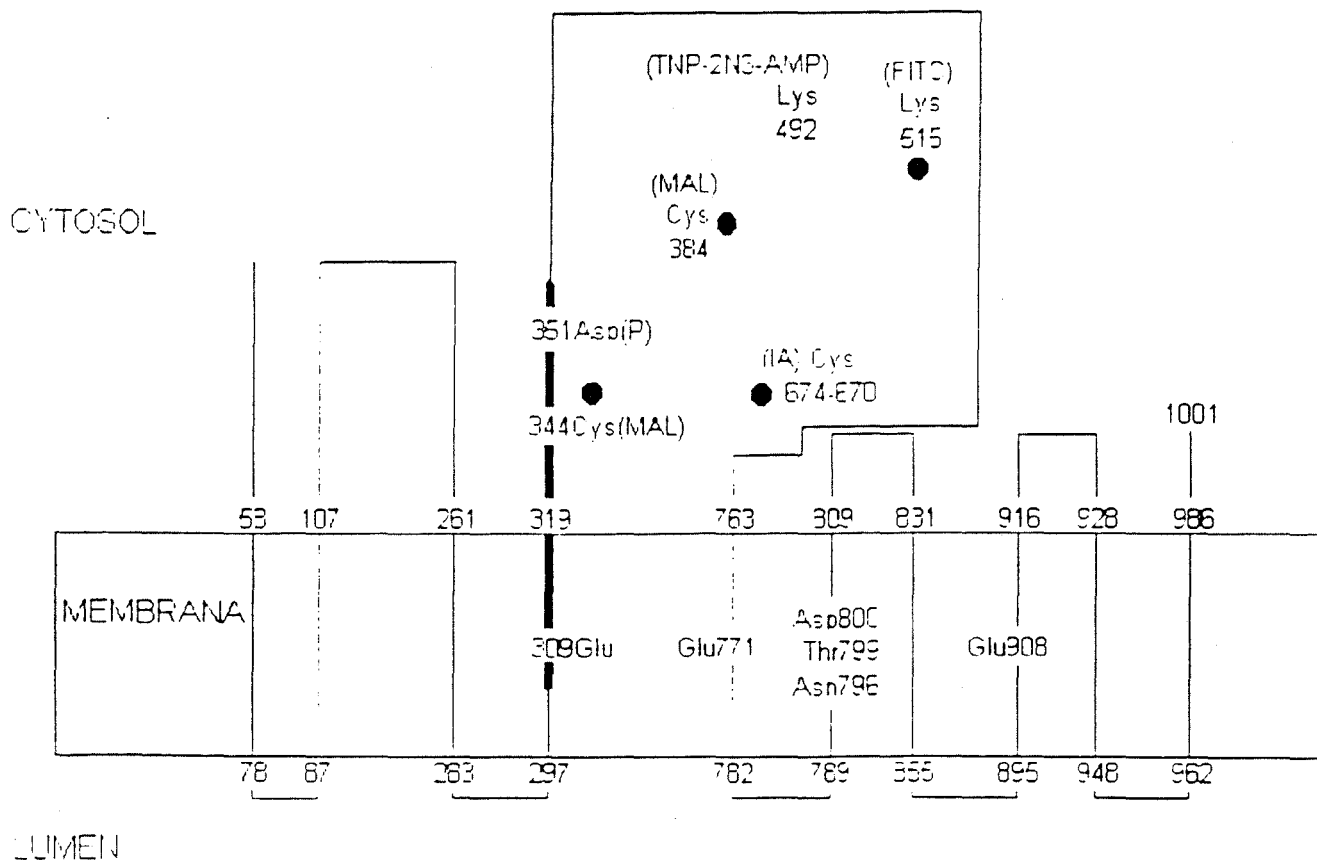


Figura 2 - Modelo da Ca^{2+} -ATPase de Retículo Sarco/Endoplasmático. O modelo mostra as 3 regiões principais da Ca^{2+} -ATPase bem como os resíduos de aminoácidos funcionalmente importantes para a ligação do ATP, fosforilação da enzima e ao transporte de Ca^{2+} .

funcional: 1) um domínio catalítico (onde ocorre a ligação e hidrólise do ATP com a concomitante fosforilação da enzima), 2) um domínio onde liga o Ca^{2+} e 3) um domínio "stalk" que une o domínio catalítico ao domínio de transporte. Estes domínios foram determinados experimentalmente através da modificação química da cadeia lateral de resíduos de aminoácidos específicos (com o uso de reagentes tipo FITC, iodoacetamida, etc) bem com o uso de mutagenese dirigidas a um resíduo específico de aminoácido. Como pode ser observado na Figura 2, o domínio catalítico está localizado na região citoplasmática da enzima e os resíduos mais importantes desta região são o aspartil 351 (que é fosforilado) e o lisil 515 (que é fundamental para a ligação do ATP, uma vez que a derivatização deste resíduo com o FITC abole consideravelmente a ligação do nucleotídeo). O modelo permite observar que o sítio de fosforilação está relativamente próximo ao sítio de ligação do ATP. Estudos com sondas fluorescentes sugerem que a distância entre o lisil 515 e a superfície da membrana é de cerca de 6 nm (Inesi et al. 1992) e entre resíduos localizados na região de fosforilação e um triptofanil localizado na interface externa da membrana do retículo varia entre 3.5 a 4.0 nm (Inesi et al. 1992). Estes dados demonstram claramente que o sítio catalítico está distante do sítio de ligação do Ca^{2+} ; todavia convém ressaltar que talvez uma das primeiras evidências que sugeriam a existência de diferentes locais para fosforilação e transporte de Ca^{2+} foram obtidas, de modo muito elegante, por De Meis e Carvalho (1976). Neste trabalho ficou demonstrado que a fosforilação do ATP formado durante a reversão da bomba ocorria na

superfície externa das vesículas de retículo sarcoplasmático num local diferente daquele por onde o Ca^{2+} passava.

O domínio que liga o Ca^{2+} da enzima está localizado dentro da membrana e provavelmente seja constituído por 4 hélices dos segmentos M4, M5, M6 e M8 que atravessam a membrana formando uma estrutura em forma de canal. Maclennam e colaboradores realizaram um estudo detalhado através do uso de mutações dirigidas a resíduos específicos localizados nas diversas regiões transmembranas da Ca^{2+} -ATPase e concluíram que os resíduos glutamílicos 309, 771 e 908, o resíduo asparagílico 796, o resíduo aspartílico 800 e o resíduo treonílico 799 estão envolvidos na ligação do Ca^{2+} . Demonstraram também que a fosforilação da enzima por P_i , reação esta que é inibida por Ca^{2+} (De Meis 1981), das maioria das enzimas mutadas tem a sensibilidade ao Ca^{2+} abolida ou reduzida consideravelmente (Clarke et al. 1989).

A região "stalk" que estabelece a união entre os domínios catalítico e transportador é bastante conservada nas enzimas transportadoras de íons, sendo que a mutação sítio dirigida ao resíduo tirosílico 763 pode ocasionar o desacoplamento entre o a catálise (hidrólise do ATP) e transporte (Wolosker et al. 1995). Estes dados demonstram claramente que a interação entre o sítio catalítico e o sítio que liga e transporta o Ca^{2+} ocorre a distância e o processo todo ocasiona uma modificação conformacional significativa na Ca^{2+} -ATPase.

A seguir mostra-se um modelo de "marionete" da Ca^{2+} -ATPase proposta por Maclennam e colaboradores, o qual salienta o papel da fosforilação e a mudança

conformacional na região transportadora do íon cálcio que resulta na translocação do íon do citoplasma para o interior da vesícula.

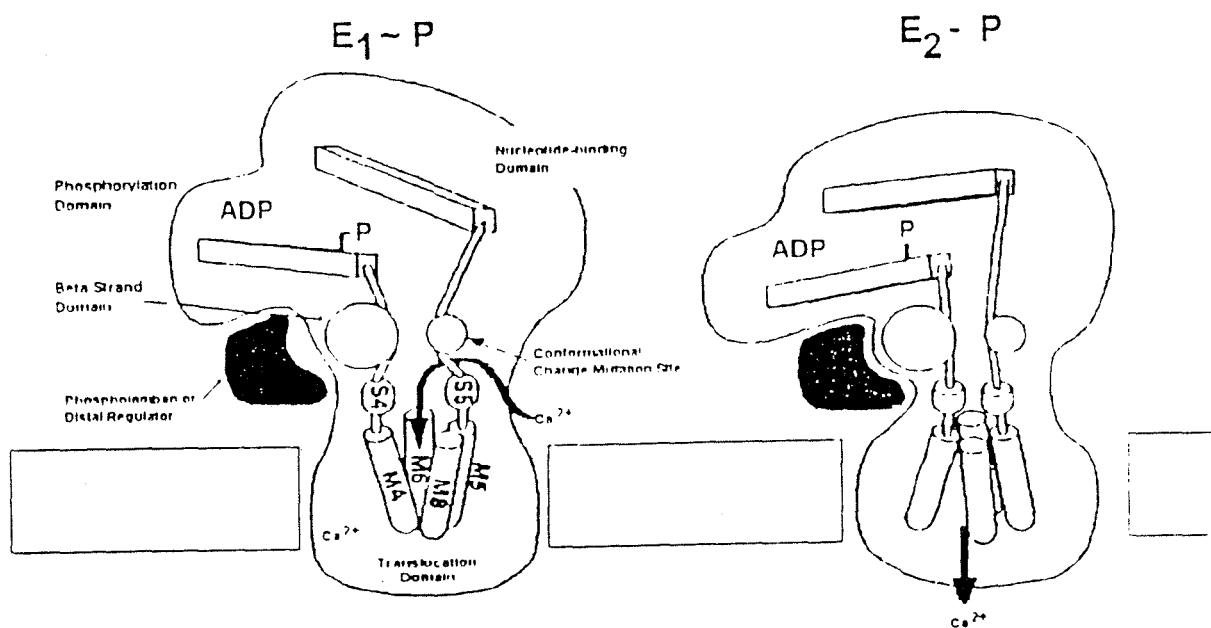


Figura 3 - Modelo de Marionete da Ca^{2+} -ATPase (MacLennan et al. 1992).

VI- A Ca^{2+} -ATPase de Retículo Endoplasmático de Sistema Nervoso

Posteriormente ao estabelecimento do papel da Ca^{2+} -ATPase em retículo sarcoplasmático, diversos autores investigaram a existência desta bomba em vários tecidos, sendo que em sistema nervoso central o interesse foi relativamente maior (De Meis et al. 1970; Blaustein et al. 1978; Papazian et al. 1978; Satomi 1979;

Inamitsu e Ohtsuki, 1984). Em mamíferos, uma das primeiras evidências de que fragmentos do retículo endoplasmático de cérebro eram capazes de transportar Ca^{2+} ativamente foi obtida por De Meis et al. em 1970 (para referências adicionais ver Satomi 1979). Neste trabalho foi demonstrado que o sistema transportador de Ca^{2+} de microsomas de cérebro não apresentava uma maior captação de Ca^{2+} quando se adicionava oxalato (1-4 mM) ao meio. Comportamento este que difere do sistema de músculo esquelético. Todavia, o fosfato inorgânico (4 mM) foi capaz de estimular a captação de Ca^{2+} em microsomas de cérebro de coelho; embora o efeito fosse qualitativamente similar ao observado em retículo sarcoplasmático, quantitativamente a estimulação detectada foi bem menor. Esta ausência de aumento significativo na captação de Ca^{2+} com agentes precipitantes chegou a levar outros pesquisadores a sugerirem que em microsomas de cérebro não existia transporte de Ca^{2+} , mas apenas ligação de Ca^{2+} às membranas dos microsomas (para referências ver Trotta e De Meis, 1975). De Meis et al. (1970) demonstraram também que apesar dos microsomas cerebrais hidrolisarem acetilfosfato, este substrato não promovia a captação de Ca^{2+} . Assim, além de demonstrar que microsomas cerebrais transportavam o íon cálcio ativamente, De Meis e colaboradores obtiveram as primeiras evidências de que existiam diferenças importantes nas propriedades da Ca^{2+} ATPase de retículo endoplasmático localizadas em diferentes tecidos. Apesar de existir indicações de transporte ativo de Ca^{2+} em microsomas cerebrais, a ausência de efeito do oxalato e o pouco efeito do Pi levantava dúvida sobre tal processo. Em 1975, Trotta e De Meis demonstraram que agentes precipitantes tais

como oxalato e Pi podiam aumentar consideravelmente a capacidade de acúmulo de Ca^{2+} por vesículas derivadas da fração microsomal de cérebro de coelhos, mas apenas quando adicionados em concentração relativamente maiores do que aquelas que estimulavam o transporte em músculo (5 a 20 mM). Estes dados talvez reflitam diferenças na permeabilidade das membranas a estes íons ou diferentes propriedades das enzimas de músculo e cérebro. Em 1978, Trota e De Meis demonstraram que tanto a Ca^{2+} ATPase em microsomas intactos ou a enzima solubilizada da fração microsomal de cérebro era capaz de catalisar as reações de troca $\text{ATP} \leftrightarrow \text{Pi}$. Em microsomas intactos a concentração de Ca^{2+} que promovia o maior aumento da troca $\text{ATP} \leftrightarrow \text{Pi}$ estava entre 10 e 100 μM , enquanto que altas concentrações de Ca^{2+} (acima de 200 μM) inibiam o processo de troca. Já com a enzima solubilizada (portanto na ausência de gradiente de Ca^{2+}) concentrações baixas de Ca^{2+} (10 μM), que seriam capazes de saturar apenas o sítio externo de ligação do Ca^{2+} , promoviam uma taxa insignificante de troca $\text{ATP} \leftrightarrow \text{Pi}$. Além disto, ficou demonstrado que a concentração de Ca^{2+} que causava uma estimulação de 50% na velocidade de troca $\text{ATP} \leftrightarrow \text{Pi}$ era similar aquela que promovia uma inibição de 50% da hidrólise de ATP (no caso cerca de 2 mM de Ca^{2+}). Estes dados indicaram que a exposição simultânea da membrana externa e interna de microsomas cerebrais a concentrações Ca^{2+} relativamente baixas (50 μM) estimulavam apenas a degradação do ATP, mas não o processo de troca $\text{ATP} \leftrightarrow \text{Pi}$, enquanto que a exposição a concentrações relativamente altas inibiam a degradação e estimulavam a síntese de ATP. Estes dados suportam a idéia que em concentrações baixas o Ca^{2+}

liga somente ao seu sítio externo de alta afinidade (à pH 7.0, K_s para enzima de cérebro $\cong 50 \mu\text{M}$, que estimularia a hidrólise do ATP), enquanto que em concentrações elevadas o Ca^{2+} se ligaria tanto ao sítio de alta afinidade como ao de baixa afinidade ($K_s \cong 2 \text{ mM}$). A ligação ao sítio de baixa afinidade estimularia a reversão da bomba com a síntese de ATP. Estes dados são essencialmente similares àqueles observados em retículo sarcoplasmático e sugeriram que o mecanismo básico de funcionamento da enzima cerebral era semelhante a do músculo esquelético (embora a afinidade pelo sítio de alta seja menor em cérebro).

VII-As diversas isoformas da Ca^{+2} (SERCA) ATPases

Até o presente momento foram descritas 3 isoformas de Ca^{2+} -ATPase. Estas isoformas apresentam aproximadamente um número similar de resíduos de aminoácidos (cerca de 1000) e entre 75 e 85% de identidade na seqüência primária, estando a diferença entre as isoformas localizadas principalmente na porção carboxi-terminal da proteína (MacLenam et al. 1992). Além disto, os gráficos de hidropatia revelam um similaridade bastante acentuada entre as diversas isoformas e parece existir uma completa homologia para os resíduos que até o momento foram identificados como essenciais a catálise e ao transporte do íon cálcio (MacLennan et al. 1992).

A distribuição tecidual e desenvolvimental das SERCA ATPases é bastante característica, sendo que as fibras musculares esqueléticas de contração rápida de mamíferos adultos expressam exclusivamente a isoforma do tipo 1a, enquanto que

animais neonatos expressam predominantemente a isoforma 1b (ambas as isoformas são resultado do processamento alternativo do produto primário do gene da SERCA 1) (Murayama e MacLenam, 1988).

O produto do gene da isoforma do tipo 2 (SERCA 2) pode sofrer processamento alternativo dando origem a pelo menos 2 isoformas: SERCA 2a e 2b. A SERCA 2a é expressa principalmente em coração e em fibras esqueléticas de contração lenta, sendo a expressão desta isoforma bem menor na musculatura lisa. Na SERCA 2b, os últimos 4 resíduos de aminoácidos da SERCA 2a são substituídos por 49 ou 50 aminoácidos que possuem um caráter bastante hidrofóbico. Assim, as isoformas 2a e 2b são similares até o resíduo de aminoácido número 993 e a porção adicional da SERCA 2b provavelmente origina a 11^a porção transmembrana da bomba de Ca²⁺. Inclusive tem sido demonstrado que a porção carboxiterminal das SERCA 2a e 2b de aves possivelmente estariam em lados opostos da membrana do retículo endoplasmático, estando a porção da SERCA 2a (como a da SERCA 1) voltada para o citoplasma e a da SERCA 2b para o lúmen da vesícula (Campbell et al. 1992) Verboomen et al. (1994) investigaram o papel desta "cauda" hidrofóbica da SERCA 2b e demonstraram que a deleção de apenas 12 resíduos da porção carboxiterminal desta enzima é suficiente para transformar funcionalmente a SERCA 2b em SERCA 2a no que diz respeito à afinidade pelo Ca²⁺, sensibilidade ao vanadato e ao turnover da enzima. A SERCA 2b é expressa na maioria dos tecidos não musculares, sendo a isoforma mais abundante do sistema nervoso central. Miller et al. (1991) demonstraram que a maioria regiões cerebrais apresenta uma

expressão relativamente alta de SERCA 2b, sendo o cerebelo a região mais rica nesta enzima. Em contraste, no estriado não foi possível detectar-se a presença de SERCA 2, embora fatias de estriado permeabilizadas com saponina transportassem Ca^{2+} num nível idêntico ao das outras regiões enriquecidas em SERCA 2.

A SERCA 3 é expressa em alguns tecidos não musculares tais como plaquetas, células linfóides e mastócitos (Bobe et al. 1994; Wuytack et al. 1994). O fato da SERCA 3 possuir uma afinidade baixa pelo Ca^{2+} (Lynton et al. 1992) aumenta a dificuldade em se entender um possível papel fisiológico para as diversidades das SERCAs. Todavia, Bobe et al. (1994) demonstraram que animais espontaneamente hipertensos apresentam um aumento na expressão da SERCA 3 em plaquetas, enquanto que a SERCA 2b (que também é expressa em plaquetas) não sofre modificações na expressão; sugerindo que a SERCA 3 possa ter um papel regulatório neste sistema.

Embora as diversas isoformas apresentem uma grande similaridade no que diz respeito ao mecanismo geral de transporte de Ca^{2+} , evidências recentes têm demonstrado que estas enzimas podem apresentar diferenças em termos de pH ótimo, especificidade de substrato e sensibilidade a inibidores. Assim, MacLennam e colaboradores (Lynton et al. 1992) demonstraram que a isoforma do tipo 3 (SERCA 3) expressa em células COS-1 apresenta uma menor afinidade pelo Ca^{2+} ($1.1 \mu\text{M}$), quando comparada a SERCA 1 ($0.48 \mu\text{M}$), uma maior sensibilidade ao vanadato ($\text{IC}_{50} \cong 10$ vs $\text{IC}_{50} \cong 200 \mu\text{M}$ para SERCA 3 e 1, respectivamente) e um pH ótimo mais alcalino que o da SERCA 1, 2a e 2b. Estas diferenças foram explicadas em termos

de alteração no equilíbrio entre as formas E (ou E1) e E* (ou E2), favorecendo a segunda forma que possui menor afinidade ao Ca^{2+} e é a forma que liga o vanadato. Tem sido descrito também que as isoformas do tipo 2a e 2b expressas no mesmo tipo de célula apresentam diferenças na afinidade ao íon cálcio e ao vanadato, apesar destas serem de menor magnitude daquelas descritas entre a SERCA 1 e 3. Assim, a SERCA 2b possui uma afinidade pelo íon cálcio ($K_{0.5} \cong 0.20 \mu\text{M}$) cerca de 2 vezes maior que a SERCA 2a ($K_{0.5} \cong 0.40 \mu\text{M}$; Lytton et al. 1992; Verboomen et al. 1992; 1994). Todavia, Lytton et al. (1992) consideraram que as diferenças de afinidade entre estas duas isoformas são questionáveis do ponto de vista experimental, uma vez que o baixo nível de captação de Ca^{2+} pela SERCA 2b introduz uma grande incerteza nos pontos obtidos com as concentrações muito baixa de Ca^{2+} . Em relação ao poder inibitório do vanadato, estes autores descreveram uma diminuição no valor do IC_{50} para inibição do transporte de Ca^{2+} ($\text{IC}_{50} \cong 40 \mu\text{M}$ de vanadato para SERCA 2a e $\text{IC}_{50} \cong 100 \mu\text{M}$ de vanadato para SERCA 2b). Como para o caso das SERCA 1 e 3, as diferenças podem ser explicadas em termos de mudanças no equilíbrio entre E1 (ou E) e E2 (ou E*), favorecendo a forma E para o caso da SERCA 2b e a forma E* no caso da SERCA 2a. Alterações no sítio que liga Ca^{2+} parecem pouco provável, uma vez que os aminoácidos que estão envolvidos diretamente na ligação do Ca^{2+} localizam-se nas regiões transmembrana M4, M5, M6 e M8 (Clarke et al. 1989). Todavia, com os dados experimentais disponíveis até o momento, não se pode descartar que as modificações na estrutura primária na região carboxiterminal provoquem alterações à distância na estrutura terciária da Ca^{2+} ATPase que acabem

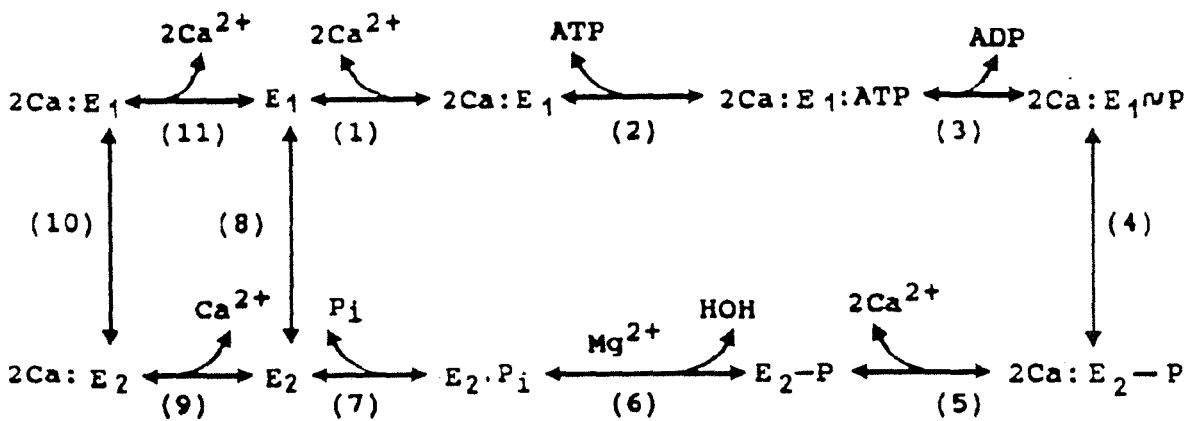
afetando as regiões M4, M5, M6 e M8. Lytton et al. (1992) e Verboom et al. (1994) também demonstraram que a SERCA 2b apresenta um "turnover rate" menor que a SERCA 1, 2a e 3, tanto quando se considera o transporte de Ca^{2+} como a hidrólise de ATP.

VIII- O Fluxo Unidirecional de Ca^{2+} : A Bomba como Canal

Como exposto anteriormente, o sítio catalítico e a região envolvida no transporte do Ca^{2+} estão distantes cerca de 5 nm na Ca^{2+} -ATPase e existe uma comunicação à distância entre estas regiões da enzima. Estudos recentes têm demonstrado que a comunicação entre estas regiões pode ser afetada por uma variedade de compostos, os quais podem fazer a bomba de retículo sarcoplasmático (SERCA 1) se comportar como um canal (Inesi e De Meis, 1989; De Meis et al. 1991; Wolosker et al. 1992; Wolosker e De Meis, 1994; De Meis e Suzano, 1994; para referências adicionais ver Wolosker et al. 1995).

A saída de Ca^{2+} acoplada a síntese de ATP é uma rota bastante conhecida e determinada experimentalmente em diversos laboratórios e envolve a reversão das reações 7,6,5,4,3,2 e 1 do esquema 2 (para referências ver De Meis e Vianna, 1979 e De Meis, 1981). Além desta rota, o Ca^{2+} pode sair através de um estado da ATPase que não está acoplado a síntese de ATP (reações 9,10 e 11 do esquema 2; Galina e De Meis, 1992; Wolosker et al. 1992). A saída através de uma das rotas dependerá de diversos fatores. Na ausência dos ligantes da Ca^{2+} -ATPase pode-se medir um vazamento desacoplado de Ca^{2+} através da ATPase (que funciona como canal),

sendo o efluxo variável conforme o grau de carregamento prévio (De Meis e Suzano, 1991). Tem sido demonstrado que este efluxo pode ser reduzido pela fosforilação da enzima



Esquema 2. Seqüência de Reações da Ca²⁺-ATPase de Reticulo Sarco/Endoplasmático. Nesta seqüência mostra-se as reações 9, 10 e 11 que representam um rota desacoplada para o efluxo de cálcio.

por Pi (Galina e De Meis, 1992); desde que o nível de ADP do meio seja baixo. Na presença de ADP, condições que aumentam a fosforilação da enzima determinam um aumento no efluxo de Ca²⁺ acoplado a síntese de ATP. Além do Pi, diversos ligantes da Ca²⁺ ATPase podem diminuir o efluxo através da rota desacoplada, incluindo o

próprio íon cálcio e os cátions monovalentes potássio e sódio (De Meis et al. 1991). Esta estrutura que funciona como canal na enzima desacoplada provavelmente é a mesma que transporta o Ca^{2+} - ativamente no processo normal de translocação do Ca^{2+} (De Meis e Suzano, 1991).

Uma vez que a fosforilação da Ca^{2+} -ATPase por P_i diminui o efluxo de Ca^{2+} , seria esperado que a inibição desta reação ocasionasse o aumento do efluxo unidirecional de Ca^{2+} . Diversas drogas hidrofóbicas que inibem competitivamente a fosforilação da Ca^{2+} -ATPase de retículo sarcoplasmático por P_i aumentam ~~o~~ consideravelmente o efluxo de Ca^{2+} (De Meis, 1991; Petreski et al. 1989; Wolosker et al. 1992; Wolosker e De Meis, 1994), sendo que a potência em inibir a fosforilação e aumentar o efluxo está relacionado diretamente com a hidrofobicidade destes compostos (Petreski et al. 1989). O efluxo acoplado e desacoplado do Ca^{2+} através da bomba pode ser reduzido pela tapsigargina, um inibidor específico da Ca^{2+} ATPase que forma um complexo com a forma E2 da enzima (Inesi e Sagara, 1994) e aparentemente estabiliza a região transmembrana da Ca^{2+} -ATPase de retículo sarcoplasmático, tanto na presença como na ausência de drogas hidrofóbicas (De Meis e Inesi, 1992). Como a tapsigargina interage estequiometricamente e especificamente com a Ca^{2+} -ATPase, o bloqueio do efluxo desacoplado por este composto sugere fortemente que é através da bomba que o Ca^{2+} sai.

IX- O Uso de Polissacarídeos Sulfatados como Ferramenta no Estudo das Ca^{2+} ATPases

Recentemente De Meis e Suzano (1994) demonstraram que a heparina e uma variedade de polissacarídeos sulfatados inibiam a captação de Ca^{2+} e a hidrólise de ATP estimulada por Ca^{2+} em vesículas derivadas do retículo sarcoplasmático e do sistema de tubular de plaquetas. Investigaram também o efeito da heparina na Ca^{2+} -ATPase de membrana plasmática, Na^+, K^+ -ATPase e F1-ATPase e demonstraram que, além da Ca^{2+} -ATPase de retículo, apenas a Ca^{2+} -ATPase de membrana plasmática era inibida por heparina. Todavia, ao estudar os efeitos de cátions monovalentes (K^+ , Na^+ e Li^+) De Meis e Suzano (1994) observaram que concentrações fisiológicas de K^+ e Na^+ antagonizavam os efeitos inibitórios da heparina e de vários polissacarídeos sulfatados tanto na captação de Ca^{2+} como na hidrólise de ATP. O IC_{50} para inibição do transporte de Ca^{2+} em retículo sarcoplasmático variou entre 1.5 a 5 $\mu\text{g/ml}$ de polissacarídeo. Contrastando com o transporte de Ca^{2+} em músculo, a inibição da captação de Ca^{2+} em plaquetas causada pela heparina foi pouco antagonizada por Na^+ e K^+ , enquanto que a inibição da atividade ATPásica foi completamente revertida por K^+ . Nos dois sistemas, o cátion monovalente lítio foi muito pouco eficaz na reversão dos efeitos inibitórios dos polissacarídeos. Além de ser menos sensível ao antagonismo por sódio e potássio, o transporte de Ca^{2+} em plaquetas se mostrou mais sensível a heparina (IC_{50} para inibição do transporte de Ca^{2+} ficou entre 0.3 a 1 $\mu\text{g/ml}$ de heparina) do que em músculo. Estes resultados sugerem que os polissacarídeos sulfatados podem ser utilizados como ferramentas no estudo de transporte de Ca^{2+}

em diferentes sistemas que expressam isoformas distintas. No caso do trabalho de De Meis e Suzano (1994) foi possível se demonstrar diferenças bem nítidas entre o comportamento da SERCA 1 (músculo) e SERCA 3 e/ou 2b (plaquetas).

Evidências recentes têm sugerido que a Ca^{2+} -ATPase de retículo pode funcionar tanto como uma bomba (acoplada) ou como um tipo de canal (Wolosker et al. 1995). O efluxo acoplado da bomba ocorre pela reversão das reações que estão envolvidas no transporte do Ca^{2+} do meio para o lúmen das vesículas, enquanto que o efluxo desacoplado ocorreria por outra via (ver esquema 2) e seria estimulado por drogas que inibem a fosforilação da enzima por Pi. A fosforilação da Ca^{2+} ATPase por Pi ocorre somente quando a enzima está na forma E* ou E2 (hidrofóbica), sendo esta a forma na qual as drogas hidrofóbicas (fenotiazinas, anestésicos locais) agem inibindo competitivamente a fosforilação da enzima e estimulando o efluxo de Ca^{2+} . Do ponto de vista de hidrofobicidade, a princípio seria de se esperar que os polissacarídeos sulfatados interagissem com uma forma mais hidrofílica da enzima uma vez que estas moléculas podem apresentar uma alta densidade de cargas negativas (Vieira et al. 1991; 1993; Ruggiero et al, 1994). Todavia, os dados experimentais obtidos por De Meis e Suzano mostraram claramente que a heparina liga E* (ou E2), uma vez que o polissacarídeo inibia a fosforilação da enzima por Pi sem afetar a fosforilação por ATP. De acordo com estes resultados, ficou demonstrado também que a reversão da bomba era desacoplada pela heparina que aumentava em cerca de duas vezes o efluxo passivo de Ca^{2+} .

Os proteoglicanos (glicosaminoglicanos ou polissacarídeos sulfatados ligados covalentemente a proteínas) desempenham uma enorme variedade de

funções. As funções mais bem estabelecidas dos proteoglicanos incluem o papel mecânico essenciais à manutenção da integridade do tecido conjuntivo, participação nos processos de adesão celular e, mais recentemente, têm sido demonstrado que tais moléculas participam de processos desenvolvimentais e provavelmente estão envolvidos na morfogênese e diferenciação celular. Assim, em sistema nervoso têm sido demonstrado que os proteoglicanos participam no controle da proliferação celular, na migração de neurônios, na estabilização de sinapses, na ligação e modulação dos efeitos exercidos por fatores neurotróficos e podem estimular o crescimento axonal e participar da diferenciação neuronal (Stipp et al. 1991; Dow et al, 1991; Oohira et al. 1994).

Normalmente os proteoglicanos estão associados com a matrix extracelular ou com a superfície celular (Kjellen & Lindahl, 1991). Todavia, estes compostos podem ser encontrados intracelularmente, em diversos compartimentos (Fedarko e Conrand, 1986; Ishihara et al. 1987; Yanagishita e Hascall, 1992); mas em geral eles estão associados com vesículas secretoras. Alguns autores têm demonstrado que heparan sulfato pode ser encontrado intracelularmente fazendo parte de um "pool" citoplasmático e nuclear (Fedarko e Conrad, 1986; Ishihara et al. 1987). Inclusive, no núcleo, o heparan sulfato pode ser encontrado não ligado a proteínas. Baseando-se no fato de que a velocidade de síntese e degradação do heparan sulfato, bem como a sua estrutura química, se alteravam com estado metabólico da célula, estes autores propuseram que o heparan sulfato pode funcionar como regulador do metabolismo.

X- O Papel do Ca^{2+} como Indutor da Morte Celular

Embora o Ca^{2+} desempenhe um papel fundamental na regulação de diversos processos intracelulares (Ebashi 1993), nos últimos anos têm se acumulado evidências indicando que em diversas situações patológicas, alterações na homeostase do Ca^{2+} se constituem num processo central de lesão e morte celular (Nicotera et al. 1992; Harman e Maxwell, 1995). Assim, o aumento dos níveis intracelulares de Ca^{2+} estão normalmente associados com o dano irreversível da célula. Todavia, convém ressaltar que o papel do íon cálcio não é o desencadeador, isto é, o aumento do Ca^{2+} normalmente não precede a injúria celular; entretanto, este aumento contribui, em fases posteriores, para ativar diversos processos degradativos intracelulares. Dentro destes podemos citar a desorganização do citoesqueleto e ativação de enzimas catabólicas dependentes de cálcio, como proteases, fosfolipases e endonucleases (Harman e Maxwell, 1995).

Aumentos persistentes ou transitórios nos níveis de Ca^{2+} têm sido observados após a exposição a agentes tóxicos, como tetracloreto de carbono, clorofórmio, tert-butilhidroperóxido, mercúrio inorgânico e orgânico (Rossi et al, 1991; Nicotera & Orrenius, 1992; Nicotera et al, 1992; Rossi et al, 1993). Aumentos nos níveis intracelulares de Ca^{2+} também têm sido observados em situações de hipóxia, sendo que algumas evidências têm indicado que o aumento inicial do Ca^{2+} intracelular durante tal processo provem dos depósitos intracelulares (Krnjevic e Xu, 1989; Katchman et al. 1993; Martin et al., 1994). Durante a hipóxia, além do aumento do Ca^{2+} intracelular, ocorrem alterações importantes nas concentrações intracelulares e extracelulares de sódio e potássio (Kiedrowski et al, 1994a,b; Martin

et al, 1994;). Assim, durante a hipóxia, o K^+ extracelular aumenta e o intracelular diminui, tanto pelo aumento da condutância a este íon quanto como consequência da inibição da Na^+,K^+ -ATPase, embora a inibição desta enzima aparentemente não esteja envolvida no aumento inicial do K^+ extracelular (Martin et al. 1994). Além destas alterações, a hipoxia provoca um queda do pH tanto intracelular quanto extracelular (Kraig et al. 1985; Koyano et al. 1993). Tem sido demonstrado também que o pH intracelular pode variar consideravelmente em diversas situações metabólicas não patológicas; podendo, portanto, o pH desempenhar um papel importante na regulação do metabolismo (Bussa e Nuccitelli, 1984).

Um aspecto interessante em relação ao efeito do abaixamento do pH sobre o estudo aqui realizado reside no fato que diversos autores têm obtido evidências demonstrando que durante a acidose os canais de Ca^{2+} localizados nas cisternas das células musculares apresentam redução em suas condutâncias. Além, disto Wolosker et al. (1994) demonstraram que agentes fisiológicos que normalmente bloqueiam a saída de Ca^{2+} através da bomba em pH neutro (K^+ , Ca^{2+} e Mg^{2+}) são inefetivos em pH ácido (6.0). Assim, durante a hipóxia, o efluxo de cálcio através da bomba pode ter um papel fundamental para os processos patológicos associados com o aumento do Ca^{2+} intracelular.

OBJETIVOS DO ARTIGO 1

O primeiro artigo teve como objetivos principais determinar o efeito de diversos polissacarídeos sulfatados sobre o transporte de Ca^{2+} em microsomas de cérebro de ratos, uma vez que em trabalhos anteriores ficou demonstrado que os polissacarídeos poderiam servir como ferramentas para estudar as propriedades das diferentes isoformas da Ca^{2+} -ATPase de retículo sarco/endoplasmático. Assim, investigou-se o efeito da heparina, dextran sulfato 8.000, dextran sulfato 500.000 e do codroitim fucosilado ramificado e sulfatado de pepino do mar. Algumas experiências foram realizadas com codroitim modificado quimicamente (desulfatado ou carboxireduzido) com o intuito de determinar o papel destas cargas negativas no poder deste composto em interagir com a Ca^{2+} -ATPase de microsomas de cérebro de ratos. Com estes polissacarídeos foi possível investigar, de modo geral, a influência de diversos fatores que interferem com a interação dos polissacarídeos com proteínas tais como composição química, tamanho e carga destes açúcares. Além disto, investigamos o efeito dos cátions monovalentes K^+ , Na^+ e Li^+ pelo fato que em condições de despolarização durante o funcionamento normal das células nervosas e em situações patológicas podem ocorrer alterações consideráveis nas concentrações de K^+ e Na^+ que poderiam alterar um possível papel regulatório que os polissacarídeos pudessem ter in vivo. Além disto, estes cátions podem interagir com a Ca^{2+} ATPase e podem influenciar a interação dos polissacarídeos sulfatados com outras proteínas. Investigamos também a interação da trifluoperazina, uma molécula hidrofóbica que pode interferir com o transporte de Ca^{2+} em SERCA1 (retículo sarcoplasmático), desacoplando o sítio catalítico do processo de translocação de Ca^{2+} . Têm sido sugerido que a trifluoperazina estabiliza a Ca^{2+} -

ATPase no estado E2 e como De Meis e Suzano (1994) demonstraram que a heparina interage com a forma E* da SERCA 1 seria esperado, a princípio, que trifluoperazina pudesse influenciar no efeito inibitório dos polissacarídeos.

Alteration of Ca^{2+} Fluxes in Brain Microsomes by K^+ and Na^+ : Modulation by Sulfated Polysaccharides and Trifluoperazine

Joao B. T. Rocha, *Herman Wolosker, †Diogo O. Souza, and *Leopoldo de Meis

Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria;

*Departamento de Bioquímica Médica, Instituto de Ciências Biomédicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro; and †Departamento de Bioquímica, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

Abstract: Rat brain microsomes accumulate Ca^{2+} at the expense of ATP hydrolysis. The rate of transport is not modulated by the monovalent cations K^+ , Na^+ , or Li^+ . Both the Ca^{2+} uptake and the Ca^{2+} -dependent ATPase activity of microsomes are inhibited by the sulfated polysaccharides heparin, fucosylated chondroitin sulfate, and dextran sulfate. Half-maximal inhibition is observed with sulfated polysaccharide concentrations ranging from 0.5 to 8.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$. The inhibition is antagonized by KCl and NaCl but not by LiCl. As a result, Ca^{2+} transport by the native vesicles, which in the absence of polysaccharides is not modulated by monovalent cations, becomes highly sensitive to these ions. Trifluoperazine has a dual effect on the Ca^{2+} pump of brain microsomes. At low concentrations (20–80 μM) it stimulates the rate of Ca^{2+} influx, and at concentrations $>100 \mu\text{M}$ it inhibits both the Ca^{2+} uptake and the ATPase activity. The activation observed at low trifluoperazine concentrations is specific for the brain Ca^{2+} -ATPase; for the Ca^{2+} -ATPases found in blood platelets and in the sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle, trifluoperazine causes only a concentration-dependent inhibition of Ca^{2+} uptake. Passive Ca^{2+} efflux from brain microsomes preloaded with Ca^{2+} is increased by trifluoperazine (50–150 μM), and this effect is potentiated by heparin (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$), even in the presence of KCl. It is proposed that the Ca^{2+} -ATPase isoform from brain microsomes is modulated differently by polysaccharides and trifluoperazine when compared with skeletal muscle and platelet isoforms. **Key Words:** Ca^{2+} uptake— Ca^{2+} -ATPase—Brain microsomes—Polysaccharides—Heparin—Trifluoperazine—Glycosaminoglycans. *J. Neurochem.* **66**, 772–778 (1996).

Vesicles derived from the microsomal fraction of the brain retain a membrane-bound Ca^{2+} -ATPase that pumps Ca^{2+} from the medium to the lumen of the vesicles at the expense of ATP hydrolysis in a manner similar to that described for the Ca^{2+} -ATPase from sarcoplasmic reticulum or blood platelets (de Meis et

al., 1970; Trotta and de Meis, 1975, 1978; Blaustein et al., 1978).

At least three sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA) isoforms are found in different tissues. Brain expresses predominantly SERCA_{2b}, which is a product formed by alternative splicing of the SERCA₂ gene (Guteski-Hamblin et al., 1988; Lytton and MacLennan, 1988; Miller et al., 1991). Fast-twitch skeletal muscle expresses SERCA₁, whereas SERCA₃ is found in several nonmuscle cells (Burk et al., 1989). Some tissues, such as blood platelets and lymphoid cells, express both SERCA_{2b} and SERCA₃ isoforms (Wuytack et al., 1994). The physiological implications of isoform diversity are not clear.

Recently, it has been shown that sulfated polysaccharides and trifluoperazine affect Ca^{2+} transport in sarcoplasmic reticulum by a mechanism different from that of platelet Ca^{2+} -ATPase isoforms (de Meis and Suzano, 1994; Engelender et al., 1995). As it has been shown that these compounds interact with the E₂ conformation of the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase (de Meis, 1991; de Meis and Inesi, 1992), they could be used as a tool to study the kinetic properties of different Ca^{2+} -ATPase isoforms. Furthermore, because sulfated polysaccharides are found in various intracellular compartments (Fedarko and Conrad, 1986; Ishihara et al., 1987; Kjellen and Lindahl, 1991), they may play a role as modulators of intracellular Ca^{2+} transport. In the present study, we found that

Received May 17, 1995; revised manuscript received August 8, 1995; accepted September 5, 1995.

Address correspondence and reprint requests to Dr. L. de Meis at Departamento de Bioquímica Médica, Instituto de Ciências Biomédicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 21941-590 Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

Abbreviations used: Ins-P₃, inositol 1,4,5-trisphosphate; MOPS, 3-(*N*-morpholino)propanesulfonic acid; SERCA, sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase.

sulfated polysaccharides inhibit Ca²⁺ uptake in brain microsomes and rendered the pump sensitive to variations in monovalent cation concentrations that occur under several neuropathological conditions (Lees, 1991; Kiedrowski et al., 1994a,b). Trifluoperazine stimulated the Ca²⁺ uptake in brain microsomes, and this effect was abolished by heparin. These properties are different from those observed in skeletal muscle and blood platelet SERCA isoforms and probably reflect differences among the Ca²⁺ pumps from these tissues, in particular, differences in their E₂ conformations.

MATERIALS AND METHODS

Preparation of microsomes

Whole brains from adult rats were dissected and frozen immediately in liquid nitrogen. Brains (30 g) were homogenized in 200 ml of a medium containing 0.32 M sucrose, 10 mM 3-(*N*-morpholino)propanesulfonic acid (MOPS)-Tris (pH 7.4), and 0.2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride. The homogenate was centrifuged at 47,000 g for 15 min. The pellet was discarded and the supernatant was centrifuged at 120,000 g for 40 min to yield the microsomal pellet. The pellet was resuspended and recentrifuged as above. The final pellet was resuspended in 0.32 M sucrose, 10 mM MOPS-Tris (pH 7.0) and frozen in liquid nitrogen.

Cerebellar microsomes were prepared according to Supatapone et al. (1988a). Light sarcoplasmic reticulum vesicles were prepared as described by Eletr and Inesi (1972). Vesicles derived from the dense tubular system of blood platelets were prepared according to Le Peuch et al. (1983).

Ca²⁺ uptake

[⁴⁵Ca]CaCl₂ accumulation was measured by filtration through Millipore filters (0.45 μm). After filtration, the filters were flushed with 25 ml of 3 mM La(NO₃)₃ and the radioactivity remaining on the filters was counted in a scintillation counter. The Ca²⁺ uptake measured with the different vesicle preparations was inhibited by vanadate (2 mM) and was not affected by carbonyl cyanide *p*-trifluoromethoxyphenyl hydrazone (FCCP) (10 μM) or oligomycin (2 μg/ml).

ATPase activity

ATP hydrolysis was determined by measuring the release of P_i from [^γ-³²P]ATP as previously described (Grubmeyer and Penefsky, 1981). Mg²⁺-dependent ATPase activity was measured in the presence of 2 mM EGTA. The Ca²⁺-stimulated ATPase activity was determined by subtracting Mg²⁺-dependent ATPase activity from the ATPase activity measured in the presence of both Mg²⁺ and Ca²⁺.

Ca²⁺ efflux

Vesicles were preloaded with [⁴⁵Ca]CaCl₂ in a medium containing 50 mM MOPS-Tris (pH 7.0), 5 mM MgCl₂, 20 mM P_i, 0.04 mM CaCl₂, 4 mM ATP, and vesicle protein (0.1 mg/ml). After 40 min at 35°C, the vesicles were sedimented by centrifugation and the walls of the tubes were blotted to minimize the volume of the residual loading medium. The pellets (1 mg of protein each) were kept on ice and resuspended in 2 ml of ice-cold 0.25 M sucrose containing 10 mM MOPS-Tris (pH 7.0). The suspension was

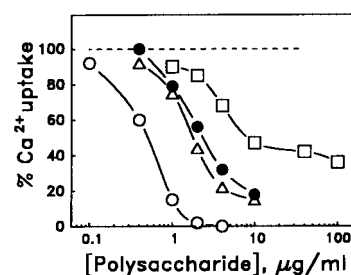


FIG. 1. Inhibition of Ca²⁺ uptake by different sulfated polysaccharides in brain microsomes. The assay medium composition was 50 mM MOPS-Tris (pH 7.0), 5 mM MgCl₂, 20 mM P_i, 2 mM ATP, 40 μM CaCl₂, and 50 μg/ml brain microsome protein. After 45-min incubation at 35°C, the reaction was stopped as described in Materials and Methods. (○), Dextran sulfate 500,000; (△), fucose-branched chondroitin sulfate; (●), dextran sulfate 8,000; (□), heparin. Ca²⁺ uptake control level (dashed line) ranged from 163 to 214 nmol/mg of protein/45 min for four to nine experiments with different vesicle preparations. The SEM was <10%.

diluted immediately into the efflux media to a final vesicle protein concentration of 0.05 mg/ml. The efflux was arrested as described above for Ca²⁺ uptake.

Chemicals

Trifluoperazine, heparin from porcine intestinal mucosa, chondroitin 6-sulfate from shark cartilage, chondroitin 4-sulfate from whale cartilage, dextran sulfate 8,000, and dextran sulfate 500,000 were obtained from Sigma Chemical (St. Louis, MO, U.S.A.). Native and chemically modified fucose-branched chondroitin sulfate from sea cucumber was prepared and purified as described by Ruggiero et al. (1994). [⁴⁵Ca]CaCl₂ was purchased from New England Nuclear. All other reagents were of analytical grade.

RESULTS

Effects of polysaccharides on Ca²⁺ transport

In the absence of monovalent cations, different sulfated polysaccharides inhibited both the Ca²⁺ uptake and the Ca²⁺-dependent ATPase activity of brain microsomes (Fig. 1). The concentrations of dextran 500,000, fucosylated chondroitin sulfate, dextran 8,000, and heparin that promote half-maximal inhibition were 0.5 ± 0.02 (n = 6), 2.2 ± 0.2 (n = 4), 2.9 ± 0.1 (n = 8), and 6.0 ± 0.3 (n = 9), for Ca²⁺ uptake, and 1.0 ± 0.1 (n = 4), 2.1 ± 0.1 (n = 3), 3.7 ± 0.3 (n = 4), and 7.6 ± 0.5 (n = 4), for ATPase activity, respectively (mean ± SEM). Heparin caused a maximum 65% inhibition of Ca²⁺ uptake, and the other sulfated polysaccharides promoted up to 90–100% inhibition (Fig. 1). Polysaccharides that have a lower sulfate content than heparin, such as chondroitin 4-sulfate and chondroitin 6-sulfate (up to 100 μg/ml), were ineffective (data not shown). Desulfation of fucose-branched chondroitin sulfate decreased the inhibitory potency of the compound by about two orders of magnitude. In contrast, chemical reduction of carboxyl

TABLE 1. Inhibition of Ca^{2+} uptake by polysaccharides and differential effects of K^+ , Na^+ , and Li^+

	Ca^{2+} uptake (nmol/mg of protein/45 min)					
	No addition	Heparin (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	Fucosylated chondroitin (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	Dextran 8,000 (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	Dextran 500,000 (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	Dextran 500,000 (4 $\mu\text{g}/\text{ml}$)
Control	213 \pm 17 (100%)	76 \pm 5 (36%)	6 \pm 1 (3%)	29 \pm 3 (14%)	50 \pm 5 (23%)	4 \pm 1 (2%)
KCl	228 \pm 18 (100%)	199 \pm 11 (87%)	153 \pm 16 (67%)	235 \pm 20 (103%)	130 \pm 15 (57%)	91 \pm 10 (40%)
NaCl	210 \pm 19 (100%)	120 \pm 10 (57%)	79 \pm 9 (38%)	137 \pm 11 (65%)	100 \pm 10 (48%)	7 \pm 1 (3%)
LiCl	207 \pm 22 (100%)	65 \pm 5 (31%)	5 \pm 1 (2%)	23 \pm 2 (11%)	50 \pm 5 (24%)	1 (1%)

Ca^{2+} uptake was measured in brain microsomes either in the absence or in the presence of 100 mM monovalent cations. The conditions were the same as in Fig. 1. The values of Ca^{2+} uptake represent the mean \pm SEM values of three to seven experiments with different preparations. The values in parentheses are the percentages of the Ca^{2+} uptake in relation to those in the absence of polysaccharides.

groups of native fucose-branched chondroitin sulfate did not affect significantly the inhibitory potency of the compound (data not shown). These data indicate that inhibition of Ca^{2+} transport in brain microsomes by sulfated polysaccharides is related to the sulfate content of the molecules.

The Ca^{2+} transport of brain microsomal vesicles as obtained after cell fractionation was not affected by physiological concentrations of monovalent cations (Table 1 and Fig. 2). However, in the presence of polysaccharides, Ca^{2+} uptake became highly sensitive to these cations. KCl and NaCl antagonized the inhibition of Ca^{2+} uptake promoted by sulfated polysaccharides, whereas LiCl, up to a concentration of 100 mM, had no effect (Table 1 and Fig. 2). The relative efficiency of Na^+ and K^+ varied depending on both the species and the concentration of polysaccharide used

(Table 1 and Fig. 2). For the inhibition promoted by 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ heparin, K^+ and Na^+ were equally effective in antagonizing the inhibition and the rates of Ca^{2+} uptake measured in the presence of these two ions were practically the same (Fig. 2). In the presence of 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ heparin, 100 mM KCl was more effective than NaCl in antagonizing the inhibition (Fig. 2). The difference between the effects of K^+ and Na^+ became more apparent with the use of 1 and 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ dextran 500,000 (Table 1). Similar results were observed with the use of dextran 8,000 and fucosylated chondroitin (Table 1). K^+ and Na^+ (but not Li^+) were able to antagonize the effects of polysaccharides on ATPase activity with the same relative efficiency as observed for the Ca^{2+} uptake (data not shown).

In a previous report, we have shown that sulfated polysaccharides inhibit the Ca^{2+} -ATPase isoforms found in skeletal muscle and blood platelets (de Meis and Suzano, 1994). The effects of monovalent cations, however, appear to vary greatly depending on the isoform used. For the Ca^{2+} -ATPase found in blood platelets, KCl and NaCl were not effective as antagonists of sulfated polysaccharides. The inhibition of muscle Ca^{2+} -ATPase is reversed by monovalent cations; but in this case, K^+ and Na^+ are equally effective in antagonizing the effect of the polysaccharides under all conditions used (de Meis and Suzano, 1994). Thus, the discrimination between the effects of K^+ and Na^+ shown in this report appears to be specific for brain Ca^{2+} -ATPase.

The inhibition of Ca^{2+} transport in brain microsomes by sulfated polysaccharides is due to ATPase inhibition and not to a significant increase in passive Ca^{2+} permeability of the vesicles. This was measured first by loading the vesicles with Ca^{2+} and then diluting in a medium containing EGTA. The Ca^{2+} efflux rate was increased twofold by 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ dextran sulfate

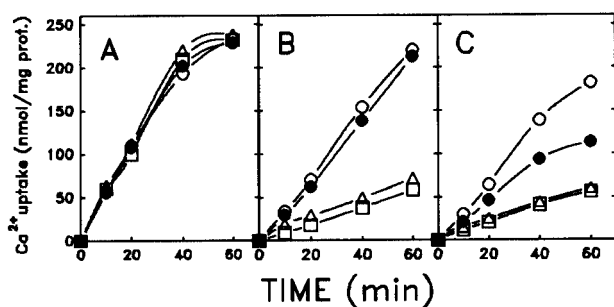


FIG. 2. Effects of various heparin concentrations on susceptibility to monovalent cations in brain microsome Ca^{2+} uptake. The assay medium and experimental conditions were as in Fig. 1 either in the absence (\square) or in the presence of 100 mM KCl (\circ), 100 mM NaCl (\bullet), or 100 mM LiCl (\triangle). Ca^{2+} uptake was measured either in the absence (**A**) or in the presence of 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (**B**) or 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (**C**) heparin. The values are the mean value of three independent experiments with three different vesicle preparations. The SEM was $<10\%$.

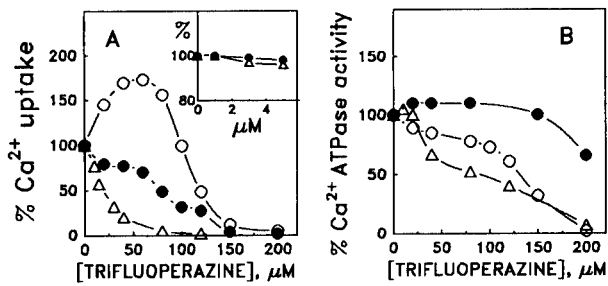


FIG. 3. Effects of trifluoperazine on Ca²⁺ uptake (A) and Ca²⁺-ATPase activity (B) in microsomes from brain, skeletal muscle, and blood platelets. The assay medium contained 50 mM MOPS-Tris (pH 7.0), 5 mM MgCl₂, 100 mM KCl, 20 mM P_i, 2 mM ATP, and 40 μM CaCl₂. The medium contained 300 μM instead of 40 μM CaCl₂ in the experiments performed with sarcoplasmic reticulum vesicles and 10 mM instead of 20 mM P_i with blood platelet vesicles. **A:** Ca²⁺ uptake measured in the presence of [⁴⁵Ca]CaCl₂. **Inset:** Data obtained with 1–5 μM trifluoperazine on an expanded scale. **B:** Ca²⁺-ATPase activity measured in the presence of [γ-³²P]ATP. Brain microsomes (○), sarcoplasmic reticulum vesicles (●), or blood platelet vesicles (Δ) were added to a final concentration of 50 μg/ml. The reaction was stopped after 45 (○, Δ) or 5 min (●) at 35°C. Ca²⁺ uptake (100%) was 188 ± 12 nmol/mg (○), 4.0 ± 0.2 μmol/mg (●), and 120 ± 15 nmol/mg (Δ). ATPase activity (100%) was 3.3 ± 0.8 μmol/mg (○), 2.5 ± 0.3 μmol/mg (●), and 300 ± 24 nmol/mg (Δ). Data are the mean ± SEM values of three experiments with different preparations.

500,000, and this effect was almost completely antagonized by KCl (data not shown). Under the same conditions, 10 μg/ml of either dextran sulfate 8,000, fucose-branched chondroitin sulfate, or heparin caused only a negligible increase in Ca²⁺ efflux (data not shown).

Effect of trifluoperazine on Ca²⁺ transport of different SERCA isoforms

A variety of hydrophobic drugs such as phenothiazines and local anesthetics have been shown to inhibit the phosphorylation of sarcoplasmic reticulum ATPase by P_i and to increase the Ca²⁺ efflux from sarcoplasmic reticulum vesicles (de Meis, 1991; de Meis and Inesi, 1992; Wolosker et al., 1992; Wolosker and de Meis, 1994). These effects were attributed to interaction of the drugs with the enzyme form E₂, promoting the opening of the transmembrane channel-like part of the Ca²⁺-ATPase. In sarcoplasmic reticulum, trifluoperazine (up to 150 μM) inhibited the Ca²⁺ uptake completely (Fig. 3A) but had practically no effect on ATPase activity (Fig. 3B; de Meis et al., 1988; Wolosker et al., 1990). We now show that the effect of trifluoperazine varied depending on the SERCA isoform used. In platelet microsomal vesicles, in contrast to the sarcoplasmic reticulum, trifluoperazine inhibited both Ca²⁺ uptake and Ca²⁺-ATPase activity. In platelets, the concentration required for half-maximal inhibition was lower than that needed in sarcoplasmic reticulum (Fig. 3). In contrast to sarcoplasmic reticulum and blood platelets, trifluoperazine (20–80 μM) caused a

significant stimulation of Ca²⁺ uptake in brain microsomes. The effect was biphasic, and inhibition was observed as the concentration of the drug was raised >100 μM (Fig. 3A). Ca²⁺-ATPase activity was not activated by trifluoperazine and significant inhibition of ATP hydrolysis occurred only with concentrations >100 μM (Fig. 3B). Note that trifluoperazine did not activate Ca²⁺ uptake in sarcoplasmic reticulum or blood platelets even at concentrations 10 times lower than those that activate Ca²⁺ uptake in brain microsomes (Fig. 3, inset).

The cerebellum is the brain region with the highest expression of the SERCA_{2b} isoform (Miller et al., 1991). As also observed in whole brain, trifluoperazine activated Ca²⁺ uptake in cerebellar microsomes (data not shown). Thapsigargin (2 μM), a highly specific inhibitor of Ca²⁺ transport by SERCA isoforms (Thastrup et al., 1990), abolished stimulation of Ca²⁺ uptake by trifluoperazine (data not shown). A fraction of Ca²⁺ uptake in brain microsomes (~30%) was insensitive to thapsigargin (data not shown and Verma et al., 1990; Kijima et al., 1991). This contrasts with platelet and sarcoplasmic reticulum vesicles, which are inhibited completely by thapsigargin (Kijima et al., 1991; Benech et al., 1995). Ruthenium red (200 μM) and inositol 1,4,5-trisphosphate (Ins-P₃) (5 μM) did not modify the effect of trifluoperazine (data not shown).

Effects of trifluoperazine on Ca²⁺ fluxes and modulation by heparin

To determine whether activation of Ca²⁺ uptake by trifluoperazine was due to an increase in Ca²⁺ influx, or alternatively, to a decrease in passive Ca²⁺ permeability, we measured the rate of Ca⁴⁰/Ca⁴⁵ exchange after Ca²⁺ uptake reached a steady state. At the steady state, the rates of Ca²⁺ influx and Ca²⁺ efflux were the same and could be measured by the addition of trace amounts of radioactive Ca²⁺. Trifluoperazine (50 μM) stimulated Ca²⁺ uptake in brain microsomes by increasing Ca²⁺ exchange, and hence the rate of Ca²⁺ influx (Fig. 4). Note that ATPase activity was not affected at this drug concentration (Fig. 3B). This indicates that trifluoperazine increases the rate of Ca²⁺ influx by enhancing the efficiency of the Ca²⁺ pump, rather than by decreasing the passive Ca²⁺ permeability of the vesicles.

In the presence of 100 mM KCl, the activation of Ca²⁺ uptake promoted by trifluoperazine was extended to higher trifluoperazine concentrations (compare Fig. 5A and B). Heparin (10 μg/ml) abolished the stimulation of Ca²⁺ uptake promoted by trifluoperazine (Fig. 5). This was also observed in the presence of 100 mM KCl (Fig. 5B). Notice that the inhibitory effect of 10 μg/ml heparin measured without trifluoperazine was almost totally abolished by 100 mM KCl (Fig. 2).

The Ca²⁺ efflux from brain microsomes previously loaded with Ca²⁺ was increased by trifluoperazine

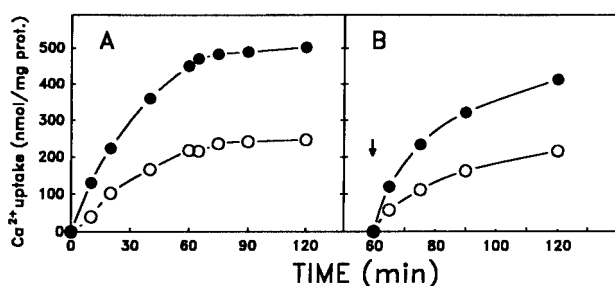


FIG. 4. Stimulation by trifluoperazine of Ca^{2+} uptake (A) and steady-state Ca^{2+} exchange (B) in brain microsomes. The reaction was performed at 35°C in a medium containing 50 mM MOPS-Tris (pH 7.0), 5 mM MgCl_2 , 20 mM P_i , 3 mM ATP, 40 μM CaCl_2 , 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ brain microsomal protein, with either no trifluoperazine (\circ) or 50 μM trifluoperazine (\bullet). **A:** [^{45}Ca] CaCl_2 was added to the medium before the addition of microsomes. **B:** Ca^{2+} uptake was performed in the presence of nonradioactive CaCl_2 , and after 60 min of incubation, a tracer amount of ^{45}Ca was added (arrow) to measure Ca^{2+} influx rate. Values are the means of three independent experiments. SEM was $<10\%$.

(Fig. 6). Addition of 100 mM KCl decreased the enhancement of Ca^{2+} efflux promoted by trifluoperazine (Fig. 6B). Heparin potentiated the effect of trifluoperazine on Ca^{2+} efflux, and this effect was observed even in the presence of 100 mM KCl (Fig. 6). Notice that the concentrations of trifluoperazine that increase the rate of Ca^{2+} efflux in brain microsomes were the same as those that enhance the rates of Ca^{2+} uptake and Ca^{2+} exchange (Figs. 3 and 4).

DISCUSSION

Sulfated polysaccharides are present in different tissues, including the CNS, but their physiological role is poorly understood (Fedarko and Conrad, 1986; Ishihara et al., 1987; Kjellen and Lindahl, 1991; Faissner

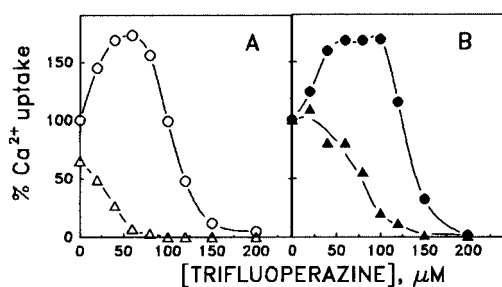


FIG. 5. Heparin effect on stimulation by trifluoperazine of Ca^{2+} uptake in brain microsomes. The assay medium and experimental conditions were as in Fig. 1. Ca^{2+} uptake was measured in the absence (A) or in the presence of 100 mM KCl (B), either without heparin (\circ , \bullet) or with 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ heparin (Δ , \blacktriangle). Ca^{2+} uptake (100%) in the absence of trifluoperazine was 209 ± 19 (A) and 204 ± 18 nmol/mg of protein/45 min (B). Data are the means of three experiments with different preparations. The SEM was $<10\%$.

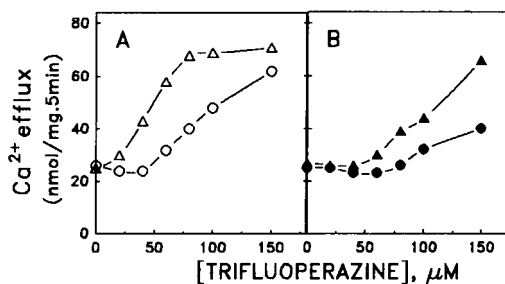


FIG. 6. Synergistic effect of heparin and trifluoperazine on Ca^{2+} efflux in brain microsomes: effect of KCl. Brain microsomes were preloaded with [^{45}Ca] CaCl_2 as indicated in Materials and Methods. The loaded vesicles were diluted to a final concentration of 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in a medium containing 50 mM MOPS-Tris (pH 7.0), 5 mM EGTA, and either no heparin (\circ , \bullet) or 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ heparin (Δ , \blacktriangle), in the absence (A) or presence (B) of 100 mM KCl. The values are the means of three experiments with three vesicle preparations. The SEM was $<10\%$. The Ca^{2+} load varied from 140 to 180 nmol Ca^{2+}/mg of protein.

et al., 1994). The present study revealed that sulfated polysaccharides allow the modulation of Ca^{2+} transport by monovalent cations that are involved in cell excitation. The effects of KCl and NaCl can be differentiated (Fig. 2 and Table 1), so that replacement of K^+ with Na^+ would promote inhibition of Ca^{2+} transport, depending on the type and concentration of polysaccharide present.

The antagonism of polysaccharide effects by cations does not appear to be due to neutralization of the negative charges of the sulfate residues (de Meis and Suzano, 1994), as indicated by the following evidences: (1) K^+ and Li^+ have similar potency in replacing the H^+ associated with the sulfate groups of fucosylated chondroitin, as shown by conductimetric titrations (Ruggiero et al., 1994). However, in contrast to K^+ , Li^+ does not antagonize polysaccharide inhibition of Ca^{2+} uptake (Fig. 2 and Table 1). (2) The antagonism of polysaccharide inhibition by Na^+ depends on small variations in polysaccharide concentration, despite that Na^+ concentration is in great molar excess over polysaccharide (Table 1). (3) Dextran 8,000 and 500,000 have the same charge density but inhibited Ca^{2+} uptake with remarkably different potencies, and their inhibitory activity was modulated in a distinct way by Na^+ (Table 1). The present data are quite different from those previously reported for blood platelets and sarcoplasmic reticulum, where no such differences among the inhibitory profiles of polysaccharides were detected (de Meis and Suzano, 1994).

The Ca^{2+} efflux from brain microsomes was increased by trifluoperazine, but this cannot be attributed to a nonspecific leakage of the vesicle membrane. Ca^{2+} efflux was increased even by concentrations of trifluoperazine that stimulate Ca^{2+} uptake (Figs. 3–6). In addition, KCl at concentrations that interact with the Ca^{2+} -ATPase and antagonize the effects of polysac-

charide decreased the efflux of Ca²⁺ induced by trifluoperazine (Fig. 6B). These data indicate that, similar to the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase, brain Ca²⁺-ATPase can mediate Ca²⁺ efflux. Although its physiological role is not clear, it provides an alternative pathway for Ca²⁺ release in brain cells.

Several studies have shown that heparin blocks the interaction of Ins-P₃ with its receptor (Hill et al., 1987; Supattapone et al., 1988a,b). Because heparin inhibits the Ca²⁺-ATPase from brain microsomes and potentiates trifluoperazine-induced Ca²⁺ efflux, the actions of heparin as a blocker of Ca²⁺ release induced by Ins-P₃ in intact tissue should be considered with some caution (Figs. 5 and 6). It has been shown that heparin and trifluoperazine interact with the E₂ form of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase (de Meis et al., 1988; de Meis and Suzano, 1994). Heparin changes the effects of trifluoperazine on Ca²⁺ fluxes and, on the other hand, trifluoperazine keeps the Ca²⁺-ATPase sensitive to heparin even in the presence of KCl. These data indicate that binding of one drug to the ATPase may facilitate the effect of the second drug in a synergistic manner. The differential effects of the drugs on brain Ca²⁺ uptake, compared with skeletal muscle and blood platelets, may be due to intrinsic differences among the Ca²⁺ pumps at the E₂ conformation. Therefore, even though the drugs affect the same transport protein, they exhibit distinct effects depending on the tissue studied.

Acknowledgment: This study was supported by grants from Financiadora de Estudos e Projetos, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, and the European Economic Community. We thank Dr. Paulo A. S. Mourao for providing the native and chemically modified fucosylated chondroitin sulfate, Dr. Paulo dos Santos Rodrigues for helpful advice during the execution of the study, and Dr. M. Sorenson for careful revision of the manuscript.

REFERENCES

- Benech J. C., Wolosker H., and de Meis L. (1995) Reversal of the Ca²⁺ pump of blood platelets. *Biochem. J.* **306**, 35–38.
- Blaustein M., Ratzlaff R. W., Kendrick N. C., and Schweitzer E. S. (1978) Calcium buffering in presynaptic nerve terminals. *J. Gen. Physiol.* **72**, 15–41.
- Burk S. E., Lytton J., MacLennan D. H., and Shull G. E. (1989) cDNA cloning, functional expression, and mRNA tissue distribution of a third organellar Ca²⁺ pump. *J. Biol. Chem.* **264**, 18561–18568.
- de Meis L. (1991) Fast efflux of Ca²⁺ mediated by the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase. *J. Biol. Chem.* **266**, 5736–5742.
- de Meis L. and Inesi G. (1992) Functional evidence of a transmembrane channel within the Ca²⁺ transport ATPase of sarcoplasmic reticulum. *FEBS Lett.* **299**, 33–35.
- de Meis L. and Suzano V. (1994) Uncoupling of muscle and blood platelets Ca²⁺ transport ATPase by heparin. *J. Biol. Chem.* **269**, 14525–14529.
- de Meis L., Rubin-Altschul B. M., and Machado R. D. (1970) Comparative data of Ca²⁺ transport in brain and skeletal muscle microsomes. *J. Biol. Chem.* **245**, 1883–1889.
- de Meis L., Gomez-Puyou M. T., and Gomez-Puyou A. (1988) Inhibition of mitochondrial F₁ ATPase and sarcoplasmic reticulum ATPase by hydrophobic molecules. *Eur. J. Biochem.* **171**, 343–349.
- Eletr S. and Inesi G. (1972) Phospholipid orientation in sarcoplasmic reticulum membranes: spin label ESR and proton NMR studies. *Biochim. Biophys. Acta* **282**, 174–179.
- Engelender S., Wolosker H., and de Meis L. (1995) The Ca²⁺-ATPase isoforms of platelets are located in distinct functional Ca²⁺ pools and are uncoupled by a mechanism different from that of skeletal muscle Ca²⁺-ATPase. *J. Biol. Chem.* **270**, 21050–21055.
- Faissner A., Clement A., Lochter A., Streit A., Mandl C., and Schachner M. (1994) Isolation of a neural chondroitin sulfate proteoglycan with neurite outgrowth promoting properties. *J. Cell Biol.* **126**, 783–799.
- Fedarko N. S. and Conrad E. (1986) A unique heparan sulfate in the nuclei of hepatocytes: structural changes with the growth state of the cells. *J. Cell Biol.* **102**, 587–599.
- Grubmeyer C. and Penefsky H. S. (1981) The presence of two hydrolytic sites on beef heart mitochondrial adenosine triphosphatase. *J. Biol. Chem.* **256**, 3718–3727.
- Gunteski-Hamblin A., Greeb J., and Shull G. E. (1988) A novel Ca²⁺ pump expressed in brain, kidney, and stomach is encoded by an alternative transcript of the slow-twitch muscle sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase gene. *J. Biol. Chem.* **263**, 15032–15040.
- Hill D. T., Berggren P. O., and Boynton A. L. (1987) Heparin inhibits inositol trisphosphate induced calcium release in permeabilized rat liver cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **149**, 879–901.
- Ishihara M., Fedarko N. S., and Conrad E. (1987) Involvement of phosphatidylinositol and insulin in the coordinate regulation of proteoglycan sulfate metabolism and hepatocyte growth. *J. Biol. Chem.* **262**, 4708–4716.
- Kiedrowski L., Brooker G., Costa E., and Wroblewski J. T. (1994a) Glutamate impairs neuronal calcium extrusion while reducing sodium gradient. *Neuron* **12**, 295–300.
- Kiedrowski L., Wroblewski J. T., and Costa E. (1994b) Intracellular sodium concentration in cultured cerebellar granule cells challenged with glutamate. *Mol. Pharmacol.* **45**, 1050–1054.
- Kijima Y., Ogunbunmi E., and Fleischer S. (1991) Drug action of thapsigargin on the Ca²⁺ pump protein of sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **266**, 22912–22918.
- Kjellen L. and Lindahl U. (1991) Proteoglycans: structures and interactions. *Annu. Rev. Biochem.* **60**, 443–475.
- Lees G. H. (1991) Inhibition of sodium-potassium-ATPase: a potentially ubiquitous mechanism contributing to central nervous system neuropathology. *Brain Res. Rev.* **16**, 283–300.
- Le Peuch C. J., Le Peuch D. A. M., Kats S., Demaille J. G., Hincke M. T., Bredoux R., Enouf J., Levy-Toledano S., and Caen J. P. (1983) Regulation of calcium accumulation and efflux from platelet vesicles. Possible role for cyclic-AMP-dependent phosphorylation and calmodulin. *Biochim. Biophys. Acta* **731**, 456–464.
- Lytton J. and MacLennan D. H. (1988) Molecular cloning of cDNA from human kidney coding for two alternatively spliced products of the cardiac Ca²⁺ ATPase gene. *J. Biol. Chem.* **263**, 15024–15031.
- Lytton J., Westlin M., and Hanley M. R. (1991) Thapsigargin inhibits the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase family of Ca²⁺ pumps. *J. Biol. Chem.* **266**, 17067–17071.
- Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., and Randall R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265–275.
- Miller K. K., Verma A., Snyder S. H., and Ross C. A. (1991) Localization of an endoplasmic reticulum calcium ATPase mRNA in rat brain by in situ hybridization. *Neuroscience* **43**, 1–9.
- Ruggiero J., Vieira R. P., and Mourao P. A. S. (1994) Increased calcium affinity of a fucosylated chondroitin sulfate from sea cucumber. *Carbohydr. Res.* **256**, 275–287.

- Supattapone S., Danoff S., Theibert A., Joseph S. K., Steiner J., and Snyder S. H. (1988a) Cyclic AMP-dependent phosphorylation of a brain inositol trisphosphate receptor decreases its release of calcium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 8747–8750.
- Supattapone S., Worley P. F., Baraban J. M., and Snyder S. H. (1988b) Solubilization, purification, and characterization of an inositol trisphosphate receptor. *J. Biol. Chem.* **263**, 1530–1534.
- Thastrup O., Cullen P. J., Drobak B. K., Hanley M. R., and Dawson A. P. (1990) Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular Ca^{2+} stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 2466–2470.
- Trotta E. E. and de Meis L. (1975) ATP-dependent calcium accumulation in brain microsomes: enhancement by phosphate and oxalate. *Biochim. Biophys. Acta* **394**, 239–247.
- Trotta E. E. and de Meis L. (1978) Adenosine 5-triphosphate-orthophosphate exchange catalyzed by the Ca^{2+} -transport ATPase of brain. *J. Biol. Chem.* **253**, 7821–7825.
- Verma A., Hirsch D. J., Hanley M. R., Thastrup O., Christensen S. B., and Snyder S. H. (1990) Inositol trisphosphate and thapsigargin discriminate endoplasmic reticulum stores of calcium in rat brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **172**, 811–816.
- Wolosker H. and de Meis L. (1994) pH-dependent inhibitory effects of Ca^{2+} , Mg^{2+} , and K^{+} on Ca^{2+} efflux mediated by sarcoplasmic reticulum ATPase. *Am. J. Physiol.* **266**, C1376–C1381.
- Wolosker H., Petretski J. H., and de Meis L. (1990) Modification of ATP regulatory function in sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase by hydrophobic molecules. *Eur. J. Biochem.* **193**, 873–877.
- Wolosker H., Pacheco A. G. F., and de Meis L. (1992) Local anesthetics induce fast Ca^{2+} efflux through a nonenergized state of the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase. *J. Biol. Chem.* **267**, 5785–5789.
- Wuytack F., Papp B., Verboomen H., Raeymackers L., Dode L., Bobe R., Enouf J., Bokkala S., Authi K. S., and Casteels R. (1994) A sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase 3-type Ca^{2+} pump is expressed in platelets, in lymphoid cells, and in mast cells. *J. Biol. Chem.* **268**, 1410–1416.

ANEXO DO ARTIGO 1

Neste anexo serão apresentados resultados complementares ao artigo publicado no *Journal of Neurochemistry*, 66: 772-778, 1996. Os dados apresentados faziam parte do manuscrito original que foi enviado ao *Journal of Neurochemistry*, mas que por recomendação do Corpo Editorial do periódico foram excluídos do manuscrito original.

A Figura 1 do anexo mostra a inibição causada por heparina, dextran sulfato 8.000, condroitin fucosilado e sulfatado e dextran 500.000 na captação de Ca^{2+} e na atividade ATPásica de microsomas de cérebro de ratos. Os IC_{50} para inibição tanto do transporte de Ca^{2+} como para a ATPase são apresentados na página 773 do artigo. Como pode ser observado existe um claro paralelismo entre inibição do transporte e da ATPase. A Figura 2 do anexo mostra o efeito da desulfatação e da redução do grupo carboxila do condroitim fucosilado de pepino do mar sobre a inibição do transporte de Ca^{2+} . A desulfatação provocou uma redução considerável no poder inibitório do polissacarídeo, enquanto que a carboxiredução praticamente não alterou o efeito do composto.

A trifluoperazina estimulou a captação de Ca^{2+} em concentrações relativamente baixas (ver figura 3 na página 775 do artigo). Para assegurar que este efeito era mediado pela estimulação da Ca^{2+} ATPase, testou-se o efeito da taspigargina, um inibidor potente e específico das Ca^{2+} -ATPases de retículo sarco/endoplasmático (Inesi e Sagara, 1992). Como é mostrado na Figura 3 do anexo

do artigo, a trifluoperazina nas concentrações entre 20 à 80 μM causaram uma estimulação significativa na captação de Ca^{2+} por microssomas de cérebro de ratos (círculos abertos), sendo este efeito completamente abolido por 1 μM de tapsigargina. Estes resultados sugerem que a estimulação causada pela trifluoperazina ocorre especificamente sobre a Ca^{2+} -ATPase de retículo.

Em relação à interação observada entre trifluoperazina e heparina no transporte de Ca^{2+} (Figura 4, página 776 do artigo), observamos o mesmo padrão de efeito com 1 $\mu\text{g/ml}$ de dextran sulfato 500.000. Assim, na presença de 1 $\mu\text{g/ml}$ de dextran 500.000 (que causou uma inibição de 80% no transporte de Ca^{2+}) não foi possível observar-se a estimulação causada pela trifluoperazina. Na presença de 100 mM de KCl houve uma reversão quase que completa da inibição causada pelo dextran (20% de inibição), mas a trifluoperazina não estimulou a captação de Ca^{2+} .

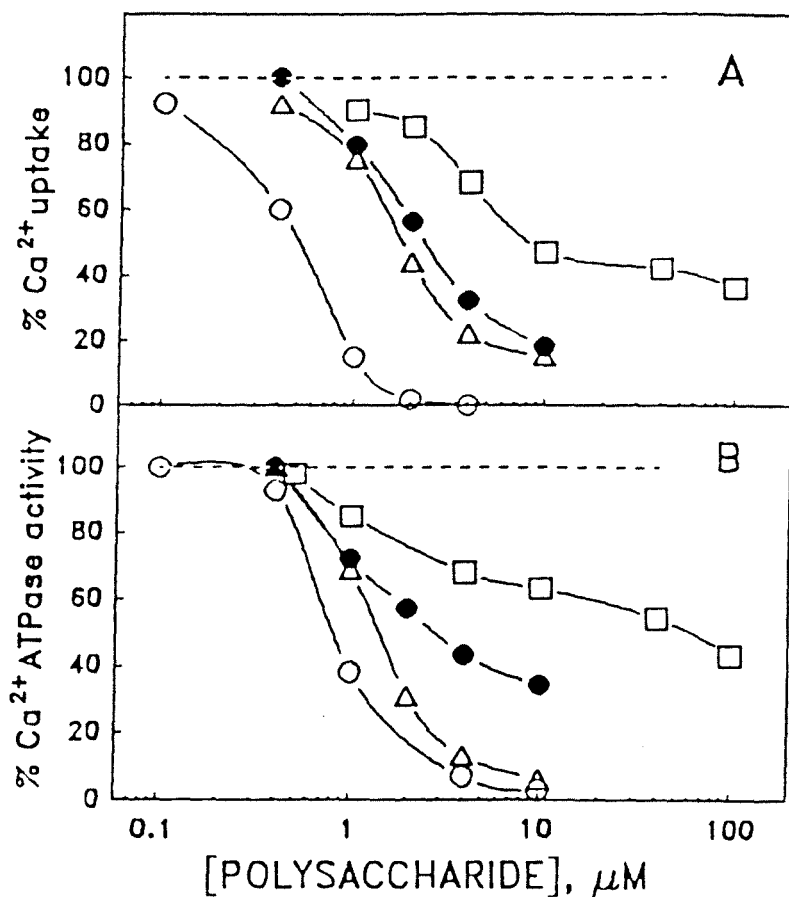


FIGURA 1 - ANEXO DO ARTIGO 1 - Efeito dos polissacarídeos sulfatados sobre o transporte de Ca²⁺ (A) e sobre a Ca²⁺-ATPase (B). Círculo aberto: Dextran sulfato 500,000; círculo fechado: Dextran sulfato 8,000; triângulo aberto: condroitin fucosilado e sulfatado e quadrado aberto: heparina.

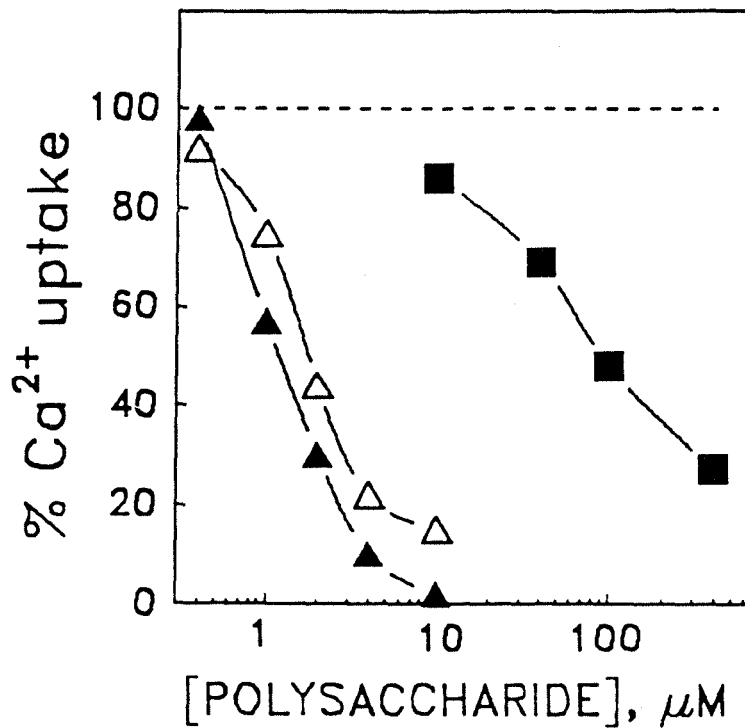


FIGURA 2 - ANEXO DO ARTIGO 1 - Efeito da dessulfatação e da redução do grupo carboxílico do condroitin fucosilado e sulfatado. Triângulo fechado: condroitin fucosilado e sulfatado nativo; triângulo aberto: condroitin fucosilado e sulfatado carboxireduzido e quadrado fechado: condroitin fucosilado dessulfatado.

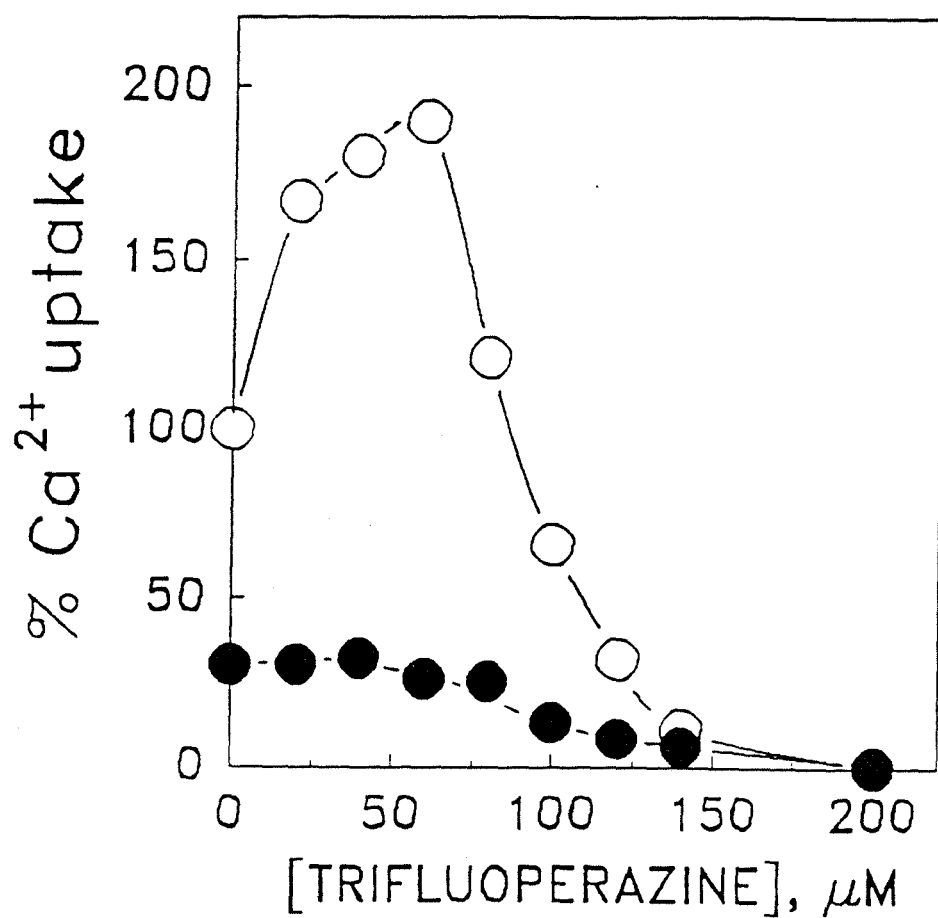


FIGURA 3 - ANEXO DO ARTIGO 1 - Efeito da taspargina sobre a estimulação provocada pela trifluoperazina em microsomas de cerebelo. Círculo aberto: sem taspargin e círculo fechado na presença de 2 μM de taspargina.

OBJETIVOS DO ARTIGO 2

Considerando os efeitos observados no artigo 1, onde os polissacarídeos sulfatados inibiram tanto a captação de Ca^{2+} como a atividade Ca^{2+} -ATPásica, mas praticamente não estimularam o efluxo passivo de Ca^{2+} em vesículas pré-carregadas, investiu-se no artigo 2, de modo mais detalhado, o efeito dos polissacarídeos sobre o efluxo unidirecional de Ca^{2+} . Também investigou-se o efeito do pH sobre o efluxo unidirecional e sobre a captação de Ca^{2+} em microsomas cerebrais (e em algumas situações em vesículas derivadas do retículo sarcoplasmático), uma vez que no primeiro artigo sugerimos que em situações patológicas que estivessem associadas com variações nos níveis intracelulares de K^+ e Na^+ os polissacarídeos sulfatados poderiam assumir um papel importante na regulação do transporte de Ca^{2+} . Nestas situações onde o K^+ intracelular diminui e o Na^+ aumenta normalmente ocorre uma diminuição do pH intracelular (situação de hipóxia), o que poderia influenciar o efeito dos polissacarídeos sulfatados. Além disto, o estudo do efeito do pH sobre o transporte de Ca^{2+} em microsomas cerebrais é de extrema importância, uma vez que pode ajudar a compreender por que razão o cérebro é relativamente mais sensível a isquemia que o músculo esquelético.

MODULATION OF Ca^{2+} TRANSPORT IN RAT BRAIN MICROSOMES BY
SULFATED POLYSACCHARIDES: INFLUENCE OF pH.

J.B.T. ROCHA 2, D.O. SOUZA 3 and L. DE MEIS 1

1 Departamento de Bioquímica Médica, Instituto de Ciências Biomédicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

2 Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, 97119-900, Santa Maria, RS, Brasil

3 Departamento de Bioquímica, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 90046-900, Porto Alegre, RS, Brasil

This work was supported by grants from CNPq, FAPERGS, CAPES, UFRGS/PROPESP

ABSTRACT-Rat brain microsomes accumulate Ca^{2+} at the expense of ATP hydrolysis. Addition of sulfated polysaccharides to microsomes after a steady state of Ca^{2+} uptake was reached caused a significant Ca^{2+} release that was antagonized by K^+ . However, at neutral pH, heparin (up to 100 $\mu\text{g/ml}$), dextran sulfate 8,000 (up to 8 $\mu\text{g/ml}$) and fucosylated chondroitin sulfate (up to 10 $\mu\text{g/ml}$) did not increase unidirectional Ca^{2+} efflux (Ca^{2+} efflux measured in the absence of Ca^{2+} ATPase substrates and ligands) in brain microsomes. The unidirectional Ca^{2+} efflux in the presence of EGTA increased about 2-fold when pH was decreased from 7.0 to 6.0. In contrast to that observed at pH 7.0, at acid pH, all the sulfated polysaccharides tested increased the Ca^{2+} efflux rate. Dextran sulfate 500,000 increased unidirectional Ca^{2+} efflux, regardless the pH of the medium. Potassium ion antagonized the effect of all sulfated polysaccharides tested. The inhibitory potency of heparin, dextran sulfate 8,000 and branched and fucosylated chondroitin sulfate increase as pH of the medium is acidified. As for the case of unidirectional Ca^{2+} efflux, the inhibitory potency of dextran sulfate 500,000 was not affected by medium pH. These results indicate that sulfated polysaccharides inhibit Ca^{2+} transport and promote unidirectional Ca^{2+} efflux with higher potency at an acid pH.

Transient changes in free cytosolic Ca^{2+} levels can activate a variety of cellular responses (Ebashi, 1993; Kostyuk & Verkhratsky, 1994); however, sustained increase in free cytosolic Ca^{2+} concentrations may lead to cell death (Rossi et al. 1991; Nicotera et al. 1992; Harman and Maxwell 1995). The maintenance of low free cytosolic calcium concentration in eukaryotic cells is achieved by distinct processes which involves calcium pumps and calcium exchangers (DeMeis et al. 1970; Trotta and De Meis, 1975; Trotta and De Meis, 1978; Blaustein et al. 1978; Gill et al. 1984; Benech et al. 1995). Endoplasmic reticulum Ca^{2+} pumps play an important role in the regulation of intracellular Ca^{2+} levels in various tissues. The Ca^{2+} pump located in the sarcoplasmic reticulum of fast-twitch skeletal muscle is by far the most studied member of this class of enzymes (sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase, SERCA). In mammals, SERCAs are encoded by at least three separate genes and the primary transcript of these genes can be differentially processed given rise to various isoforms. Fast-twitch skeletal muscle of adult mammals expressed exclusively SERCA1a, while cardiac and slow-twitch skeletal muscle expressed SERCA 2a. Brain tissues expresses predominantly SERCA2b, which is an alternative splice product of SERCA2 gene. SERCA3 is expressed in a variety of non-muscle tissues (Burk et al. 1989; Gunteski-Hamblin et al. 1988; Lytton and MacLennan, 1988; Miller et al. 1991; Wuytack et al. 1992)

SERCA isoforms share relatively high sequence identity and virtually identical hydropathy plots (MacLennan et al. 1992), but the functional properties of SERCA isoforms are quantitatively different with respect to Ca^{2+} affinity, vanadate

sensitivity, pH dependence, substrate specificity, inhibitors sensitivity (Lytton et al. 1992; Toyofuku et al. 1992; Brown et al. 1994; Verboomen et al, 1994; De Meis and Suzano, 1994, Engelender et al. 1995; Rocha et al. 1996). The physiological significance of these functional differences among isoforms is still not clear.

Recently, it was demonstrated that sulfated polysaccharides can be used as a tool to distinguish SERCA isoforms from fast-twitch skeletal muscle and platelets (De Meis & Suzano, 1994), since K^+ and Na^+ reversed the inhibitory effect of heparin and other sulfated polysaccharides on Ca^{2+} transport in muscle but the effect in platelet were much less pronounced. Contrasting with muscle and platelets, the responses of brain endoplasmic reticulum Ca^{2+} pump to sulfated polysaccharides and monovalent cations were dependent on both the concentration and the type of polysaccharide used (Rocha et al, 1996). Further, in some situations, as in the presence of sulfated polysaccharides, the brain Ca^{2+} -ATPase was able to discriminate between K^+ and Na^+ .

A variety of sulfated polysaccharides are located in the extracellular matrix (Kjellen and Lindahl, 1991; Oohira et al. 1994; Faissner et al. 1994), however, heparan sulfate can be found intracellularly in different pools, including a cytoplasmic and a nuclear pool (Fedarko and Conrad, 1986; Ishihara, Fedarko and Conrad, 1987). Further, the rate of synthesis and the chemical structure of heparan sulfate vary with the metabolic state of the cell, raising a potential role for heparan sulfate as regulator of cellular metabolism (Fedarko and Conrad, 1986). In a previous study, we raised the possibility that under pathological conditions, which

are associated with changes in the intracellular concentration of Na^+ and K^+ , Ca^{2+} pump would be modulated by sulfated polysaccharides. In some of these pathological situation, such as ischemia, pH can decrease. In the present report we examined the influence of pH on the response of Ca^{2+} transport by brain microsomes to sulfated polysaccharides. In some experiments we also investigated the influence of pH on fast-twitch skeletal muscle vesicles for comparative purpose. The results demonstrated that both in brain and muscle the decrease in pH increased the sensitivity of Ca^{2+} -ATPase to heparin. Further, in brain microsomes it was demonstrated that unidirectional flux of Ca^{2+} induced by sulfated polysaccharides occur only at acid pH.

MATERIAL AND METHODS

Preparation of microsomes-Brian microsomes were prepared according to Rocha et al. (1996).

Cerebellar microsomes were prepared according to Supatappone et al., 1988a. Light sarcoplasmic reticulum vesicles were prepared as described by Eletr and Inesi (1972).

Ca^{2+} uptake - (^{45}Ca) CaCl_2 accumulation was measured by filtration through Millipore filters (0.45 μM). After filtration, the filters were flushed with 25 ml of 3 mM $\text{La}(\text{NO}_3)_3$ and the radioactivity remaining in the filters was counted on a scintillation counter.

Ca^{2+} efflux - Vesicles were preloaded with (^{45}Ca) CaCl_2 in a medium containing 50 mM Mops-Tris (pH 7.0), 5 mM MgCl_2 , 20 mM Pi, 0.04 mM CaCl_2 , 4 mM ATP and vesicles protein (0.1 mg/ml). After 60 min at 35°C, the vesicles were sedimented by centrifugation (100,000 g per 30 min) and the walls of the tubes were blotted. A solution of 0.25M sucrose and 5mM MOPS (pH 7.0) was gently layed on the tube in a such way that the pellet was mantained intact; then the sucrose/MOPS solution was discharged. The walls of the tubes were blotted to minimize the volume of the residual medium. The pellets (1 mg each) were kept in ice and resuspended in 2 ml of ice cold 0.25 M sucrose and 5 mM Mops/Tris (pH 7.0). The suspension was imediatelly diluted into the efflux media to a final vesicle protein concentration of 0.05 mg/ml. The efflux was arrested as described above for Ca^{2+} uptake.

Chemicals. Heparin from porcine intestinal mucosa, dextran sulfate 8,000 and dextran sulfate 500,000 were obtained from Sigma Chemical Company (St. Louis). Native fucose-branched chondroitin sulfate from sea cucumber were prepared and purified as described by Ruggiero et al., 1994. (^{45}Ca) CaCl_2 was purchased from New England Nuclear. All the other reagents were of analytical grade.

RESULTS

Brain microsomes accumulated Ca^{2+} and a steady state of Ca^{2+} uptake was reached after about 1 h (Figure 1). Addition of sulfated polysaccharides produced a significant release of previously accumulated Ca^{2+} (Figure 1a) and KCl (100 mM) abolished the polysaccharide-induced Ca^{2+} release (Figure 1b). There was a considerable difference in the efflux induced by the 3 compound used. Heparin (100ug/ml) promoted only a modest increase in Ca^{2+} release, while Dextran 8,000 (8 $\mu\text{g/ml}$) and Dextran 500,000 (1 $\mu\text{g/ml}$) promoted a more accentuated Ca^{2+} release. These results are in accordance to our previous study (Rocha et al., 1996) and the polysaccharide induced Ca^{2+} release is probably related to an inhibition of Ca^{2+} -ATPase.

To examine whether the Ca^{2+} release promoted by polysaccharide could also be related to an increase of Ca^{2+} efflux not associated with Ca^{2+} -ATPase activity, we measured the unidirectional Ca^{2+} efflux in the absence of Ca^{2+} ATPase ligands. At neutral pH, dextran 8000 (Fig 2a), fucosylated chondroitin sulfate (Fig 2b) and heparin (data not shown) did not induced Ca^{2+} efflux from previously loaded vesicles, while Dextran sulfate 500.000 promoted an increase in Ca^{2+} efflux independently of the pH of the reaction medium (Figure 2c). At pH 6, passive Ca^{2+} efflux in the absence of sulfated polysaccharides increased about 2-fold and all these polysaccharides promoted an increase in Ca^{2+} efflux, which was antagonized by 100 mM KCl (Figure 2a-d and Figure 3a). NaCl also antagonized the increase in Ca^{2+} efflux promoted by 100 $\mu\text{g/ml}$ heparin. In contrast, the efflux promoted by Dextran

sulfate 500,000 was antagonized only by K^+ (Fig. 4). Na^+ and Li^+ were ineffective. Thus, the release of Ca^{2+} induced by sulfate polysaccharides (showed in Fig. 1) is related to Ca^{2+} -ATPase inhibition. However, the effect of Dextran sulfate 500,000 may also be related to the stimulation of the unidirectional Ca^{2+} efflux (Fig.2d).

Since the majority of tested polysaccharide promoted an increase in unidirectional Ca^{2+} efflux only at an acid pH, we examined the influence of pH on the inhibition of Ca^{2+} uptake by polysaccharides in brain microsomes. The inhibitory potency of heparin and dextran sulfate 8000 increased significantly as pH is decreased (Figure 5a and b), while the inhibitory effect of dextran sulfate 500,000 was not influenced by pH (Figure 5c). The inhibitory effect of heparin and dextran sulfated 8,000 on Ca^{2+} -ATPase was also increased at acid pH, in brain and skeletal muscle microsomes (data not shown). Potassium was able to antagonize the effect of heparin, dextran sulfate 8,000 and dextran sulfate 500,000 in all the tested pH, in spite to the fact that the antagonism was less acentuated at pH 6 (data not shown).

Previously we obtained evidence that the unidirectional Ca^{2+} efflux promoted by trifluoperazine in the presence of heparine occurs through the Ca^{2+} -ATPase (Rocha et al, 1996) a phenomenon also observed in skeletal muscle (De Meis, 1991; Wolosker et al. 1992). In order to ascertain the involvement of the Ca^{2+} -ATPase on the polysaccharide-induced Ca^{2+} efflux we tested the effect of thapsigargin, an specific inhibitor of SERCA ATPases which also has the properties of reduce the passive clacium efflux by stabilizing the transmembrane region of the Ca^{2+} pump of sarcoplasmic reticulum (De Meis and Inesi, 1992; Inesi and Sagara. 1992). The

passive Ca^{2+} efflux and the Ca^{2+} efflux elicited by chondroitin fucosylated sulfate from sarcoplasmic reticulum vesicles was reduced by thapsigargin (Figure 6a). In contrast, in brain microsomes thapsigargin did not reduced the passive nor the polysaccharided-induced Ca^{2+} efflux (Figure 6b).

The effect of pH and sulfated polysaccharides was also investigated in cerebellar microsomes, because vesicles from this region was the most enriched in InsP_3 binding (Supattapone et al. 1988a) and also the brain region which has the higher expression of SERCA 2b (Miller et al. 1991). The effects of heparin, dextran sulfate 8,000 and dextran sulfate 500,000 (fucosylated chondroitin sulfate was not tested in cerebellar microsomes) and of pH were identical to those observed with microsomes from whole brain (data not shown). The only difference observed was that specific activity of Ca^{2+} uptake (nmol Ca^{2+} /mg protein) by brain microsomes was greater than those of cerebellar microsomes, probably due to differences in the amounts of contaminant protein not involved in Ca^{2+} transport inherent to each method of preparation.

DISCUSSION

Proteoglycans have a variety of biological functions, however, many of them are still poorly understood (Kjellén and Lindahl, 1991; Yanagishita and Hascall, 1992; Oohira et al, 1994). In spite to the fact that the proteoglycans are located mainly at the cell surface and in the extracellular matrix and that the occurrence of these molecules intracellularly are almost exclusively associated with secretory organelles (Kjellén and Lindahl, 1991; Yanagishita and Hascall, 1992), there are data showing that heparan sulfate can occur in a nuclear pool (not associated with secretory structures). Further, the heparan sulfate located in the nucleus can exist in a form not linked to a core protein (Fedarko and Conrad, 1986; Ishihara et al, 1987). Then, a regulatory role for polysaccharides in Ca^{2+} transport is plausible. The results of the present study demonstrated that various polysaccharides inhibit Ca^{2+} uptake by brain microsomes, which is agreement with previous published data (Rocha et al. 1996). The increase in unidirectional Ca^{2+} efflux promoted by polysaccharides was observed only at an acid pH and the inhibitory potency of these compounds on Ca^{2+} uptake increased with decreasing pH. Previously, it was shown that heparin interact with E2 conformation of muscle Ca^{2+} -ATPase (De Meis & Suzano, 1994) and a similar phenomenon seems to occur in brain, since trifluoperazine (a hydrophobic molecule that stabilize Ca^{2+} -ATPase in the E2 state, Wolosker et al. 1990) holds the Ca^{2+} transport more sensitive to the inhibitory effect of heparin (Rocha et al. 1996) and other sulfated polysaccharides (unpublished results). Thus, a plausible mechanism for increase in the effects of polysaccharides

on Ca^{2+} fluxes at acid pH may be related to the changes in the E1 to E2 equilibrium with decreasing pH (Pick and Karlsh, 1982).

Passive Ca^{2+} efflux in brain microsomes increased with pH decrease and is about 2-fold higher at pH 6, when compared to neutral pH. This pattern of Ca^{2+} efflux differs from that observed in sarcoplasmic reticulum vesicles, where no increase in passive Ca^{2+} efflux occurred in the pH range of 6.0 to 7.0 (Wolosker and De Meis, 1994). The differences probably are related to functional properties of SERCA isoforms expressed in each tissue and suggest that endoplasmic Ca^{2+} transport system in brain may be more susceptible to ischemic conditions than the system located in sarcoplasmic reticulum of fast-twitch skeletal muscle. Thapsigargin had also a differential effect on calcium transport in brain and muscle. In muscle thapsigargin blocked both unstimulated and polysaccharide induced passive calcium efflux, while in brain no effect was observed. This may indicate that in brain microsomes the passive and polysaccharide-induced Ca^{2+} occurs through a pathway not related to the Ca^{2+} pump. InsP_3 and ryanodine channels are likely to be candidates for Ca^{2+} efflux; however, the participation of InsP_3 seems improbable because heparin is a classical inhibitor of Ca^{2+} release from InsP_3 sensitive Ca^{2+} pools in various tissues (Hill et al, 1987; Verma et al, 1990; Supattapone et al. 1988b). The participation of ryanodine channels seems improbable because in our experimental condition the brain microsomes did not respond to caffeine, a classical inducer of Ca^{2+} release from ryanodine sensitive Ca^{2+} pools (data not shown). Thus,

the differential effect of thapsigargin may be related to distinct properties of SERCA 1 and SERCA 2b.

The biological effect of proteoglycans always depend on the interaction of cell proteins with polysaccharides chains and the association may be of low specificity depending almost exclusively on charge interaction or high affinity association with specific saccharide sequences (Kjellen & Lindhal, 1991). The interaction of sulfated polysaccharides with Ca^{2+} ATPase seems to depend on charge, since K^+ and Na^+ can antagonize the effect of heparin on Ca^{2+} efflux and uptake. However, some degree of specificity probably exist in these interaction because Li^+ did not antagonize the effect of heparin (data not shown) and the sensitivity to sulfated polysaccharides of enzyme varied, depending on whether it is function as a pump or as a channel (compare the IC_{50} for inhibition of Ca^{2+} uptake, approximately 10 $\mu\text{g/ml}$ to the concentration needed to induced Ca^{2+} efflux >100 $\mu\text{g/ml}$, at neutral pH). Further, the size of the polysaccharide also affected the interaction: dextran sulfate 500,000 promoted Ca^{2+} efflux and inhibited Ca^{2+} uptake independently of pH, while dextran sulfate 8,000 (which has a similar charge density to dextran sulfate 500,000) promoted Ca^{2+} efflux only at acid pH and its inhibitory potency of Ca^{2+} uptake increased at acid pH.

In summary, the results of the present study suggest that the modulation of Ca^{2+} transport will depend on the type of the polysaccharide, on the monovalent cation present and on the pH of the medium. Thus, if one consider that sulfated polysaccharides may be located intracellularly, it is possible that under pathological

conditions such as ischemia, where the concentration of Na^+ and K^+ changes and the pH decrease, such compounds acquire a significant role on the modulation of Ca^{2+} transport by Ca^{2+} ATPase pumps.

Acknowledgements- We acknowledge Dr. Paulo A.S. Mourão for providing the fucosylated chondroitin sulfate and Dr Herman Wolosker for critical reading of the manuscript.

REFERENCES

- Benech J.C., Wolosker, H. and de Meis, L. (1995) Reversal of the Ca^{2+} pump of blood platelets. *Biochem. J.* 305,
- Blaustein M., Ratzlaff R.W., Kendrick N.C. and Schweitzer E.S.(1978) Calcium buffering in presynaptic nerve terminals. *J. Gen. Physiol.* 72, 15-41.
- Brown G.R., Benyon S.L., Kirk C.J., Wictome M., East J.M., Lee A.G. and Michelangeli F. (1994). Characterization of a novel Ca^{2+} pump inhibitor (bis-phenol) and its effects on intracellular Ca^{2+} mobilization. *Biochem. Biophys. Acta*, 1195. 252-258.,

Burk S.E., Lytton J., MacLennan D.H. and Shull G.E. (1989) cDNA cloning, functional expression, and mRNA tissue distribution of a third organellar Ca^{2+} pump. *J. Biol. Chem.* 264, 18561-18568.

De Meis L. (1991) Fast efflux of Ca^{2+} mediated by the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase. *J. Biol. Chem.* 266, 5736-5742.

De Meis L., Rubin-Altschul B.M. and Machado R.D. (1970) Comparative data of Ca^{2+} transport in brain and skeletal muscle microsomes. *J. Biol. Chem.* 245, 1883-1889.

De Meis L., Gomez-Puyou M.T. and Gomez-Puyou A. (1988) Inhibition of mitochondrial F1 ATPase and sarcoplasmic reticulum ATPase by hydrophobic molecules. *Eur. J. Biochem.* 171, 343-349.

De Meis L. and Inesi G. (1992) Functional evidence of a transmembrane channel within the Ca^{2+} transport ATPase of sarcoplasmic reticulum. *FEBS Lett.* 299, 33-35.

De Meis L. and Suzano V. (1994) Uncoupling of muscle and blood platelets Ca^{2+} transport ATPase by heparin. *J. Biol. Chem.* 269, 14525-14529.

Eletr S. and Inesi G. (1972) Phospholipid orientation in sarcoplasmic reticulum membranes: spin label ESR and proton NMR studies. *Biochim. Biophys. Acta* 282, 174-179.

Faissner A., Clement A., Lochter A., Streit A., Mandl C. and Schachner M. (1994) Isolation of a neural chondroitin sulfate proteoglycan with neurite outgrowth promoting properties. *J. Cell. Biol.* 126, 783-799.

Grubmeyer C. and Penefsky H.S. (1981) The presence of two hydrolytic sites on beef heart mitochondrial adenosine triphosphate. *J. Biol. Chem.* 256, 3718-3727.

Gunteski-Hamblin A., Greeb J. and Shull G.E. (1988) A novel Ca^{2+} pump expressed in brain, kidney, and stomach is encoded by an alternative transcript of the slow-twitch muscle sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase gene. *J. Biol. Chem.* 263, 15032-15040.

Hill D.T., Berggren P.O. and Boynton A.L. (1987) Heparin inhibits inositol trisphosphate induced calcium release in permeabilized rat liver cells. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 149, 879-901.

Inesi, G. and Sagara, Y. (1992). Thapsigargin, a high affinity and global inhibitor of intracellular calcium transport ATPases. *Arch. Biochem. Biophys.* 298, 313-317.

Kijima Y., Ogunbunmi E. and Fleischer S. (1991) Drug action of thapsigargin on the Ca^{2+} pump protein of sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 266, 22912-22918.

Kjellén, L. and Lindahl, U. (1991). Proteoglycans: structures and interactions. *Annu. Rev. Biochem.* 60, 443-475.

Lytton J. and MacLennan D.H. (1988). Molecular cloning of cDNA from human kidney coding for two alternatively spliced products of the cardiac Ca^{2+} ATPase gene. *J. Biol. Chem.* 263, 15024-15031.

Lytton J., Westlin M. and Hanley M.R. (1991) Thapsigargin inhibits the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase family of Ca^{2+} pumps. *J. Biol. Chem.* 266, 17067-17071.

- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. and Randall R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- MacLennan D.H., Toyofuku T. & Lytton J. (1992) Structure-function relationship in sarcoplasmic or endoplasmic reticulum type Ca^{2+} pump. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **671**, 1-10.
- Miller K.K., Verma A., Snyder S.H. and Ross C.A. (1991) Localization of an endoplasmic reticulum calcium ATPase mRNA in rat brain by in situ hybridization. *Neuroscience* 43, 1-9.
- Oohira, A., Katoh-Semba, R., Watanabe, E. and Matsui, F. (1994). Brain development and multiple molecular species of proteoglycan. *Neurosci. Res.* 20, 195-207.
- Pick U. and Karlsh S.J. (1982). Regulation of the conformation transition in the Ca^{2+} -ATPase from sarcoplasmic reticulum by pH, temperature and calcium ions. *J. Biol. Chem.* 257, 6120-6126.
- Ruggiero J., Viera R.P. and Mourao P.A.S. (1994) Increased calcium affinity of a fucosylated chondroitin sulfate from sea cucumber. *Carbohydr. Res.* 256, 275-287.
- Supattapone S., Danoff S., Theibert A., Joseph S.K. Steiner J. and Snyder S.H. (1988a) Cyclic AMP- dependent phosphorylation of a brain inositol trisphosphate receptor decreases its release of calcium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 8747-8750.

Supattapone S., Worley P.F., Barabam J.M. and Snyder S.H. (1988b) Solubilization, purification, and characterization of an inositol trisphosphate receptor. *J. Biol. Chem.* 263, 1530-1534.

Thastrup O., Cullen P.J., Drobak B.K., Hanley M.R. and Dawson A.P. (1990) Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular Ca^{2+} stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 2466-2470.

Trotta E.E. and de Meis L. (1978) Adenosine 5'triphosphatase-orthophosphate exchange catalyzed by the Ca^{2+} -transport ATPase of brain. *J. Biol. Chem.* 253, 7821-7825.

Trotta E.E. and de Meis L. (1975) ATP-dependent calcium accumulation in brain microsomes enhancement by phosphate and oxalate. *Biochim. Biophys. Acta* 394, 239-247.

Verboomen, H., Wuytack, F., Bosch, L.V.D., Mertens, L. and Casteels, R. (1994). The functional importance of the extreme C-terminal tail in the gene 2 organellar Ca^{2+} - transport ATPase (SERCA2a/b). *Biochem. J.* 303, 979-984.

Verma A., Hirshc D.J., Hanley M.R., Thastrup O., Christensen S.B. and Snyder S.H. (1990) Inositol triphosphate and thapsigargin discriminate endoplasmic reticulum stores of calcium in rat brain. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 172, 811-816.

Wolosker, H., Petretski J.H. and de Meis L. (1990) Modification of ATP regulatory function in sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase by hydrophobic molecules. *Eur. J. Biochem.* 193, 873-877.

Wolosker H. and de Meis L. (1994) pH-dependent inhibitory effects of Ca^{2+} , Mg^{2+} , and K^+ on Ca^{2+} efflux mediated by sarcoplasmic reticulum ATPase. *Am. J. Physiol.* 266, C1376-C1381.

Wolosker H., Pacheco A.G.F. and de Meis L. (1992) Local anesthetics induce fast Ca^{2+} efflux through a nonenergized state of the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase. *J. Biol. Chem.* 267, 5785-5789.

Yanagishita, M. and Hascall, V.C. (1992) Cell surface heparan sulfate proteoglycans. *J. Biol. Chem.* 267, 9451-9454.

LEGENDS TO FIGURES

Figure 1. Induction of Ca^{2+} release by different sulfated polysaccharides at the steady-state. A) The assay medium composition was Mops-Tris 50 mM (pH 7.0), 5 mM MgCl_2 , 20 mM Pi, 2 mM ATP, 40 μM CaCl_2 and 50 $\mu\text{g/ml}$ brain microsomes protein. After 80 min of incubation at 35 °C, the following sulfated polysaccharides were added to the medium: (●) No addition; (Δ) heparin (100 $\mu\text{g/ml}$); (○) dextran 8,000 (8 $\mu\text{g/ml}$) and (◻) dextran sulfate 500,000. B) The assay medium composition was the same of A, except that 100 mM KCl was present. Ca^{2+} uptake level was the mean of 3 experiments with three different preparations. The SEM was less than 15% of respective mean value.

Figure 2. Influence of pH on Unidirectional Ca^{2+} efflux in Brain Microsomes Promoted by sulfated polysaccharides, in the presence or absence of K^+ . Brain microsomes were previously loaded with $^{45}\text{CaCl}_2$ in a medium identical to those describe to the legend of Figure 1A. Vesicles were sedimented by centrifugation (100,000 g for 30 min) and resuspended in a medium containing 250 mM sucrose and 5 mM Mops-Tris (pH 7.0) and Ca^{2+} efflux was measured in a medium containing 5 mM EGTA buffered with 50 mM Mops-Tris pH 6.0 (Δ, \blacktriangle) or pH 7.0 (○, ●), in the presence (Δ, O) or absence of 100 mM KCl (\blacktriangle, \bullet). Mean of 3 independent experiments (SEM was less than 10% of respective mean).

Figure 3. Antagonism by KCl and NaCl of heparin-induced Ca^{2+} efflux in brain microsomes. Vesicles were previously loaded as described to the legend of Figure 2. A) Ca^{2+} efflux was measured in a medium containing 5 mM EGTA and 50 mM Mops-Tris (pH 6.0), 50 $\mu\text{g/ml}$ brain microsomes protein, and either 100 $\mu\text{g/ml}$ heparin (O), 100 $\mu\text{g/ml}$ heparin plus 100 mM KCl (●), or no addition (Δ) or 100 mM KCl (\blacktriangle). B) Ca^{2+} efflux was measured in a medium identical to that described in A, except that 100 mM NaCl was used in the place of KCl. Mean of 3 independent experiments (SEM was less than 15%).

Figure 4. Effect of monovalent cations on Ca^{2+} efflux induced by dextran sulfate 500,000. Ca^{2+} efflux was measured as described in the legend to Figure 3. Ca^{2+} efflux was determined either in the absence (closed symbols) or in the presence (empty symbols) of 1 $\mu\text{g/ml}$ Dextran sulfate 500,000 (O), KCl, (◐) NaCl, and (Δ) LiCl. Values are the mean of 3 experiments and SEM was less than 15% of respective mean.

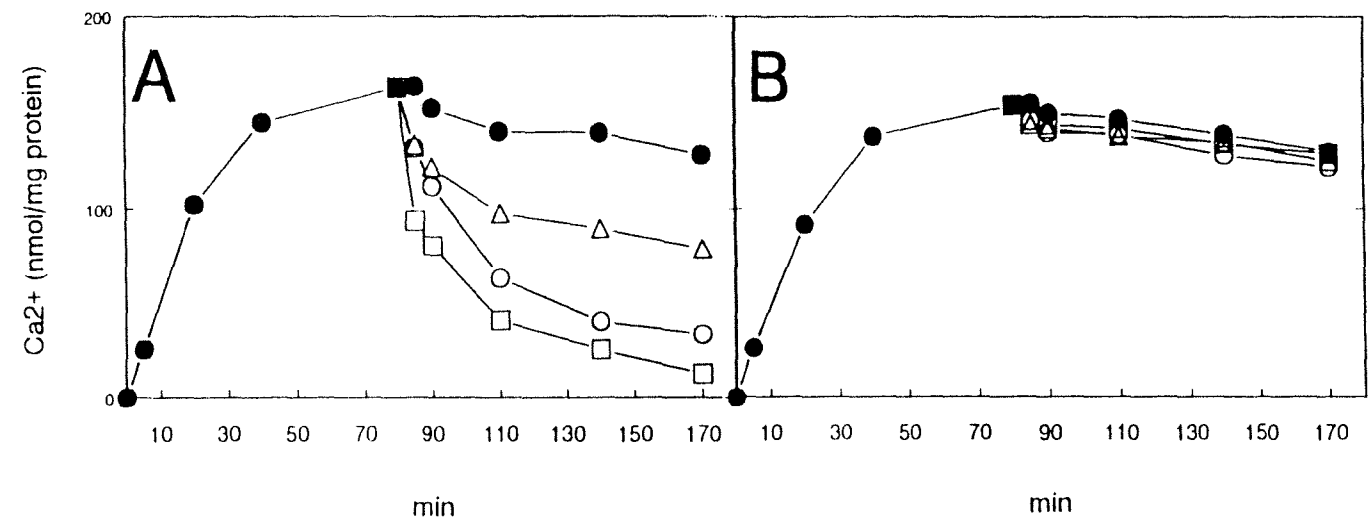
Figure 5. Effect of pH on Ca^{2+} uptake by brain microsomes in the presence of sulfated polysacharydes. Ca^{2+} uptake was measured in a medium similar to those describe in the legend to Figure 1A, except that the pH of the medium was adjusted to 6.0 (Δ), 6.5 (O) or 7.0 (●), in the presence of either heparin (A), dextran sulfate

8,000 (B) or dextran sulfate 500,000 (C). Mean of 4 to 5 experiments (SEM was less than 10%).

Figure 6. Effect of thapsigargin on Ca^{2+} efflux promoted by fucosylated chondroitin sulfate. Ca^{2+} efflux was measured in a medium identical to those described in the legend to Figure 3. A) Ca^{2+} efflux in sarcoplasmic reticulum microsomes (50 μg protein/ml): (●) no addition; (Δ) 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ fucosylated chondroitin sulfated; (O) 1 μM thapsigargin or (\square) 1 μM thapsigargin plus fucosylated chondroitin sulfated. B) Ca^{2+} efflux in brain microsomes. Mean of 3 experiments (SEM was less than 15%).

Figure 1. Effect of ...

67



Ca²⁺ efflux (nmol/4min/mg protein)

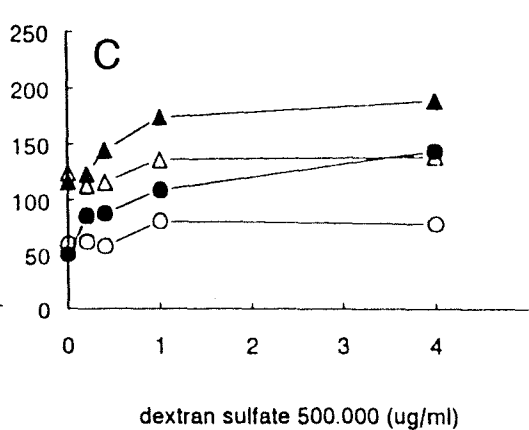
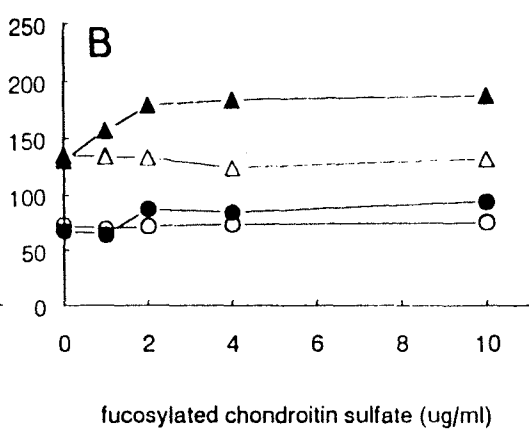
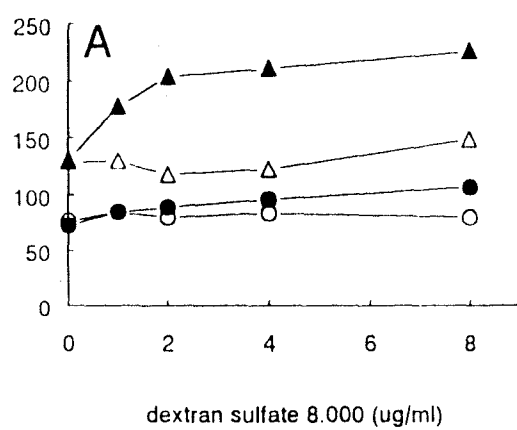


Figure 1

69

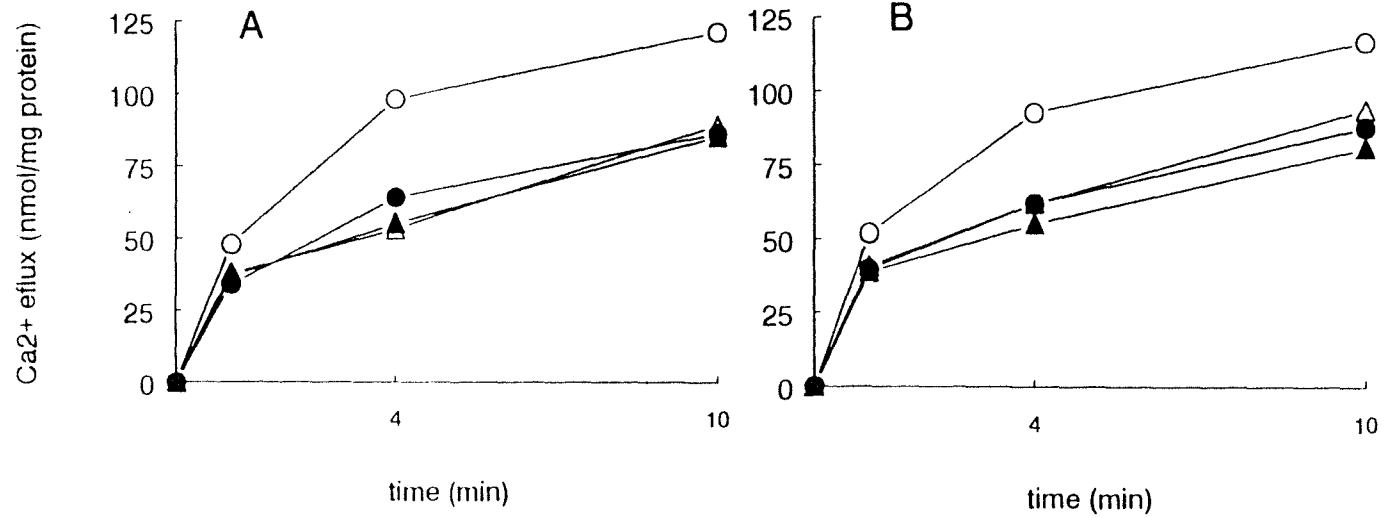


Figure 1

70

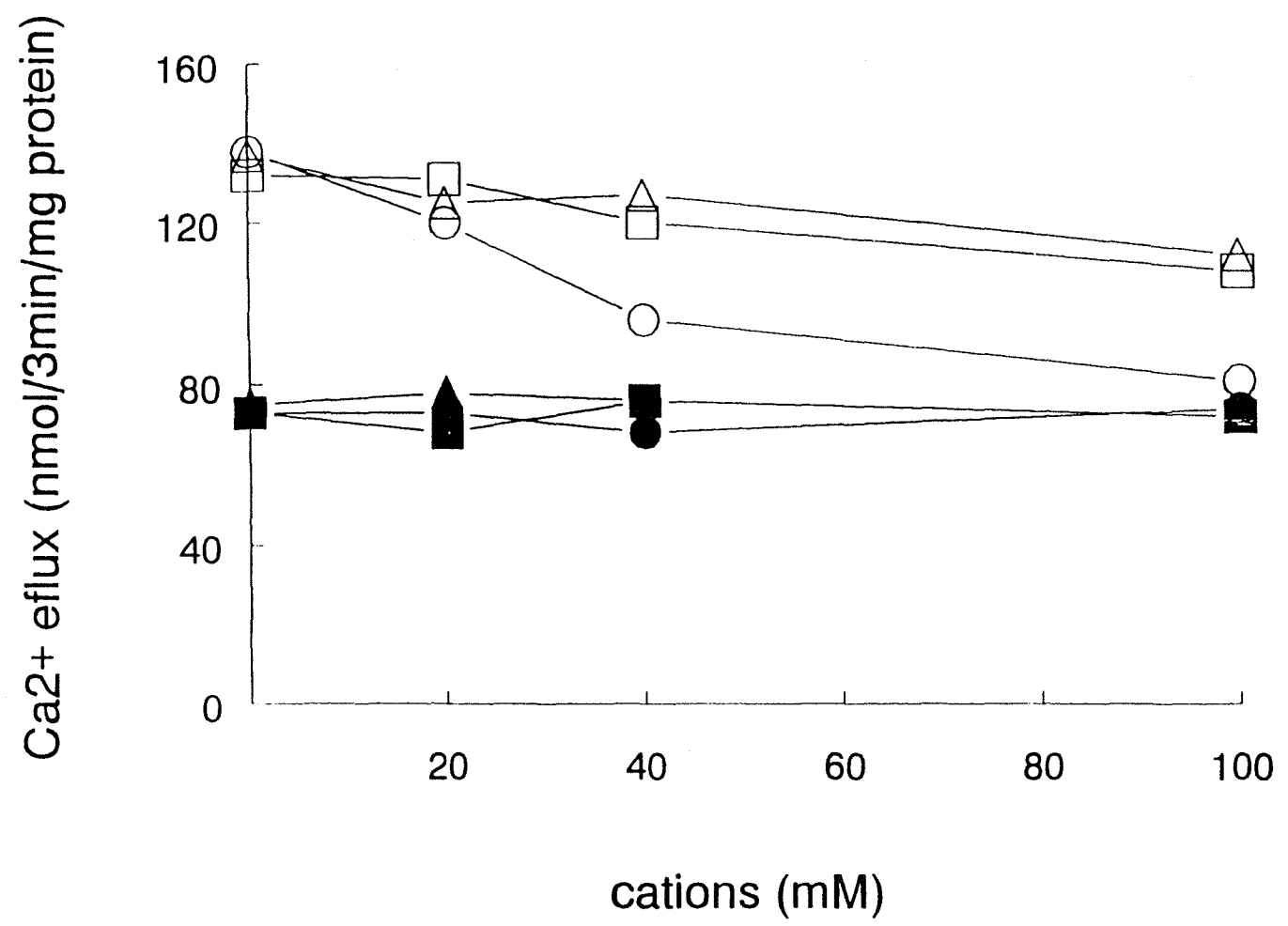


Figure 1. Effect of heparin and dextran sulfate on Ca²⁺ uptake.

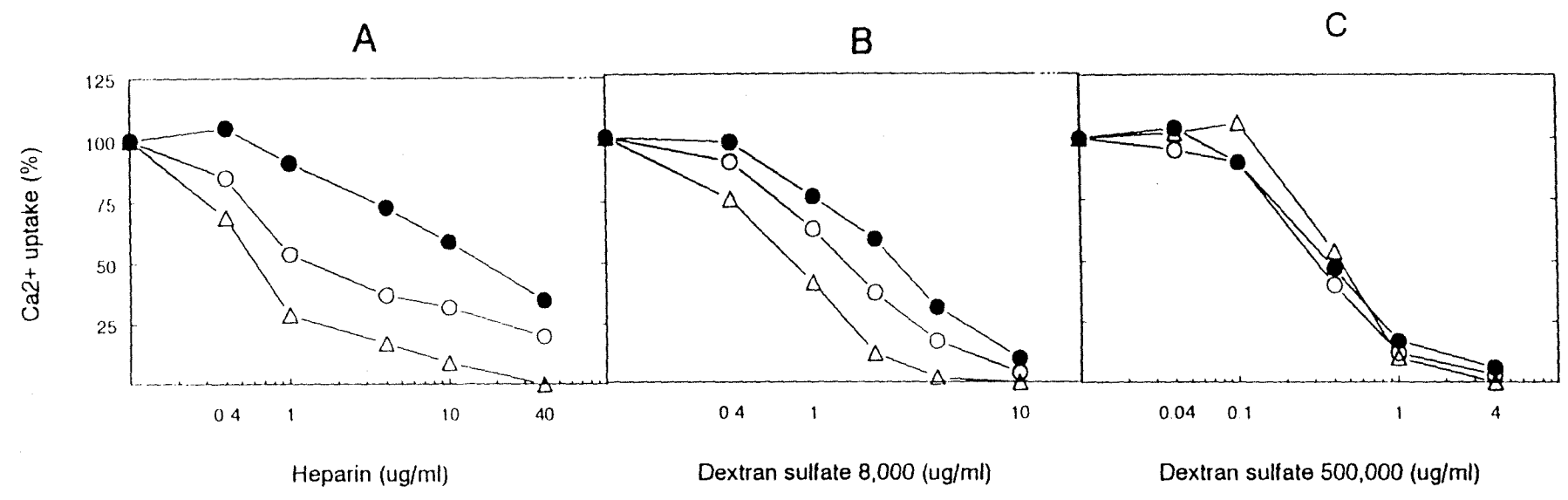
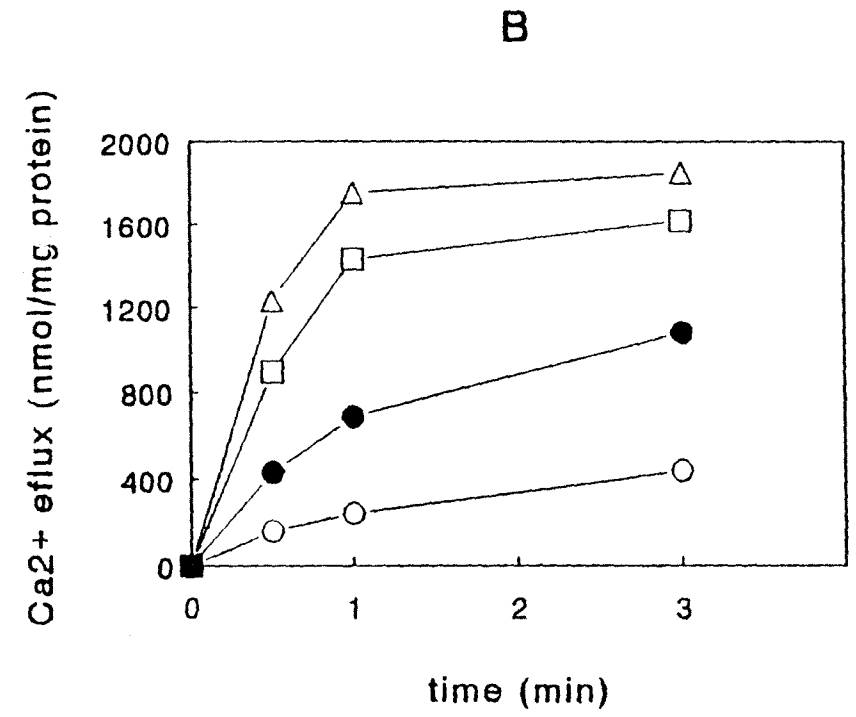
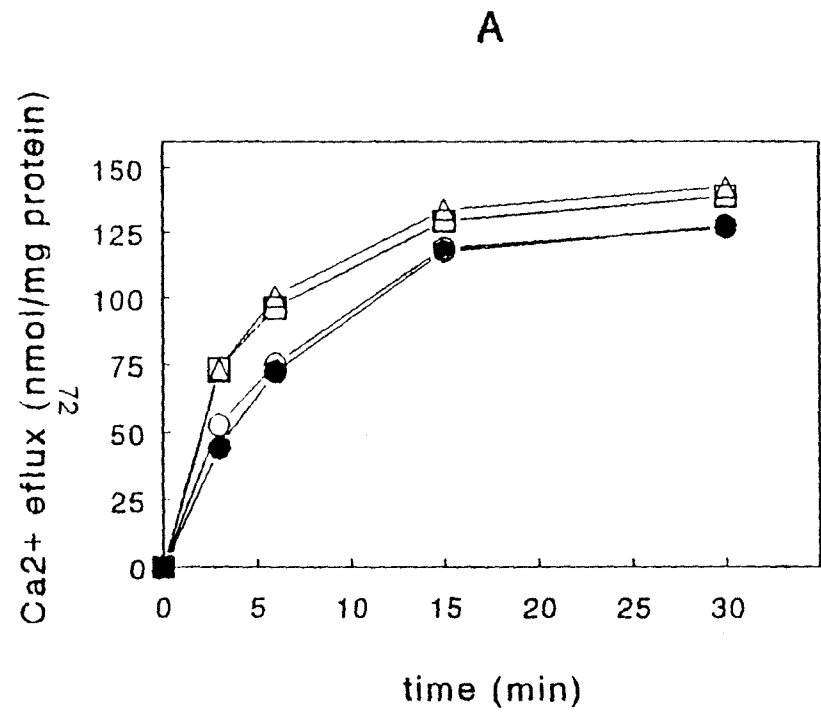


Figure 1



DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Artigo 1

1. Os polissacarídeos foram capazes de diferenciar a isoforma de cérebro das isoformas de músculo e plaqueta (De Meis e Suzano, 1994). No que se refere à sensibilidade das enzimas a diferentes polissacarídeos, a isoforma de SERCA do SNC de ratos (principalmente SERCA 2b), incluindo a enzima de cerebelo (quase que exclusivamente SERCA 2b), tem um comportamento diferente das enzimas de músculo e de plaquetas. O dextran sulfato 500.000 foi o mais potente inibidor da enzima cerebral e a heparina foi o composto de menor potência, enquanto que nos outros tecidos os polissacarídeos utilizados (heparina, dextran sulfato 8.000, dextran sulfato 500.000 e condroitim fucosilato e sulfatado) tiveram a mesma potência inibitória.

2) A trifluoperazina foi capaz de diferenciar a isoforma de cérebro das isoformas de músculo e plaqueta, uma vez que em concentrações relativamente baixas o fenotiazínico estimulou o transporte de Ca^{2+} em cérebro, mas não teve tal efeito em músculo nem em plaquetas. Além disto, a sensibilidade da enzima das diferentes fontes a trifluoperazina foi distinta. Em relação à enzima de cérebro, as concentrações de trifluoperazina que estimularam a captação de Ca^{2+} não tiveram nenhum efeito sobre a atividade ATPásica, sugerindo, portanto, que este composto

promove um certo acoplamento entre transporte de Ca^{2+} e hidrólise de ATP. Nas condições utilizadas não foi possível se observar tal fenômeno em retículo de músculo ou plaqueta, onde se observou inibição do transporte de Ca^{2+} mais intensamente do que inibição da atividade ATPásica, o que sugere que nestes tecidos a trifluoperazina provoca um desacoplamento entre catálise e transporte.

3. Embora os dados apresentados acima demonstrem algumas diferenças de propriedades entre as isoformas expressas em cérebro, músculo e plaqueta, várias propriedades destas isoformas parecem ser similares. Por exemplo, o sinergismo de ação da trifluoperazina e polissacarídeos sugere que, do mesmo modo que descrito em músculo, os polissacarídeos atuam na forma E^* da Ca^{2+} -ATPase de cérebro, uma vez que tem sido demonstrado que drogas hidrofóbicas estabilizam a forma E^* da enzima (o que facilitaria a interação com os polissacarídeos).

4) A reversão dos efeitos inibitórios dos polissacarídeos sobre o transporte de Ca^{2+} por K^+ e Na^+ variaram conforme a concentração e a estrutura química do polissacarídeo utilizado. No geral, em concentrações baixas de polissacarídeos, K^+ e Na^+ antagonisaram os efeitos causados pelos polissacarídeos com a mesma eficiência. Todavia, com o aumento da concentração destas moléculas, o sistema transportador de Ca^{2+} passou a distinguir entre K^+ e Na^+ , sendo o K^+ mais efetivo que o Na^+ . Esta discriminação entre os dois cátions não foi observada em plaqueta e músculo. A ausência de efeito do Li^+ nas 3 isoformas demonstra que a discriminação

de íons monovalentes não é absoluta. Os dados obtidos com Li^+ sugerem que a carga pode não ser o único fator envolvido no efeito inibitório dos polissacarídeos, pois, assim, seria esperado que o Li^+ também neutralizasse as cargas negativas dos polissacarídeos. Todavia, não se pode descartar que K^+ e Na^+ tenham uma maior afinidade pelas cargas negativas dos polissacarídeos, independentemente do fato que o Li^+ é o elemento mais eletronegativo dos três cátions testados.

5. Do mesmo modo que observado em músculo e plaqueta, o efeito inibitório dos polissacarídeos sulfatados em microsomas cerebrais está intimamente relacionado com o conteúdo de sulfato das moléculas, uma vez que a desulfatação do condroitin-fucosilado de pepino do mar diminui consideravelmente o efeito do polissacarídeo (Figura 2 do anexo ao artigo 1). O efeito da heparina e dextran 8.000 sobre o efluxo unidirecional de Ca^{2+} de vesículas previamente carregadas foi negligenciável, mesmo quando testados em concentrações que inibem a captação de Ca^{2+} ou a hidrólise de ATP. A única molécula que causou um efeito modesto sobre o efluxo unidirecional de Ca^{2+} foi o dextran 500.00.

Artigo 2

1. Os resultados do artigo 2 sugerem que a interação dos polissacarídeos com a Ca^{2+} -ATPase de microsomas de cérebro quando a mesma está operando como bomba captando Ca^{2+} é diferente daquela quando está funcionando como canal

(efluxo unidirecional de Ca^{2+}), uma vez que a potência inibitória dos polissacarídeos foi maior na captação de Ca^{2+} do que o efeito estimulatório destes sobre o efluxo unidirecional de Ca^{2+} .

2. Confirmando os dados preliminares do artigo 1, a pH 7, heparina, dextran 8.000 e condroitin fucosilado e sulfatado não estimularam o efluxo unidirecional de Ca^{2+} , mesmo quando testados em concentrações superiores aquelas que inibiam o transporte de Ca^{2+} . Neste pH o único polissacarídeo que estimulou o efluxo foi o dextran 500.000. A acidificação do meio (de 7.0 para 6.0) aumentou o efluxo basal (sem polissacarídeos) cerca de 2 vezes e tornou a Ca^{2+} -ATPase sensível aos efeitos estimulatórios do efluxo provocadas por heparina, dextran 8.000 e condroitim fucosilado e sulfatado.

4. De modo similar ao observado no artigo 1, o efluxo unidirecional de Ca^{2+} estimulado por heparina (medido à pH 6.0) foi bloqueado por K^+ e Na^+ . Todavia, o efeito causado pelo dextran 500.000 (medido à pH 6.0) só foi bloqueado por K^+ , sendo o Na^+ e o Li^+ inefetivos.

5. A potência inibitória da heparina e dextran 8.000 sobre o transporte de Ca^{2+} aumento com a diminuição do pH de 7.0 para 6.0, enquanto que o efeito inibitório do dextran sulfato 500.000 não foi influenciado pelo pH do meio. Estes resultados sugerem que à pH 7.0 os polissacarídeos heparina e dextran sulfato 8.000 inibem o transporte de Ca^{2+} provavelmente por simples inibição da bomba, enquanto que a pH

6.5 e 6.0 parte do efeito inibitório sobre a captação de Ca^{2+} pode ser uma consequência da transformação da bomba em canal. Já para o caso dextran sulfato 500.000 é provável que o mecanismo de inibição do transporte do Ca^{2+} envolva tanto a inibição da bomba como a estimulação do efluxo (transformação da bomba em canal), independente do pH do meio.

Geral

Os resultados destes dois artigos sugerem que os polissacarídeos podem ter um papel modulatório potencial sobre o transporte de Ca^{2+} por microsomas cerebrais, especialmente em situações patológicas tais como a hipóxia. Nesta situação os níveis de K^+ intracelular diminuem e o Na^+ intracelular aumenta. Concomitantemente o pH diminui e normalmente o Ca^{2+} intracelular aumenta consideravelmente. Embora o papel exato do Ca^{2+} no processo irreversível de dano celular não esteja ainda definitivamente estabelecido, supõe-se que este cátion esteja envolvido, pelo menos, na determinação da morte celular. Assim, os polissacarídeos poderiam prejudicar uma tentativa de recuperação das células em situações extremas.

REFERÊNCIAS

- Arrondo, J.L.R., Mantsch, H.H., Mullner, N., Pikula, S. & Martonosi, A. (1987) Infrared spectroscopic characterization of the structural changes connected with the E1->E2 transition in the Ca²⁺-ATPase of sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **262**, 9037-9043.
- Benech J.C., Wolosker, H. and de Meis, L. (1995) Reversal of the Ca²⁺ pump of blood platelets. *Biochem. J.* **306**, 35-38.
- Blasie J.K., Asturias F.J. & DeLong L.J. (1992) Time-resolved x-ray diffraction studies on the mechanism of active Ca²⁺ transport by the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **671**, 11-18.
- Blaustein M., Ratzlaff R.W., Kendrick N.C. and Schweitzer E.S.(1978) Calcium buffering in presynaptic nerve terminals. *J. Gen. Physiol.* **72**, 15-41.
- Bozler E. (1954) Relaxation in extracted muscle fibers. *J. Gen. Physiol.* **38**, 149-159.
- Brady G.W., Fein D.B., Harder M.E. & Meissner G. (1982) Liquid diffraction analysis of sarcoplasmic reticulum II. Solvent electron contrast variation. *Biophys. J.* **37**, 637-645.
- Brady G.W., Fein D.B., Harder M.E., Spehr R. & Meissner G. (1982) Liquid diffraction analysis of sarcoplasmic reticulum I. Compositional variation. *Biophys. J.* **34**, 13-34.
- Burk S.E., Lytton J., MacLennan D.H. and Shull G.E.(1989) cDNA cloning, functional expression, and mRNA tissue distribution of a third organellar Ca²⁺ pump. *J. Biol. Chem.* **264**, 18561-18568.

Busa W.B. & Nuccitelli R (1984) Metabolic regulation via intracellular pH. *Am. J. Physiol.* **246**, R409-R438.

Campbell M.A., Kessler P.D. & Fambrough D.M. (1992) The alternative carboxy termini of avian cardiac and brain sarcoplasmic reticulum/endoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase are on opposite sides of the membrane. *J. Biol. Chem.* **267**, 9321-9325.

Carafoli E. (1991) Calcium pump of the plasma membrane. *Physiol. Rev.* **71**, 129-153.

Carafoli E. & Guerini D. (1993) Molecular and cellular biology of plasma membrane calcium ATPase. *Trends Cardiovasc. Med.* **3**, 177-184.

Carafoli E., Kessler F., Falchetto R., Heim R., Quadroni M., Krebs J., Strehler E.E. e Vorherr T. (1992) The molecular basis of the modulation of the plasma membrane calcium pump by calmodulin. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **671**, 58-69.

Clarke D.M., Loo T.W., Inesi G. & MacLennan D.H. (1989) Location of high affinity Ca²⁺ binding sites within the predicted transmembrane domain of the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase. *Nature*, **339**, 476-478.

De Meis L. (1981). *The Sarcoplasmic Reticulum*. Editor: E. E. Bittar. John Wiley & Sons, Inc.

De Meis L. (1991) Fast efflux of Ca²⁺ mediated by the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase. *J. Biol. Chem.* **266**, 5736-5742.

De Meis L. (1993) The concept of energy-rich phosphate compounds: Water, transport ATPases, and entropic energy. *Arch. Biochem. Biophys.* **306**, 287-296.

De Meis L., Rubin-Altschul B.M. and Machado R.D. (1970) Comparative data of Ca²⁺ transport in brain and skeletal muscle microsomes. *J. Biol. Chem.* **245**. 1883-1889.

De Meis L., Gomez-Puyou M.T. and Gomez-Puyou A. (1988) Inhibition of mitochondrial F₁ ATPase and sarcoplasmic reticulum ATPase by hydrophobic molecules. *Eur. J. Biochem.* **171**, 343-349.

De Meis L. and Inesi G. (1992) Functional evidence of a transmembrane channel within the Ca²⁺ transport ATPase of sarcoplasmic reticulum. *FEBS Let.* **299**, 33-35.

De Meis L., Martins O.B. & Alves E.W. (1980) Role of water, hydrogen ion, and temperature on the synthesis of adenosine triphosphate by the sarcoplasmic reticulum adenosine triphosphate in the absence of a calcium ion gradient. *Biochemistry* **19**, 4252-4261.

De Meis L. and Suzano V. (1994) Uncoupling of muscle and blood platelets Ca²⁺ transport ATPase by heparin. *J. Biol. Chem.* **269**, 14525-14529.

De Meis L., Suzano V. & Inesi G. (1990) Functional interactions of catalytic site and transmembrane channel in the sarcoplasmic reticulum ATPase. *J. Biol. Chem.* **265**, 18848-18851.

De Meis L. & Vianna A. (1979) Energy interconversion in the Ca⁺⁺-dependent ATPase of the sarcoplasmic reticulum. *Ann. Rev. Biochem.* **43**, 275-292.

Deamer D.W. & Baskin R.J. (1969) Ultrastructure of sarcoplasmic reticulum preparations. *J. Cel. Biol.* **42**, 296-301.

Dow K.E., Riopelle R.J. & Kisilevsky R. (1991) Domains of neuronal heparan sulfate proteoglycans involved in neurite growth on laminin. *Cell Tis. Res.* **265**, 345-351.

Dupont Y., Harrison S.C. & Hasselbach W. (1973) Molecular organization in the sarcoplasmic reticulum membrane studied by x-ray diffraction. *Nature* **244**, 555-558.

- Ebashi S. (1960) Calcium binding and relaxation in the actomyosin system. *J. Biochem.* **48**, 150-151.
- Ebashi S. (1961) Calcium binding activity of vesicular relaxing factor. *J. Biochem.* **50**, 236-244.
- Ebashi S. & Lipman F. (1962) Adenosine triphosphate linked concentration of calcium ion in a particular fraction of rabbit muscle. *J. Cell. Biol.* **14**, 389-400.
- Ebashi S. (1993) From the relaxing factor to troponin. *Biomedical Res.* **2**, 1-7.
- Engelender S., Wolosker H., and de Meis L. (1995) The Ca^{2+} ATPase isoforms of platelets are located in distinct functional Ca^{2+} pools and are uncoupled by a mechanism different from that of skeletal muscle Ca^{2+} -ATPase. *J. Biol. Chem.* **270**, In press.
- Faissner A., Clement A., Lochter A., Streit A., Mandl C. and Schachner M, (1994) Isolation of a neural chondroitin sulfate proteoglycan with neurite outgrowth promoting properties. *J. Cell. Biol.* **126**, 783-799.
- Fedarko, N.S. and Conrad, E. (1986) A unique heparan sulfate in the nuclei of hepatocytes: Structural changes with the growth state of the cells. *J. Cell. Biol.* **102**, 587-599.
- Gallina A. & De Meis L. (1992) Ca^{2+} translocation and catalytic activity of the sarcoplasmic reticulum ATPase. *J. Biol. Chem.* **266**, 17978-17982.
- Grubmeyer C. and Penefsky H.S. (1981) The presence of two hydrolytic sites on beef heart mitochondrial adenosine triphosphatase. *J. Biol. Chem.* **256**, 3718-3727.

Gunteski-Hamblin A., Greeb J. and Shull G.E. (1988) A novel Ca^{2+} pump expressed in brain, kidney, and stomach is encoded by an alternative transcript of the slow-twitch muscle sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase gene. *J. Biol. Chem.* **263**, 15032-15040.

Harman A.W. & Maxwell M.J (1995) An evaluation of the role of calcium in cell injury. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **35**, 129-144.

Hasselbach W. & Makinose M. (1961) Die Calciumpumpem der "Erschiaffungsgrana" des Muskels and ihre Abhangigkeit von der ATP-Spaltung. *Biochem. Zeitschrift.* **333**, 518-528.

Hasselbach W & Makinose M. (1963) Über den Mechanismus des Calciumtransportes darch die Membranen des Sarkoplasmanischen Reticulums. *Biochem. Zeitschrift.* **339**, 94-111.

Henzi V. & MacDermott, A.B. (1992) Characterization and function of Ca^{2+} and inositol 1,4,5 trisphosphate-releasable stores of Ca^{2+} in neurons. *Neuroscience* **46**, 251-273.

Herbette L., DeFoor P., Fleischer S., Pascolini D., Scarpa A. & Blasie J.K. (1985) The separate profile structures of the functional calcium pump protein and the phospholipid bilayer within isolated sarcoplasmic retiuclum membranes determined by x-ray and neutron diffraction analysis. *Biochem. Biophys. Acta* **817**, 103-122.

Hill D.T., Berggren P.O. and Boynton A.L. (1987) Heparin inhibits inositol trisphosphate induced calcium release in permeabilized rat liver cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **149**, 879-901.

- Ikemoto N. (1975) Transport and inhibitory Ca^{2+} binding sites on the ATPase enzyme isolated from the sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **250**, 7219-7224.
- Inamitsu, T. & Ohtsuki, I. (1984). Characterization of ATP-dependent Ca^{2+} uptake by canine brain microsomes with saponin. *Eur. J. Biochem.* **145**, 115-121.
- Inesi G. (1972) Active transport of calcium ion in sarcoplasmic membranes. *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* **1**: 191-210.
- Inesi G. (1985) Mechanism of calcium transport. *Ann. Rev. Physiol.* **47**: 573-601.
- Inesi G. & Asai H. (1968) Trypsin digestion of fragmented sarcoplasmic reticulum. *Arch. Biochem. Biophys.* **126**, 469-477.
- Inesi G., Cantilina T., Yu X., Nikic d., Sagara Y. & Kirtley M.E. (1992) Long-range intramolecular linked function in activation and inhibition of SERCA ATPases. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **671**, 32-48.
- Inesi G. & Kirley M.R. (1992) Structural features of cation transport ATPases. *J. Bioenerg. Biomem.* **24**, 271-282.
- Inesi G. & Sagara Y. (1994) Specific inhibitors of intracellular Ca^{2+} transport ATPases. *J. Membrane Biol.* **141**, 1-6.
- Inesi G., Sumbilla C. & Kirtley M.E. (1990) Relationships of molecular structure and function in Ca^{2+} -transport ATPase. *Physiol. Rev.* **70**, 749-760.
- Ishihara M., Fedarko, N.S. and Conrad, E. (1987) Involvement of phosphatidylinositol and insulin in the coordinate regulation of proteoglycan sulfate metabolism and hepatocyte growth. *J. Biol. Chem.* **262**, 4708-4716.

- Jardetzky O. (1966) Simple allosteric model for membrane pumps. *Nature* **211**, 969-970.
- Katchman A.N. & Hershkowitz N. (1993) Early anoxia-induced vesicular glutamate release from mobilization of calcium from intracellular stores. *J. Neurophysiol.* **70**, 1-7.
- Kielley W.W. & Meyerhof O. (1948) Studies on adenosinetriphosphatase of muscle.II. A new magnesium-activated adenosinetriphosphatase. *J. Biol. Chem.* **176**, 591-601.
- Kjellen L. and Lindahl, U. (1991) Proteoglycans: Structures and interactions. *Ann. Rev. Biochem.* **60**, 443-475.
- Kiedrowski L., Brooker G., Costa E. and Wroblewski J.T. (1994a) Glutamate impairs neuronal calcium extrusion while reducing sodium gradient. *Neuron* **12**, 295-300.
- Kiedrowski L., Wroblewski J.T. and Costa E. (1994b) Intracellular sodium concentration in cultured cerebellar granule cells challenged with glutamate. *Mol. Pharmacol.* **45**, 1050-1054.
- Kostyuk P. & Verkhratsky A. (1994) Calcium stores in neurons and glia. *Neuroscience* **63**, 381-404.
- Kraig R.P., Pulsinelli W.A. & Plum F. (1985) Hydrogen ion buffering during complete brain ischemia. *Brain Res.* **342**, 281-290.
- Krnjevic K. & Xu, Y.Z. (1989) Dantrolene suppresses the hyperpolarization or outward current observed during anoxia in hippocampal neurons. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **67**, 1602-1604.

- Kumagai H., Ebashi F. & Takeda F. (1955) Essential relaxing factor in muscle other than myokinase and creatine phosphokinase. *Nature* **176**, 166.
- Lipmann L. (1941) Metabolic generation and utilization of phosphate bond energy. *Adv. Enzimol.* **18**, 99-162.
- Lytton J. and MacLennan D.H. (1988). Molecular cloning of cDNA from human kidney coding for two alternatively spliced products of the cardiac Ca²⁺ ATPase gene. *J. Biol. Chem.* **263**, 15024-15031.
- Lytton J. , Westlin M., Burk S.E., Shull G.E. & MacLennan D.H. (1992) Functional comparisons between isoforms of the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum family of calcium pump. *J. Biol. Chem.* **267**, 14483-14489.
- MacLennan D.H., Brandl C.J., Korczak B., Green N.M. (1985) Amino-acid sequence of a Ca²⁺+ Mg²⁺ dependent ATPase from rabbit muscle sarcoplasmic reticulum, deduced from its complementary DNA sequence. *Nature* **316**, 696-700.
- MacLennan D.H., Toyofuku T. & Lytton J. (1992) Structure-function relationship in sarcoplasmic or endoplasmic reticulum type Ca²⁺ pump. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **671**, 1-10.
- Marsh B.B. (1951) A factor modifying muscle fibre syneresis. *Nature* **167**, 1065-1066.
- Martin R.L. , Lloyd H.G.E. & Cowan A.I. (1994) The early event of oxygen and glucose deprivation: Setting the scene for neuronal death? *Trends Neurosci.* **17**, 251-257.
- Miller K.K., Verma A., Snyder S.H. and Ross C.A. (1991) Localization of an endoplasmic reticulum calcium ATPase mRNA in rat brain by in situ hybridization. *Neuroscience* **43**, 1-9.

- Maruyama K. & MacLennan D.H. (1988) Mutation of aspartic acid-351, lysine-352, and lysine-515 alters the Ca²⁺ transport activity of the Ca²⁺-ATPase expressed in COS-1 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 3314-3318.
- Nicotera P, Bellomo G. & Orrenius S. (1992) Calcium-mediated mechanisms in chemically-induced cell death. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **32**, 449-470.
- Oohira,A., Katoh-Semba,R., Watanabe,E. and Matsui,F. (1994). Brain development and multiple molecular species of proteoglycan. *Neurosci. Res.* **20**, 195-207.
- Papazian, D., Rahaminoff, H. & Goldin,S.M. (1979). Reconstitution and purification by "transport specificity fraction" of an ATP-dependent calcium transport component from synaptosome-derived vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **76**, 3708-3712.
- Petreski, J.H., Wolosker, H. and De Meis, L. (1989) Activation of Ca²⁺ uptake and inhibition of reversal of the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ pump by aromatic compounds. *J. Biol. Chem.* **264**, 20339-20343.
- Pietrobon D., Di Virgilio F. & Pozzan T. (1990) Structural and functional aspects of calcium homeostasis in eukaryotic cells. *Eur. J. Biochem.* **193**, 599-622.
- Rossi A., Larsson O., Manzo L., Orrenius S., Vahter M., Berggren P. & Nicotera P. (1993) Modifications of Ca²⁺ signaling by inorganic mercury in PC12 cells. *FASEB J.* **7**, 1507-1514.
- Rossi A., Manzo L., Orrenius S., Vahter M. & Nicotera P. (1991) Modification of cell signalling in the cytotoxicity of metals. *Pharmacol. Toxicol.* **68**, 424-429.
- Satomi, D. (1979) The state of accumulated calcium in mouse brain microsomes in vitro. *J. Biochem.* **85**, 1439-1446.

Shull G.E., Clarke D.M. & Guteski-Hamblin A.M. (1992) cDNA cloning of possible mammalian homologs of the yeast secretory pathway Ca^{2+} -transporting ATPase. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **671**, 70-81.

Stipp C.S., Litwack E.D. & Lander A.D. (1990) Cerebroglycan: An integral membrane heparan sulfate proteoglycan that is unique to the developing nervous system and expressed specifically during neuronal differentiation. *J. Cell Biol.* **124**, 149-160.

Supattapone S., Danoff S., Theibert A., Joseph S.K. Steiner J. and Snyder S.H. (1988a) Cyclic AMP-dependent phosphorylation of a brain inositol trisphosphate receptor decreases its release of calcium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 8747-8750.

Supattapone S., Worley P.F., Barabam J.M. and Snyder S.H. (1988b) Solubilization, purification, and characterization of an inositol trisphosphate receptor. *J. Biol. Chem.* **263**, 1530-1534.

Toyoshima C., Sasabe H. & Stokes D.L. (1993) Three-dimensional cryo-electron microscopy of the calcium ion pump in the sarcoplasmic reticulum membrane. *Nature* **362**, 469-471.

Trotta E.E. and de Meis L. (1978) Adenosine 5-triphosphate-orthophosphate exchange catalyzed by the Ca^{2+} -transport ATPase of brain. *J. Biol. Chem.* **253**, 7821-7825.

Trotta E.E. and de Meis L. (1975) ATP-dependent calcium accumulation in brain microsomes: Enhancement by phosphate and oxalate. *Biochim. Biophys. Acta* **394**, 239-247.

- Verma A., Hirshc D.J., Hanley M.R., Thastrup O., Christensen S.B. and Snyder S.H. (1990) Inositol triphosphate and thapsigargin discriminate endoplasmic reticulum stores of calcium in rat brain. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **172**, 811-816.
- Vieira R.P., Mulloy B. & Mourão P.A.S (1991) Structure of a fucose-branched chondroitin sulfate from sea cucumber. *J. Biol. Chem.* **266**, 13530-13532.
- Vieira R.P., Pedrosa C. & Mourão P.A.S. (1993) Extensive heterogeneity of proteoglycans bearing fucose-branched chondroitin sulfate extracted from the connective tissue of sea cucumber. *Biochemistry* **32**, 2254-2262.
- Vieyra, A., Scofano, H.M., Guimaraes-Motta, H., Tume, R.K. & De Meis, L. (1979) Transient state kinetic studies of phosphorylation by ATP and ADP Pi of the calcium-dependent ATPase from sarcoplasmic reticulum. *Biochem. Biophys. Acta* **568**, 437-445.
- Wolosker H., Engelender S. & De Meis L. (1995) Ligand-gated channel of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ transport ATPase. *Biosci. Report*, **15**, 365-376.
- Wolosker H., Engelender S. & De Meis L. (1996) Reaction mechanism of the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase. In *Ion Pumps*, Editor: E. Bittar; Organizer J.P. Andersen, JAI Press. no prelo.
- Wolosker, H., Petretski J.H. and de Meis L. (1990) Modification of ATP regulatory function in sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase by hydrophobic molecules. *Eur. J. Biochem.* **193**, 873-877.

Wolosker H. and de Meis L. (1994) pH-dependent inhibitory effects of Ca^{2+} , Mg^{2+} , and K^+ on Ca^{2+} efflux mediated by sarcoplasmic reticulum ATPase. *Am. J. Physiol.* **266**, C1376-C1381.

Wolosker H., Pacheco A.G.F. and de Meis L. (1992) Local anesthetics induce fast Ca^{2+} efflux through a nonenergized state of the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase. *J. Biol. Chem.* **267**, 5785-5789.

Wuytack F., Papp B., Verboomen, H., Raeymackers L., Dode L. Bobe R., Enouf, J., Bokkala S., Authi, K.S. and Casteels R. (1994) A sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase 3-type Ca^{2+} pump is expressed in platelets, in lymphoid cells, and in mast cells. *J. Biol. Chem.* **268**, 1410-1416.

Wuytack F., Raeymackers L., De Smedt H., Eggermont J.A., Missiaen L., Bosch V., De Jaegere S., Verboomen H., Plessers L. e Casteels R. (1992) Ca^{2+} -Transport ATPases and their regulation in muscle and brain. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **671**, 82-91.

Yanagishita, M. and Hascall, V.C. (1992) Cell surface heparan sulfate proteoglycans. *J. Biol. Chem.* **267**, 9451-9454.

ANEXOS

ANEXO I - ARTIGOS PUBLICADOS COM PARTICIPAÇÃO DE BOLSISTAS DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA (PERÍODO 1992-1995)

Os seguintes artigos foram publicados com a participação de bolsistas de iniciação científica durante o período de realização do doutorado:

1) ROCHA JBT, EMANUELLI T, PEREIRA ME (1993) Effects of early undernutrition on kinetic parameters of brain acetylcholinesterase from adult rats. Acta Neurobiologiae Experimentalis, **53**: 431-437.

Trabalho realizado com a participação da Bolsista do CNPq (Programa Institucional UFSM/UFPel/FURG-CNPq 1992-1993) TATIANA EMANUELLI

2) ROCHA JBT, FREITAS AJ, MARQUES MB, PEREIRA ME, EMANUELLI T, SOUZA DO (1993) Effects of methylmercury exposure during the second stage of rapid postnatal brain growth on negative geotaxis and on delta-aminolevulinate dehydratase of suckling rats. Braz. J. Med. Biol. Res., **26**: 1077-1083.

Trabalho realizado com a participação dos Bolsistas de iniciação Alexandre Jacobsen de Freitas (CNPq 800317/92-0) e Tatiana Emanuelli (Programa Institucional UFSM/UFPel/FURG-CNPq) e com a Bolsista recém-mestre Marisa Marques (FAPERGS - 92.60797.9)

3) **GIERUS M, ROCHA JBT, WARPECHOWSKI MB, RIGEL RE** (1993) Effects of rice hulls and bermudagrass (*Cynodon dactylon*, cv coastcross) on growth performance of weaning rabbits. Archivos Latinoamericanos de Nutricion.

Trabalho realizados com a participação dos bolsistas do CNPq Martin Gieures e Marson Warpechowski (Processo 800317/92, modalidade IC).

4) **OLIVEIRA EM, ROCHA JBT, SARKIS JJ** (1994) In vitro and in vivo effects of HgCl₂ on synaptosomal ATP diphosphohydrolase (EC 3.6.1.5) from cerebral cortex of developing rats. Archives Internationales de Physiologie, de Biochemie et de Biophysique, **102**, 251-254.

Trabalho realizado com a participação da bolsista de iniciação científica Edilamar Oliveira (FAPERGS período de 1990) e com orientação do Prof. João José Freitas Sarkis.

5) **ROCHA JBT, PEREIRA ME, EMANUELLI T, CHRISTOFARI RS, SOUZA DO** (1995) Effects of treatment with mercury chloride and lead acetate during the second stage of rapid postnatal brain growth on delta-aminolevulinic acid dehydratase (ALA-D) activity in brain, liver, kidney and blood of suckling rats. Toxicology, **100**, 27-37.

Trabalho realizado com a participação dos Bolsistas de iniciação Rosane Christofari (CNPq 52.1661/94.3, modalidade AI) e Tatiana Emanuelli (Programa Institucional UFSM 1993/1994-CNPq).

**ANEXO II - ARTIGOS PUBLICADOS (OU ACEITOS) COM PARTICIPAÇÃO DE
BOLSISTAS DE MESTRADO (CO-ORIENTAÇÃO) (PERÍODO 1994-1995)**

6) **EMANUELLI T, ROCHA JBT, PEREIRA ME, PORCIUNCULA LO, MORSCH VM, MARTINS AF, SOUZA DO** (1996) Effects of mercuric chloride intoxication and dimercaprol treatment on delta-aminolevulinate dehydratase from brain, liver and kidney of adult mice. Pharmacol. Toxicol. In press.

Trabalho realizado pela mestrandia Tatiana Emanuelli (UFRGS) com a participação da Bolsista Iniciação Lisiane Porciuncula (UFSM, CNPq 52.1661/94.3, modalidade AI).

7) **KOZLOSKI GV, ROCHA JBT, RIGEL RE** (1996) Net portal flux of metabolites following a meal in calves fed a grain-rich diet supplemented with urea or meat meal. Can. J. Animal Sci. In press.

Trabalho realizado pelo mestre em Zootecnia Gilberto Kozloski. Durante o período posterior à Tese o Gilberto recebeu bolsa de recém-mestre sob minha orientação (FAPERGS 95.60140.5).

8) **FREITAS AJ, ROCHA JBT, WOLOSKER H, SOUZA DO** (1996) Effects of inorganic mercury chloride and methylmercury on Ca²⁺ fluxes in rat brain microsomes. Brain Res. (com parecer favorável dos revisores).

Trabalho realizado pela mestrando Alexandre Jacobsen de Freitas.

ANEXO III - OUTROS ARTIGOS

9) MULLER J, ROCHA JBT, BATTASTINI AMO, SARKIS JJF, DIAS RD (1993) Postnatal development of ATPase-ADPase activities in synaptosomal fraction from cerebral cortex. Neurochem. Intern., **23**, 471-477.

10) ROCHA JBT, MELLO CF (1994) Handling during suckling alters rat behavior but does not reverse the deleterious effects of undernutrition on naltrexone-induced inhibition of exploratory activity. Intern. J. Vitam. Nutr. Res., **64**, 152-156.

11) ROCHA JBT, SOUZA DO (1994) Effects of undernutrition during suckling and early postweaning on the inhibition by met-enkephalin of striatal adenylate cyclase activity in adults rats. Pharmacol. Toxicol., **75**, 321-323.

12) RODRIGUES ALS, ROCHA JBT, PEREIRA ME, SOUZA DO (1996) D-aminolevulinic acid dehydratase activity in weanling and adult rats exposed to lead acetate. Bull. Environ. Cont. Toxicol. In press.

13) RODRIGUES ALS, ROCHA JBT, MELLO CF, SOUZA DO (1996). Effect of perinatal lead exposure on rat behaviour in open-field and two way avoidance tasks. Pharmacol. Toxicol. In press.

ABSTRACT

Rat brain microsomes accumulate Ca^{2+} at the expense of ATP hydrolysis. The rate of transport is not modulated by the monovalent cations K^+ , Na^+ or Li^+ . Both the Ca^{2+} uptake and the Ca^{2+} -dependent ATPase activity of microsomes are inhibited by the sulfated polysaccharides heparin, fucosylated chondroitin sulfate and dextran sulfate. Half maximal inhibition is observed with sulfated polysaccharide concentrations ranging from 0.5 to 8.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$. The inhibition is antagonized by KCl and NaCl but not by LiCl . As a result, Ca^{2+} transport by the native vesicles which in the absence of polysaccharides is not modulated by monovalent cations becomes highly sensitive to these ions.

Trifluoperazine has a dual effect on the Ca^{2+} pump of brain microsomes. At low concentrations (20 to 80 μM) it stimulates the rate of Ca^{2+} influx and at concentrations higher than 100 μM it inhibits both the Ca^{2+} uptake and the ATPase activity. The activation observed at low trifluoperazine concentrations is specific for the brain Ca^{2+} -ATPase: For the Ca^{2+} -ATPases found in blood platelets and in the sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle, trifluoperazine causes only a concentration-dependent inhibition of Ca^{2+} uptake. Passive Ca^{2+} efflux from brain microsomes preloaded with Ca^{2+} is increased by trifluoperazine (50 μM to 150 μM), and this effect is potentiated by heparin (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$), even in the presence of KCl . It is proposed that the Ca^{2+} ATPase isoform from brain microsomes is modulated differently by polysaccharides and trifluoperazine when compared to skeletal muscle and platelet isoforms. Rat brain microsomes accumulate Ca^{2+} at the

expense of ATP hydrolysis. Addition of sulfated polysaccharides to microsomes after a steady state of Ca^{2+} uptake was reached caused a significant Ca^{2+} release that was antagonized by K^+ . However, at neutral pH, heparin (up to 100 $\mu\text{g/ml}$), dextran sulfate 8,000 (up to 8 $\mu\text{g/ml}$) and fucosylated chondroitin sulfate (up to 10 $\mu\text{g/ml}$) did not increase unidirectional Ca^{2+} efflux (Ca^{2+} efflux measured in the absence of Ca^{2+} ATPase substrates and ligands) in brain microsomes. The unidirectional Ca^{2+} efflux in the presence of EGTA increased about 2-fold when pH was decreased from 7.0 to 6.0. In contrast to that observed at pH 7.0, at acid pH, all the sulfated polysaccharides tested increased the Ca^{2+} efflux rate. Dextran sulfate 500,000 increased unidirectional Ca^{2+} efflux, regardless the pH of the medium. Potassium ion antagonized the effect of all sulfated polysaccharides tested. The inhibitory potency of heparin, dextran sulfate 8,000 and branched and fucosylated chondroitin sulfate increase as pH of the medium is acidified. As for the case of unidirectional Ca^{2+} efflux, the inhibitory potency of dextran sulfate 500,000 was not affected by medium pH. These results indicate that sulfated polysaccharides inhibit Ca^{2+} transport and promote unidirectional Ca^{2+} efflux with higher potency at an acidic pH.

RESUMO

Microsomas de cérebro de ratos acumulam Ca^{2+} contra-gradiente através da hidrólise do ATP. O transporte de Ca^{2+} não é modulado pelos cátions monovalentes K^+ , Na^+ ou Li^+ . A captação de Ca^{2+} e a atividade Ca^{2+} -ATPásica dos microsomas foram inibidas pelos polissacarídeos sulfatados: heparina, condroitim fucosilado e sulfatado, dextran sulfato 8.000 e dextran sulfato 500.000. O IC50 (concentração de inibidor necessária para inibir 50% da captação ou atividade ATPásica) destes polissacarídeos ficou entre 0.5 à 8.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$. A inibição foi antagonizada por KCl e por NaCl, sendo o LiCl inefetivo. Em consequência, o transporte de Ca^{2+} pelos microsomas cerebrais, que na ausência de polissacarídeos sulfatados não era modulado pelos cátions monovalentes, tornou-se extremamente sensível a presença destes cátions. A trifluoperazina em doses relativamente baixas (até 80 μM) estimulou o transporte de Ca^{2+} em cérebro, mas inibiu este processo quando testada em concentrações mais elevadas. Em músculo e plaquetas a trifluoperazina apenas inibiu o transporte de Ca^{2+} . A Ca^{2+} -ATPase de todas as preparações foi inibida por trifluoperazina, embora a concentração necessária para causar tal efeito tenha sido maior do que aquela que inibia o transporte de Ca^{2+} . O efluxo passivo (medido na ausência de substratos e ligantes da Ca^{2+} -ATPase) foi estimulado pela trifluoperazina (50 μM a 150 μM), sendo este efeito potencializado pela heparina (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$), mesmo na presença de KCl. Propussemos que a modulação da isoforma de Ca^{2+} -ATPase expressa em cérebro por polissacarídeos sulfatados e por trifluoperazina é distinta daquela observada em vesículas derivadas de músculo esquelético de contração rápida e de plaquetas. No

segundo artigo investigamos o efeito dos polissacarídeos sulfatados e do pH sobre o transporte de Ca^{2+} em microsomas de cérebro, especialmente sobre o efluxo de Ca^{2+} de vesículas pré-carregadas. A adição de polissacarídeos sulfatados, após o transporte de Ca^{2+} ter atingido o estado estacionário, promoveu uma liberação do Ca^{2+} previamente captado. Esta liberação foi antagonizada pelo K^+ . Todavia (à pH 7.0), a adição de heparina (até 100 $\mu\text{g/ml}$), dextran sulfato 8,000 (até 8 $\mu\text{g/ml}$) e chondroitim fucosilado sulfatado (até 10 $\mu\text{g/ml}$) não estimulou o efluxo unidirecional de Ca^{2+} (medido na ausência de substratos e ligantes da Ca^{2+} -ATPase) medido em microsomas de cérebro. O efluxo unidirecional de Ca^{2+} medido na presença de EGTA e à pH 6.0 foi cerca de 2 vezes maior do que o observado a pH 7.0. Em pH ácido (6.0) os polissacarídeos sulfatados promoveram um aumento considerável no efluxo unidirecional de Ca^{2+} . O dextran sulfato 500.000 estimulou o efluxo unidirecional de Ca^{2+} independentemente do pH do meio. O KCl antagonizou o efeito de todos os polissacarídeos sulfatados testados. A potência inibitória da heparina, dextran sulfato 8,000 e do condroitim fucosilado sobre o transporte de Ca^{2+} por microsomas cerebrais aumentou com a diminuição do pH do meio. De modo similar ao observado na experiências de efluxo unidirecional, o efeito do dextran sulfato 500.000 não foi afetado pelo pH do meio.