

TEMAS E SESSÕES INTERNAS

Editors

J. Martins e Silva

Carlota Saldanha

“**Actas de Bioquímica**” is primarily concerned with the publication of complete transcripts of the lectures, conferences and other studies presented in Advanced Post-Graduate Courses or in Scientific Symposia organized or co-organized by the Instituto de Bioquímica, Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa. Original or review articles and other scientific contributions in askin fields may also be included.

Editors

J. Martins e Silva
Carlota Saldanha

Editorial Office

Instituto de Bioquímica,
Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa
Av. Prof. Egas Moniz
Lisboa – Portugal

Mailing Address

Actas de Bioquímica
Apartado 4098
1500-001 Lisboa – Portugal

Subscription Information

Subscription price is \$25.00 (twenty five US dollars) (twenty euros) per volume. An additional charge of \$5,00 per volume is requested for post delivery outside Portugal. Payment should accompany all orders. Correspondence concerning subscription should be addressed to the mailing address above.

ISBN: 972-590-076-6

Copyright@ 1991 by Instituto de Bioquímica, Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa. All rights reserved.

Printed in Portugal

ÍNDICE

PREFÁCIO	V
ARTIGOS	
Liposomes and their application to the study of cell membrane fusion <i>F.M. Goñi</i>	3
Isolation of calmodulin - binding proteins from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum <i>M. Graça P. Vale</i>	15
Differentiation between two targets for the action of compound 48/80 on the Ca²⁺ uptake by sarcoplasmic reticulum <i>M. Graça P. Vale, M. Manuel R. Donato</i>	25
SESSÕES INTERNAS DO INSTITUTO	
1987	
Métodos de extracção e separação de lípidos da membrana – acção dos detergentes <i>Yolanda Pinto</i>	43
Metodologia e resultados obtidos com técnicas de doseamento do plasminogénio, alfa₂-antiplasmina e antitrombina III <i>Luís Cardoso</i>	51
O 2,3-bisfosfoglicerato <i>Maria Manuela Nunes</i>	57
Liposomas: princípios teóricos e metodologia <i>Yolanda Pinto</i>	61
1988	
Diabetes e envelhecimento <i>Mário Carreira</i>	71
Dislipidémias e obesidade <i>Leonor Queiroz</i>	75

Respiração mitocondrial	
<i>J.P. Guimarães</i>	79
Organofosforados, seus malefícios	
<i>Filomena Dias Alves</i>	85
Proteínas C e S	
<i>Luís Cardoso</i>	89
Colinesterases e paratição	
<i>Teresa Luísa Quintão</i>	95
Purificação de proteínas	
<i>J. Rodrigues Loureiro</i>	97
Transporte iónico no eritrócito; importância fisiológica do permutador Na^+/H^+	
<i>M. Manuela Nunes</i>	111
Regulação do cálcio intracelular	
<i>Yolanda Pinto</i>	115
Alterações no 2,3-DPG (2,3-difosfoglicerato) em sangue armazenado com implicações na deformabilidade eritrocitária	
<i>M. Manuela Nunes</i>	125
Cromatografia líquida de alta resolução (HPLC)	
<i>Teresa Quintão</i>	129
Factores bioquímicos da migração neoplásica	
<i>Mario Carreira</i>	133
Importância dos grupos sulfidrílicos da membrana eritrocitária na hemólise	
<i>Filomena Alves</i>	139
1989	
Mecanismos reguladores da comunicação endotélio-neurónio no cérebro	
<i>João Paulo Guimarães</i>	141
Acção dos detergentes na membrana eritrocitária	
<i>Yolanda Pinto</i>	149
Interações globulares na agregação eritrocitária	
<i>Luís Cardoso</i>	155
Transporte de água transmembrana eritrocitária	
<i>Manuela Nunes</i>	159

PREFÁCIO

Temos a maior satisfação em acolher neste número de Actas de Bioquímica três importantes artigos de revisão sob diferentes aspectos da bioquímica das membranas. No primeiro desses trabalhos, o Professor Goñi (da Faculdade de Ciências da Universidade do País Basco), demonstra o comportamento de diferentes tipos de fosfolípidos em meio aquoso e a sua importância ao formarem vesículas, como modelos de estudo membranar. Os outros dois trabalhos, da Professora Maria da Graça Vale (da Faculdade de Ciências da Universidade de Coimbra), abordam a modulação do transporte de cálcio através da membrana sarcoplásmica na dependência da actividade da ATPase Ca^{2+} ou da actividade da calmodulina.

Incluem-se também os extractos de comunicações apresentadas por alguns dos docentes e colaboradores voluntários do Instituto de Bioquímicas, nas reuniões científicas internas realizadas de 1987, 1988 e 1989. Na generalidade, os temas abordados relacionavam-se com trabalhos de investigação em que cada um daqueles docentes participava.

Os Editores

ARTIGOS

LIPOSOMES AND THEIR APPLICATION TO THE STUDY OF CELL MEMBRANE FUSION

F.M. Goñi¹

INTRODUCTION

Cell membranes are composed of lipids, proteins, and some sugars, apart from water. The basic matrix upon which membranes are built consists of a phospholipid bilayer. Two regions or domains may be distinguished in phospholipid molecules, a polar, hydrophilic head group and the hydrophobic “tails”. Thus, these molecules are partly hydrophilic, partly hydrophobic; they are said to be amphiphilic. Because of their amphiphilic nature, polar lipids are not just water-soluble, or insoluble, but instead their molecules adopt a variety of dispositions, or phases, when dispersed in water. Lipid mixtures, extracted from cell membranes with organic solvents and evaporated, almost invariably give rise to lamellar phases, or bilayers, upon hydration. The behaviour of the individual phospholipid classes is not always the same, i.e. they do not always form lamellar phases in water, but some of the most common phospholipids, e.g. phosphatidylcholines, are indeed dispersed in the form of bilayers in excess water.

In order to avoid the interaction of water with the hydrophobic lipid “tails” (or hydrocarbon chains), lamellae tend to form closed structures, or vesicles. These artificial phospholipid vesicles are often called liposomes. They were first pointed out as useful membrane models by Bangham and co-workers (1) and have since become the most extensively used model in biomembrane studies (2).

¹ Departamento de Bioquímica, Universidad del País Vasco, Aptdo. 644, 48080 Bilbao, España

Key Words: membrane fusion, membrane models, liposomes, fluorescence

LIPOSOME PREPARATION AND PROPERTIES

Liposomes may be prepared from a pure phospholipid or from lipid mixtures, unilamellar or multilamellar, and, within certain limits, of a given average size. A more detailed review of the different methods can be found in the paper by Szoka and Papahadjopoulos (3). Only a few important or more recent aspects are discussed here.

Lipid Composition. The most commonly used single phospholipid in liposomes is phosphatidylcholine; egg yolk or soya bean lipids are the usual sources. Semisynthetic phospholipids, with fully saturated acyl chains, e.g., dimyristoyl or dipalmitoyl phosphatidylcholines, have also found much use, especially when membrane fluidity (see below) has to be controlled. Mixed chain phosphatidylcholines, containing one saturated and one unsaturated fatty acyl residues, e.g., 1-palmitoyl-2-linoleyl phosphatidylcholines, have also been used in the preparation of liposomes. Vesicles can also be prepared from other phospholipids at neutral pH; phosphatidylserine, phosphatidylglycerol, phosphatidic acid, etc. but not phosphatidylethanolamine, since aqueous dispersions of this lipid do not adopt usually the lamellar disposition.

Lipid mixtures are also employed of both natural and synthetic origin. Total lipid extracts, e.g., soya bean lipids, or lipid mixtures after a crude fractionation, such as acetone precipitation, often constitute a convenient starting material. Mixtures of pure lipids are also in use; two additional precautions are relevant in this case. First, not all phospholipids mix ideally, and very often lateral phase separation occurs; phosphatidylcholine-phosphatidylserine mixtures in the presence of Ca^{2+} are a typical example of the latter possibility. Second, when liposomes are prepared by sonication, phospholipid components may be asymmetrically distributed between the two monolayers, e.g., in mixtures of saturated and unsaturated species, the unsaturated ones tend to be located preferentially in the outer monolayer. Neutral lipids are also incorporated into liposomes for various purposes. Vesicles containing cholesterol have been intensively studied from the point of view of their physicochemical properties: cholesterol modulates lipid fluidity and decreases bilayer permeability (4).

Vesicle Formation. Generally speaking, there are three types of liposomes: multilamellar vesicles (MLV), small unilamellar vesicles (SUV), and large unilamellar vesicles (LUV). MLV were the first liposomes to be described; they form spontaneously when an aqueous solution is added to dry phospholipids. Vesicle formation is easier when the lipid is distributed as a thin film at the bottom of a flask. Mechanical shaking also helps in liposome formation, but may decrease

the amount of entrapped aqueous medium, and this in turn may be disadvantageous. The inner volume of MLV may be easily increased by including charged lipids (e.g., dicetyl phosphate, stearylamine) at 10 to 20 mol% in the bilayers. Although the properties of lipid lamellae in MLV mimic very well those of natural biomembranes, this kind of liposomes suffers from the disadvantage of having phospholipid bilayers with different degrees of accessibility from the external aqueous medium.

SUV are obtained by sonication of MLV either with a probe or a bath sonicator; the former technique is faster, but probe debris from the liposome suspension must be removed by centrifugation prior to use. Sonication time must be long enough to ensure that most, if not all, of the vesicles have attained the unilamellar state. Electron microscopy controls are essential until the technique is properly standardized. SUV are usually 25 to 50 nm in diameter, according to the lipid composition, but very homogeneous in size. One inherent problem of SUV is the metastability of their structure, due to the high lateral strain imposed by the small radius of curvature. It should be also borne in mind that sonication may lead to asymmetric distribution of phospholipids in the bilayer.

LUV are defined as liposomes limited by a single bilayer and having a diameter bigger than 100 nm. In principle, LUV have the combined advantages of MLV and SUV, without their drawbacks. However, their preparation is not always easy. Various techniques have been proposed that can be very briefly described as follows:

1. Controlled detergent dialysis: a micellar suspension of phospholipids and detergent in water is treated, either by dialysis or column chromatography, under carefully monitored conditions, so that LUV are formed.
2. Reverse phase evaporation: LUV are formed from emulsions of phospholipids and buffer in an excess organic phase, followed by removal of the organic phase under reduced pressure.
3. Organic solvent injection: a solution of phospholipids in organic solvent (ethanol, ethyl ether, petroleum ether, etc.) is injected through a fine needle into an aqueous buffer. The solvent is evaporated and LUV are formed.
4. Extrusion: an MLV suspension, prepared following standard procedures, is forced through polycarbonate filters of a given pore diameter, by applying external pressure. After several such steps, a homogeneous suspension of LUV results, free from extraneous organic chemicals.

Vesicle Size. In some cases it is important to work with vesicles of a defined, homogeneous size. In the case of MLV, light microscopy (often after fluorescent staining) can be used for characterizing liposome size distribution. Electron microscopy (freeze fracture or negative staining) can be applied to both large and small vesicles. The size of SUV can also be determined by ultracentrifugation, light scattering, or nuclear magnetic resonance spectroscopy (3).

Apart from the above-mentioned methods for preparing “large” or “small” vesicles, other procedures allow us to obtain liposomes of a more or less defined size. The homogeneity of MLV can be improved, and the average size reduced, by mild sonication of the preformed vesicles or by extrusion through a French press or through polycarbonate membranes. Homogeneous populations of SUV have been obtained by Sepharose chromatography and ultracentrifugation.

Relevant properties of liposomes in relation to membrane fusion studies include bilayer order and fluidity and bilayer permeability.

Bilayer Order and Fluidity; Phase Transitions. Phospholipids in the lamellar state may exist in two phases, above and below a critical temperature, T_c , the so-called liquid-crystalline and gel phases, respectively. They are easily and reversibly interconverted, through a thermotropic phase transition, by cooling or heating the system below or above T_c . A sharp, fully cooperative transition is observed for pure phospholipids, e.g., for dimirystoyl phosphatidylcholine at 23°C. Phospholipid phase transitions may be detected by calorimetric methods as well as by a host of spectroscopic techniques (6). The introduction of double bonds in the fatty acyl chains considerably reduces the transition temperature, e.g. from 55°C for distearoyl to -22°C for dioleoyl phosphatidylcholine. In addition, phospholipid mixtures exhibit a broad transition (e.g., between -15 and -7°C for egg yolk phosphatidylcholine) so that total phospholipid extracts often show no detectable transitions.

The study of phase transitions has been useful in order to detect various important properties of phospholipid bilayers, order and fluidity among them. Above the gel-to-fluid transition, both properties differ in various orders of magnitude from the values below (7). Fluidity (or dynamic order) is a dynamic property of phospholipid bilayers. The lateral diffusion coefficient of bilayer components, D_L , is useful in order to evaluate bilayer fluidity. Order (or static order), on the other hand, is a structural parameter, related to the proportion of gauche rotamers in the phospholipid hydrocarbon chains. “Order parameters” may be derived from a number of vibrational and resonance spectroscopic techniques. Thus, order and fluidity are separate

parameters, requiring different techniques for their measurement, and, they should not be confused (8). In the gel phase, the mobility of the lipid molecules is highly restricted, their polar heads are organized in a quasihexagonal array, and the acyl chains are tightly packed with most c-c bonds in the anti conformation. When temperature is raised above T_c , however, the phospholipids start diffusing laterally in the plane of the membrane and rotating around an axis perpendicular to that plane. Simultaneously, rotation around C-C bonds in the acyl chains also becomes possible, so that the proportion of gauche conformers increases.

Bilayer Permeability. The permeability of a solute across a given membrane depends on a variety of factors, both from the solute and the bilayer. In general, water permeates freely bilayers in the fluid state, and the same is true of small gas molecules, such as CO_2 or oxygen. Uncharged molecules are more permeable than ions, anions more than cations, and monovalent more than divalent ions. A very important factor governing permeability is solute hydrophobicity, often determined by the partition coefficient (classically the olive oil-water system). Nonpolar solutes can more efficiently pass the membrane bilayer than their polar counterparts. It has been suggested that the main energetic barrier for diffusion across membranes is due to the requirement of solute dehydration: it is clear that polar or charged species are more strongly hydrated than nonpolar or electrically neutral solutes.

From the point of view of the bilayer, permeability is enormously increased above the gel-to-fluid phase transition. In general, permeability increases in parallel with membrane fluidity: decreasing chain length, increasing temperature, or increasing unsaturation all tend to make the bilayer more permeable. Compounds other than phospholipids also influence phospholipid bilayer permeability. Molecules whose effect is to decrease membrane order also increase permeability: this is the case of intrinsic proteins. Cholesterol, on the other hand, decreases bilayer permeability above T_c . For this reason, equimolar mixtures of cholesterol and phospholipid are often used to increase the stability of liposome preparations containing trapped solutes (9).

Methods for measuring liposome permeability to a variety of solutes have been described elsewhere (10). Initial fluxes are most conveniently evaluated turbidimetrically: liposomes behave as ideal osmometers, and entry of solute is accompanied by entry of water, so that liposome volume increases and suspension turbidity decreases correspondingly. Methods involving isotopically marked compounds may be used to measure "initial" fluxes in the steady state.

LIPOSOMES IN MEMBRANE FUSION STUDIES

Membrane fusion is an important physiological event that has attracted considerable attention both from membrane biophysicists and biotechnologists (11). Active research is currently taking place in order to elucidate the molecular mechanisms of membrane fusion and the possibilities of experimental modulation of such process. The present work is directed towards the clarification of these two aspects, mechanism and modulation of membrane fusion, and is based on the hypothesis that amphiphilic compounds are intermediates in the fusion event (12).

Taupin and McConnell (13) were the first to describe fusion of sonicated phospholipid vesicles; data that could be related to surfactant-induced liposome fusion have been published by our group (14, 15). Studies on liposome fusion have been greatly helped by the introduction of fluorescence techniques, allowing the independent assay of mixing of vesicle contents and mixing of bilayer lipids (see, e.g., 16, 17).

Methods. Large unilamellar vesicles (LUV) of different compositions were prepared by extrusion through Nuclepore membranes as described by Mayer et al. (18). Vesicle contents mixing and leakage were measured by using the ANTS/DPX system according to Ellens et al. (17); lipid mixing was measured by dilution in the bilayer of the self-quenching probe octadecylrhodamine (R_{18}) as described by Hoekstra et al. (19); the experimental details are described elsewhere (20).

Results. In recent years, diacylglycerols have attracted the attention of scientists, both because of their putative role as metabolic regulators (21) and because of their capacity to destabilize lipid bilayers (22-24). The latter authors have specifically suggested that the ability of diacylglycerols to form nonbilayer structures may constitute the first destabilizing step leading to membrane fusion. In the present work, phospholipase C, an enzyme giving rise to diacylglycerols in the lipid bilayer, has been used to promote fusion of large unilamellar liposomes.

When LUV composed of PC/PE/CHOL (50:25:25 mole ratio) are treated with phospholipase C, vesicle fusion occurs while very small amounts of phospholipid are hydrolyzed, and without significant release of vesicle contents (Figure 1). Fusion is detected as mixing of vesicle contents and mixing of bilayer lipids, respectively in panels A and B of Figure 1. The fusion signal (from mixing of vesicle contents) was not corrected for leakage (17), since the latter was undetectable in the time scale of our observations. Significant leakage could only be observed after periods in the order of minutes (data not shown). Vesicle fusion is accompanied by a concomitant increase in scattered light (Figure 1B).

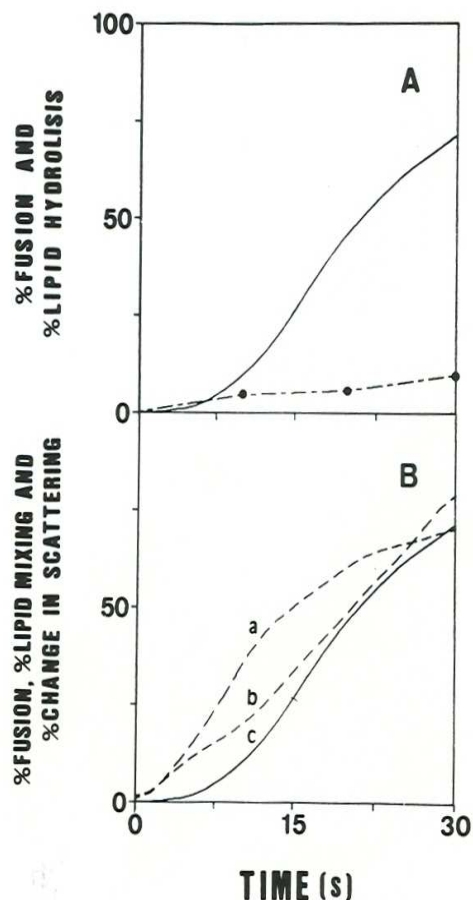


FIGURE 1

Fusion of liposomes (PC/PE/CHOL, 50:25:25 mole ratio) in the presence of phospholipase C. Total-lipid concentration was 0.3 mM; enzyme activity was 1.6 U/mL. (A) Continuous line, fusion as mixing of vesicle contents. Dashed lines, percent phospholipid hydrolyzed by the enzyme; the dots correspond to experimental values. (B) (a) Fusion as mixing of bilayer lipids; (b) percent change in scattered light; (c) fusion as mixing of vesicle contents (redrawn here to facilitate comparison).

The above results were obtained in the presence of $1.6 \text{ IU}\cdot\text{mL}^{-1}$ phospholipase C and 0.3 mM total lipid, corresponding roughly to 10 enzyme molecules per vesicle. The enzyme:lipid ratio was found to be important for the observation of fusion, judging from measurements of leakage-free mixing of aqueous content. As seen in Figure 1A, the fusion curve is sigmoidal and shows a lag period: both the maximum slope, (i.e., maximum fusion rate) and the lag period are modified by the enzyme:lipid ratio (Figure 2). Fusion is observed within a given range of enzyme:lipid ratios, i.e., from about 0.1 to 250 enzyme molecules per vesicle (Figure 2A). Under our conditions, fusion is optimally observed with about 10-20 enzyme molecules per vesicle.

The lag period for the mixing of vesicle contents is monotonically decreased with increasing enzyme concentrations (Figure 2B). When the enzyme is preincubated in the presence of 50 mM

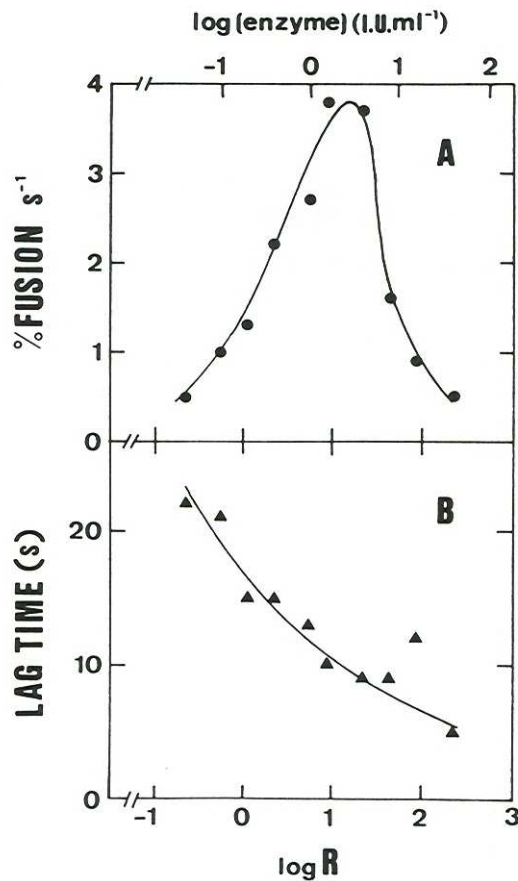


FIGURE 2

Influence of enzyme:lipid ratio on phospholipase C induced liposome fusion (contents mixing). (A) Maximum fusion rates. (B) Lag time of fusion. $R \equiv$ approximate number of enzyme molecules per vesicle (see text).

o-phenanthroline, a specific inhibitor of phospholipase C (25), neither phospholipid hydrolysis nor liposome fusion is observed.

The question of the influence of bilayer composition on the fusogenic effects of phospholipase C was addressed by repeating the above experiments with liposomes containing varying proportions of PC, PE and CHOL. Our results are summarized in Table 1. The optimal enzyme concentration was determined separately in each case, and the corresponding value is also included in Table 1. Preliminary experiments showed that, under our conditions, PC and PE are hydrolyzed at similar rates by phospholipase C. For purposes of comparison, the percent fusion

(mixing of vesicle contents) obtained when 10% of the phospholipid has been hydrolyzed by the enzyme is also included. It is obvious that the bilayer composition is rather critical and that both PE and CHOL are essential, in addition to PC, for significant fusion to occur with low levels of phospholipid hydrolysis.

TABLE 1

Influence of bilayer composition on phospholipase C-induced liposome fusion.

lipid compn. (% PC:PE:CHOL mol ratio)	% fusion at 10% hydrolyzed lipid P	time for 10% lipid hydrolysis (s)	enzyme concn. (IU/mL)
25:50:25	39	25	0.1
25:25:50	25	11	16
33:33:33	15	3	4
50:50:0	5	84	1.6
50:25:25	71	30	1.6
75:25:0	3	80	1.6
70:0:25	3	156	1.6

Discussion. Our results show that phospholipase C, when added to a liposome suspension, can induce (a) mixing of bilayer lipids and, simultaneously or immediately afterwards, (b) leakage-free mixing of vesicle contents (Figure 1). These two observations, taken together, are indicative of liposome-liposome fusion (17). The extent of fusion (>50%) implies that each final fusion product is composed of more than two of the original liposomes (26). None of the above phenomena are observed when the enzyme activity is inhibited by o-phenanthroline; thus, vesicle fusion is being promoted specifically by the catalytic activity of phospholipase C. Since this enzyme cleaves phospholipids releasing diacylglycerols, it can be reasonably assumed that the latter lipids are responsible for the observed phenomena. This is in agreement with the idea of (12) that amphiphile-dependent bilayer destabilization is a step in the process of membrane fusion, and also with the more recent studies on the effects of diacylglycerols on bilayer architecture (23, 27, 28).

The precise role of diacylglycerols in the fusion process is difficult to ascertain. It should be noted that both PE and CHOL are required, in addition to PC, in order to observe significant

amounts of fusion at low levels of phospholipid hydrolysis (Table 1). This means that diacylglycerols alone are not capable of inducing fusion of bilayers whatever their composition. On the other hand, PE and CHOL tend to destabilize the bilayer structure under certain conditions (28-30); diacylglycerols may potentiate the destabilizing properties of those two lipids. Alternatively, diacylglycerols would just facilitate either vesicle aggregation and/or what has been termed "close approach of the surfaces" (26); PE and CHOL would then induce membrane destabilization. The existence of a stage of apposition of the outer monolayers in our system, with some degree of lipid exchange, is shown by the fact that lipid mixing occurs before contents mixing (Figure 1B); this phenomenon has been equally observed in other systems (26, 31).

In the past two decades, there have been numerous instances of cell and vesicle fusion induced by a variety of chemicals (see ref. 11 for review). The present report is, however, to the authors' knowledge, the first to show liposome fusion induced by a catalytic agent, namely, phospholipase C (Morero et al. (32) described vesicle fusion induced by glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, but not hint of a relationship between enzyme activity and fusogenic ability of that protein was given). The biological relevance of our observations remains to be established; it is, however, interesting to note that high phospholipase C activities have been found in mammalian cells from brain (in synaptosomes), sperm, or secretory glands, where frequent fusion processes are expected to occur. It has also been shown that phospholipase C induces, via diacylglycerol, the formation of stomatocytes or echinocytes in human red blood cells (33).

REFERENCES

1. Bangham AD, Staridish MM, Watkins JC - J Mol Biol 13:238, 1965.
2. Bangham AD - Liposome Letters, Academic Press, 1983.
3. Szoka F, Papahadjopoulos D - Annu Rev Biophys Bioeng 9:467, 1980.
4. Oldfield E, Chapman D - FEBS Lett. 23:285, 1972.
5. Hope MJ, Bally MB, Webb G, Cullis P - Biochim Biophys Acta 812:55, 1985.
6. Chapman DQ - Rev Biophys 8:185, 1975.
7. Houslay MD, Stanley KK - Dynamics of Biological Membranes. John Wiley & Sons, Chichester, 1982.
8. Seelig JQ - Rev Biophys 10:353, 1977.
9. Gregoriadis G - (Ed.) Liposome Technology, Vols 1, 2 and 3, CRC Press, Boca Raton, Fla., 1983.
10. Bangham AD, Hill MW, Miller NG - Methods Membr Biol 1:1, 1974.

11. Sowers AE - Cell Fusion, Plenum Press, New York, 1987.
12. Lucy JA - Nature, 227:814, 1970.
13. Taupin C, McConnell HM - In: Mitochondria and Biomembranes (Van den Bergh et al., Eds.) Elsevier, Amsterdam, 1972.
14. Alonso A, Sáez R, Villena A, Goñi FM - J Membr Biol 67:55, 1982.
15. Goñi FM, Alonso A - In: Biotechnological Applications of Lipid Microstructures (Gaber, B.P. et al. Eds.), 81, 1988.
16. Wilschut J, Papahadjopoulos D - Nature, 281:690, 1979.
17. Ellens H, Bentz J, Szoka FC - Biochemistry 24:2099, 1985.
18. Mayer LD, Hope MJ, Cullis PR - Biochim Biophys Acta 858:161, 1986.
19. Hoekstra D, De Boer T, Klappe K, Wilschut J - Biochemistry 23: 5675, 1984.
20. Nieva JL, Goñi FM, Alonso A - Biochemistry 28:7364-7367, 1989.
21. Berridge MJ - Annu. Rev Biochem 56:159, 1987.
22. Dawson RMC, Irvine RF, Bray J, Quinn PJ - Biochem Biophys Res Commun 125:836, 1984.
23. Epand RM - Biochemistry 24:7092, 1985.
24. Das S, Rand RP - Biochemistry 25: 2882, 1986.
25. Little C, Otnaess A - Biochim. Biophys. Acta 391, 326, 1975.
26. Bentz J, Alford D, Cohen J, Düzgünes N - Biophys J. 53:593, 1988.
27. Das S, Rand RP - Biochem Biophys Res Commun 76:267, 1984.
28. Ortiz A, Villalain J, Gómez-Fernández JC - Biochemistry 27:9030, 1988.
29. Tilcock CPS, Bally MB, Farren SB, Cullis PR - Biochemistry 21:4596, 1982.
30. Tilcock CPS, Bally MB, Farren SB, Cullis PR, Gruner SM - Biochemistry 23:2696, 1984.
31. Wilschut J, Nir S, Sholma J, Hoekstra D - Biochemistry 24:4630, 1985.
32. Morero RD, López-Viñals A, Bloj B, Farías RN - Biochemistry 24:1904, 1985.
33. Allan D, Thomas P, Michell RH - Nature, 1978.

ISOLATION OF CALMODULIN - BINDING PROTEINS FROM SKELETAL MUSCLE SARCOPLASMIC RETICULUM

M. Graça P. Vale¹

ABSTRACT

The presence of calmodulin - binding proteins in sarcoplasmic reticulum membranes isolated from skeletal muscle cells was investigated. Affinity chromatography of Triton x-100 solubilised sarcoplasmic reticulum on a Sepharose 4B calmodulin column showed that skeletal muscle sarcoplasmic reticulum contains several calmodulin - binding proteins. The proteins isolated from the membranes have about 60,000, 33,000, 23,000 and 12,000 molecular weight, respectively. The accessibility of the proteins to the immobilized calmodulin depends on the extent of EDTA - washing of the sarcoplasmic reticulum before solubilization. The results indicate that these proteins interact with calmodulin in a Ca^{2+} - dependent way and that they have Mr values similar to those previously detected by affinity labelling with ^{125}I -CaM.

INTRODUCTION

The presence of calmodulin (CaM) in sarcoplasmic reticulum membranes (SR) isolated from skeletal muscle cells has been observed by several investigators (1-6). However, the function of CaM on the activity of this system is not well established.

The Ca^{2+} -ATPase activity involved in the Ca^{2+} transport appears to be insensitive to CaM. There is no direct regulation of the enzyme by CaM and, in contrast to cardiac SR, an indirect regulation mediated by a phospholamban phosphorylating system (7-11) has not been observed in skeletal SR. It has been suggested that CaM is involved in the regulation of the Ca^{2+} release from SR (2, 4, 12) rather than in the regulation of the Ca^{2+} uptake mechanism. Indeed, Ca^{2+} efflux is inhibited when a 60,000 Mr component of the Ca^{2+} release channel is phosphorylated in

¹ Center for Cell Biology, Department of Zoology, University of Coimbra, 3049 Coimbra Codex, Portugal

Key Words: calmodulin - binding proteins, sarcoplasmic reticulum, skeletal muscle.

Abbreviations: CaM, calmodulin; SR, sarcoplasmic reticulum; PMSF, phenylmethylsulfonyl fluoride

a CaM-dependent way (2, 12). This phosphorylation is due to the autophosphorylation properties of the p60 peptide rather than to the activity of a distinct kinase enzyme (13, 14). Although p60 appears to be the most abundant CaM receptor in skeletal SR, other minor CaM-binding proteins were recently identified in these membranes (15). In this work, SR proteins which interact with CaM in a Ca^{2+} -dependent manner were isolated from these membranes by affinity chromatography.

MATERIAL AND METHODS

Preparation of calmodulin-depleted sarcoplasmic reticulum

SR was isolated from rabbit white skeletal muscle as previously described (16). Then, SR membranes (100mg) were washed three times by centrifuging 30 minutes, at 25,000 x g, in a solution containing 50 mM KCl, 10 mM Tris - HCl, 1.5 mM EDTA and 20 μM PMSF at the pH value of 7.0. After this EDTA-treatment, the membranes were washed twice in a medium without EDTA (50 mM KCl, 10 mM Tris-maleate, pH 7.0, 20 μM PMSF) and, finally, they were resuspended in this solution to a final protein concentration of about 15 mg/ml.

The protein was determined by the biuret method using bovine serum albumin as standard (17).

Coupling of calmodulin to Sepharose 4B

CaM was isolated from bovine brain by the method of Alface and Pires (18). Then, it was coupled to Sepharose 4B, essentially, as described by Niggli et al (19). About 3 gr of CNBr-activated Sepharose 4B were swollen for 15 minutes in 200 ml of 1 mM HCl. After removing acid excess by washing on a glass filter, the resin was suspended in a solution containing 0.1 M borate buffer (pH 8.2), 0.4 M NaCl and 38 mg of bovine brain CaM (~3 mg per ml gel). The mixture was incubated overnight at 4° C with gentle mixing. Unbound CaM was washed away with borate buffer and any remaining active groups were reacted overnight, at 4° C, with 1 M ethanolamine (pH 8.2). Then, the resin was washed by filtering several bed volumes of 100 mM NaCl and 40mM Tris - HCl (pH 7.4). After equilibrating in a solution containing 150 mM KCl, 2mM MgCl_2 , 100 μM CaCl_2 , 0.1% Triton x-100, 20 μM PMSF, 2 mM β -mercaptoethanol and 40 mM Tris-HCl (pH 7.4), the CaM-Sepharose gel was packed in a column of 7 cm long x 1 cm.

Affinity chromatography

CaM-depleted SR or native membranes were solubilized by Triton X-100 at a detergent/protein ratio of 1.2/1 (w/w). After adjusting pH to 7.4, the solubilized material was centrifuged 10 minutes at 8,000 x g. Then, the supernatant was applied on the CaM-Sepharose 4B column and fractions of about 2 ml were collected by a LKB collector. After washing the column with 2.5 bed volumes of equilibrating medium, the proteins retained in the CaM affinity column were eluted by an EDTA-containing buffer (150 mM NaCl, 0.1% Triton x - 100, 10 mM EDTA, 20 µM PMSF, 2 mM β-mercaptoethanol and 20 mM Tris HCl, pH 7.4). To the fractions eluted by EDTA, CaCl₂ was added to a final concentration of 12 mM. The profile of protein elution was obtained by recording the transmittance at 280 nm.

EDTA - eluted proteins were concentrated by ultrafiltration using collodion bags SM 13200.

SDS - polyacrylamide gel electrophoresis

Samples of native SR, CaM-depleted SR, Triton x-100 solubilized SR and EDTA - eluted fractions were resuspended in 50µl of a buffer containing 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 5 M urea, 5% SDS and 10 mM β-mercaptoethanol. The mixture was heated for 1 minute in a boiling waterbath and, then, it was applied to a 7-15% polyacrylamide gradient according the Laemmli method (20).

After electrophoresis, the gels were stained with Coomassie brilliant blue for 2 hours and destained overnight in a mixture of 25% methanol and 5 % acetic acid.

RESULTS

Calmodulin affinity chromatography of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum membranes

The presence of CaM-binding proteins in skeletal SR was investigated by studying their capacity to interact with calmodulin immobilized in a Sepharose 4B column.

Fig. 1B shows the chromatography protein elution profile of Triton x-100 solubilized SR which was previously depleted of endogenous CaM by treatment with EDTA. It is observed that most of the protein applied to the column was eluted by the Ca²⁺-containing buffer. However, when

the Ca^{2+} in the elution buffer was replaced by 10 mM EDTA, a small peak of material absorbing at 280 nm was eluted. This indicates that SR proteins were bound to the CaM affinity column in a Ca^{2+} -dependent way.

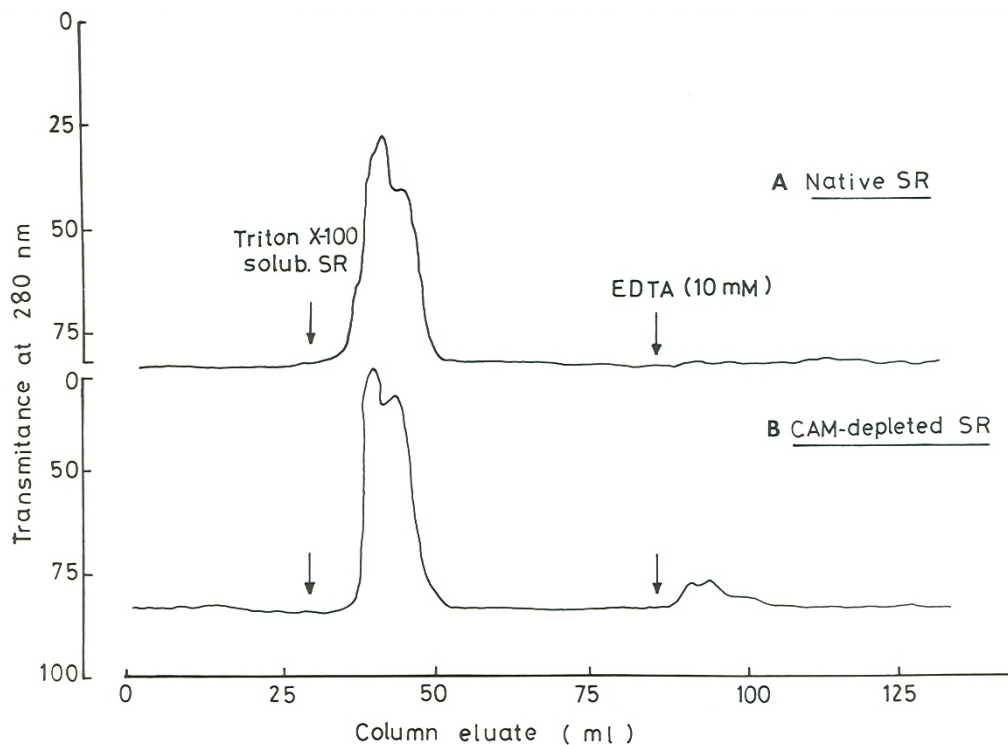


FIGURE 1

Protein elution profile of SR proteins on a CaM-Sepharose 4B column. Triton x-100 solubilized membranes were applied to the column and eluted with a Ca^{2+} -containing buffer as described in “Methods”. At the point indicated by the arrow, the Ca^{2+} -containing buffer was replaced by an EDTA-containing buffer. A. Native membranes; B. CaM-depleted membranes.

On the other hand, after loading the column with solubilized native membranes instead with solubilized EDTA - treated membranes, no Ca^{2+} - dependent retention of proteins was detected, as it is shown in Fig. 1A.

Identification of sarcoplasmic reticulum calmodulin-binding proteins by gel electrophoresis

CaM-binding proteins of skeletal SR were identified by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of the fractions eluted from the Sepharose 48 column by the EDTA-containing buffer (Fig. 2A, lane 4). Four major polypeptides, having Mr around 60,000; 33,000; 23,000 and 12,000 (lane 4),

showed Ca^{2+} -dependent interaction with CaM and were eluted with the EDTA buffer. The ATPase and other protein components of the SR, which can be visualized in lane 1 (native SR); lane 2 (EDTA-washed SR) and lane 3 (Triton x-100 solubilized SR), were not retained by Ca^{2+} in the CaM affinity column and, therefore, they are not Ca^{2+} -dependent CaM receptors.

As can be seen from Fig. 2B, SR membranes not treated with EDTA do not show any Ca^{2+} -dependent interaction of proteins with the Ca^{2+} affinity column (lane 4). Under these conditions, all proteins were eluted in the presence of the Ca^{2+} -containing buffer (lane 3), in agreement with the protein elution profile depicted in Fig. 1A. These observations indicate that depletion of endogenous CaM by EDTA treatment is necessary to become receptors available to exogenous CaM. This supports the observations that CaM is a component of the SR and that it is physiologically associated to the membranes in a Ca^{2+} -dependent way (1-6). Furthermore, these experiments show that Sepharose 4B resin does not retain proteins unless they are interacting with CaM.

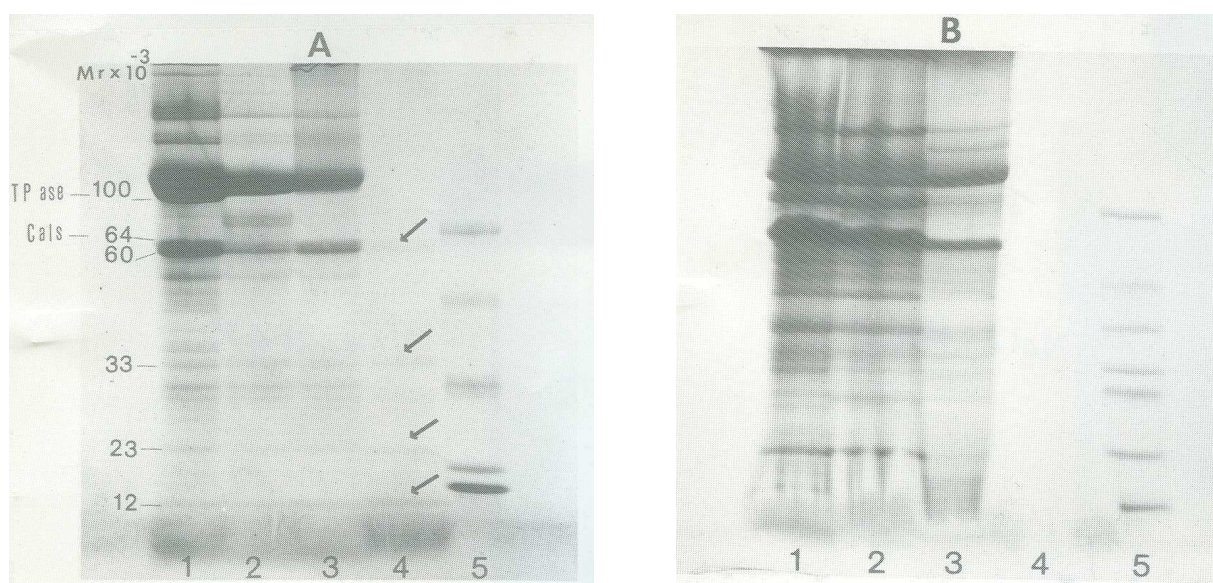


FIGURE 2

Identification of CaM-binding proteins in EDTA-eluted fractions obtained by CaM-affinity chromatography. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis was performed as described in "Methods". A. SR pre-treated with EDTA. Lane 1, native SR; lane 2, EDTA-treated SR; lane 3, Triton X-100 solubilized SR; lane 4, EDTA - eluted fractions; lane 5, molecular mass markers. S. SR membranes not treated with EDT A. Lane 1, native SR; lane 2, Triton X-100 solubilized SR; lane 3, Ca^{2+} -eluted fractions; lane 4, EDT A-eluted fractions; lane 5, molecular mass markers. Cals, calsequestrin. The arraws indicate CaM-binding proteins which are absent in B, lane 4.

The results indicate that SR from skeletal muscle cells contains CaM receptors which are associated to endogenous CaM in a Ca^{2+} -dependent manner. These findings are in agreement with those previously obtained in this laboratory by using ^{125}I -CaM affinity labeling techniques (15). Investigation of the function of these proteins is currently in progress.

DISCUSSION

The presence of calmodulin in SR membranes isolated from fast skeletal muscles has been largely demonstrated by several investigators (1-6). It is assumed that CaM is involved in SR activity since CaM-dependent phosphorylation of several SR proteins has been previously observed (1, 2, 21, 22). Furthermore target proteins for calmodulin were recently identified in skeletal SR (15).

In this work, it is confirmed that SR contains several CaM-binding proteins which can be isolated by affinity chromatography. Proteins of about 60,000, 33,000, 23,000, and 12,000 were retained in a Ca^{2+} -dependent way on a CaM affinity column. They were eluted by using a buffer containing the (Ca^{2+} , Mg^{2+})-chelating agent, EDTA.

On the other hand, it was observed that these proteins are not retained in the column when native membranes were used instead EDTA-washed membranes. This indicates that, in native membranes, CaM-binding proteins are saturated with endogenous CaM in a reaction which is Ca^{2+} -dependent. Therefore, depletion of endogenous CaM is required to make the receptors accessible to the immobilized CaM in the column.

Since CaM-dependent phosphorylating systems have been observed in skeletal SR (1, 2, 12, 21, 22), detection of CaM-binding proteins is not surprising. However, the efficiency of the CaM affinity chromatography technique to visualize CaM receptors depends on the complete depletion of endogenous CaM. Furthermore, it has been observed that Mg^{2+} is required to potentiate CaM binding to the membranes (5, 15), so that the presence of this cation is determinant to visualize CaM receptors in SR.

The target proteins for CaM reported here are in good agreement with those previously detected by photoaffinity cross-linking (15), except that the Mg-dependent CaM receptors ($M_r > 1000,000$) were not retained in the column at the MgCl_2 concentration of 2mM. Furthermore, it was observed that the Ca^{2+} -dependent CaM receptors have molecular weights similar to those of

proteins described as components of the CaM-dependent phosphorylating systems of SR (1, 2, 12, 13).

The 60,000 Da CaM-binding protein represents, probably, the 60,000 Mr component of the Ca²⁺ release channel whose phosphorylation is dependent on CaM (2, 12, 13, 14). Furthermore, the results are consistent with those of Meissner (4) who observed a direct interaction of CaM with the Ca²⁺-release channel.

Although the 60,000 Da protein and calsequestrin (64,000Da) are not well resolved in the SDS-polyacrylamide gels, it appears that calsequestrin is not a significant CaM receptor, since the amount of eluted protein is very low as compared to that of calsequestrin present in the sample. Concerning the 33,000 and 23,000 Mr proteins, we observed that they have molecular weights similar to those of proteins which have been demonstrated to be phosphorylated in a CaM-dependent manner (1).

All these proteins are, probably, kinase enzymes which are autophosphorylated in the presence of CaM. This assumption is supported by the results of Tuana and MacLennan (14), who observed CaM-dependent autophosphorylation of a 60kDa protein of SR. A mechanism like this has been found in the neuronal cytoskeletal protein kinase II (23, 24). Finally the 12,000 Mr component of SR appears to be a proteolipid which, like phospholamban, interacts with CaM (25).

The results reported here show that several proteins of the skeletal muscle SR are Ca²⁺-dependent receptors for calmodulin which can be isolated by affinity chromatography. Experiments are being elaborated to investigate their function in the SR membrane system.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants from the National Institute for Scientific Research (INIC) of the Portuguese Ministry of Education.

REFERENCES

1. Chiesi M, Carafoli E - The regulation of Ca²⁺ transport by fast skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. Role of calmodulin and of the 53,000 dalton glycoprotein. J Biol Chem 257:984-991, 1982.

2. Campbell KP, MacLennan DM - A calmodulin- dependent protein kinase system from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. Phosphorylation of a 60,000 - dalton protein. *J Biol Chem* 257:1238-1246, 1982.
3. Campbell KP, MacLennan DH, Jorgenson AO - Staining of the Ca²⁺-binding proteins, calsequestrin, calmodulin, troponin C and S-100, with the cationic carbocyanine dye "Stainsall" *J. Biol. Chem.* 258:11267-11273,1983.
4. Meissner G - Evidence of a role for calmodulin in the regulation of calcium release from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *Biochemistry* 25:244-251, 1986.
5. Vale MGP - Regulation of intracellular Ca²⁺ concentration: its function on the calmodulin and calpain regulatory systems. *Ciênc. Biol.* 11:149-157, 1986.
6. Campbell KP - Protein components and their roles in sarcoplasmic reticulum function. In: *Sarcoplasmic Reticulum in Muscle Physiology*. Entman ML, and Van Winkle WB (eds.), CRC Press Inc, Florida. 1986, Vol I, pp. 65-99.
7. LePeuch CJ, Maiech J, De Maille JG - Conceited regulation of cardiac sarcoplasmic reticulum calcium transport by cyclic adenosine monophosphate dependent and calcium - calmodulin - dependent phosphorylations. *Biochemistry* 18:5150-5157, 1979.
8. Lopaschuk G, Richter B, Katz S - Characterization of calmodulin effects on calcium transport in cardiac microsomes enriched in sarcoplasmic reticulum. *Biochemistry* 19:5603-5607, 1980.
9. Louis CF, Maffitt M - Characterization of calmodulin-mediated phosphorylation of cardiac muscle sarcoplasmic reticulum. *Arch Biochem Biophys* 218:109-118, 1982.
10. Kirchberger MA, Antonetz T - Calmodulin - mediated regulation of calcium transport and (Ca²⁺ + Mg²⁺)- activated ATPase activity in isolated cardiac sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 257:5685-5691, 1982.
11. Tada M, Inui M, Yamada M, Kadoma M, Kazuya T, Abe H, Rakiuchi S - Effects of phospholamban phosphorylation catalyzed by adenosine 3,5 - monophosphate and calmodulin - dependent protein kinases on calcium transport ATPase of cardiac sarcoplasmic reticulum. *J Mol Cell Cardiol* 15:335-346, 1983.
12. Kim H, Ikemoto N - Involvement of 60 kilodalton phosphoprotein in the regulation of calcium release from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 261:11674-11679, 1986.
13. Sato H, Fukunaga K, Araki S, Ohtsuki I, Miyamoto E - Identification of the multifunctional calmodulin - dependent protein kinase in the cytosol, sarcoplasmic reticulum and sarcolemma of rabbit skeletal muscle. *Arch Biochem Biophys* 260:443-451, 1988.
14. Tuana BS, MacLennan DH - Isolation of the calmodulin - dependent protein kinase system from rabbit skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *FEBS Lett.* 235:219-223, 1988.
15. Vale MGP - Affinity labeling of calmodulin-binding proteins in skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 263:12872-12877, 1988.

16. Vale MGP, Carvalho AP - Utilization of x-537A to distinguish between intravesicular and membrane-bound calcium ions in sarcoplasmic reticulum. *Biochim. Biophys. Acta* 413:202-212, 1975.
17. Layne E - Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins. In: *Methods in Enzymology* Colowick SP and Kaplan NO (eds), Academic Press, New York. 1957, Vol 3, pp. 447-454.
18. Alfaced JS, Pires EV - A rapid method for purification and assay of calmodulin. *Ciênc Biol* 7: 115-125, 1982.
19. Niggli V, Penniston JT, Carafoli E - Purification of the $(Ca^{2+} + Mg^{2+})$ -ATPase from human erythrocyte membranes using a calmodulin affinity column. *J Biol Chem* 254: 9955-9958, 1979.
20. Laemmli UK - Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature* 227:680-685, 1970.
21. Chiesi M, Carafoli E - Role of calmodulin in skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *Biochemistry* 22:985-993, 1983.
22. Seiler S, Wegener AD, Whang DD, Hathaway DR, Jones LR - High molecular weight proteins in cardiac and skeletal muscle junctional sarcoplasmic reticulum vesicles bind calmodulin, are phosphorylated, and are degraded by Ca^{2+} -activated protease. *J Biol Chem* 259:8550-8557, 1984.
23. Le Vine H, Sahyoun NE, Cuatrecasas P - Calmodulin binding to the cytoskeletal neuronal calmodulin-dependent protein kinase is regulated by autophosphorylation. *Proc Natl Acad Sci USA* 82:287-291, 1985.
24. Le Vine H, Sahyoun NE, Cuatrecasas P - Binding of calmodulin to the neuronal cytoskeletal protein kinase type II cooperatively stimulates autophosphorylation. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:2253-2257, 1986.
25. Louis CF, Jarvis B - Affinity labeling of calmodulin-binding components in canine cardiac sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 257:15187-15191, 1982.

DIFFERENTIATION BETWEEN TWO TARGETS FOR THE ACTION OF COMPOUND 48/80 ON THE Ca^{2+} UPTAKE BY SARCOPLASMIC RETICULUM

M. Graça P. Vale and M. Manuel R. Donato¹

ABSTRACT

The effect of the calmodulin antagonist, compound 48/80, on the Ca^{2+} -uptake and Ca^{2+} -ATPase activity of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum was investigated. We found that compound 48/80 inhibits the Ca^{2+} -ATPase and the Ca^{2+} accumulation by sarcoplasmic reticulum. However, the effect depends on the temperature and on the presence of oxalate. Either oxalate or high temperatures ($\sim 37^\circ\text{C}$) increase the inhibition of the pump by compound 48/80. Furthermore, high concentrations of Ca^{2+} ($\sim 10^{-3}$ M) protect the Ca^{2+} pump from inhibition by the drug. The influence of Ca^{2+} is not due to simple competition with compound 48/80 for the ATPase binding sites and the apparent activation energy for the ATP hydrolysis is not altered by the inhibitor up to 37°C . We also observed that, at 25°C and in the absence of oxalate, Ca^{2+} accumulation is inhibited by low concentrations of 48/80 without significant effect on the ATPase activity. The results indicate that compound 48/80 inhibits the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -pump by a mechanism which depends on Ca^{2+} and temperature, and that another target system, which has high sensitivity to 48/80, may be responsible for the Ca^{2+} uptake inhibition by the drug without alteration of the ATPase activity.

INTRODUCTION

The effect of calmodulin antagonists on the Ca^{2+} pump of sarcoplasmic reticulum isolated from skeletal muscle cells has been studied by several investigators (1-9). The results indicate that calmodulin antagonists alter the pump activity through several mechanisms which do not involve

¹ Center for Cell Biology, Department of Zoology, University of Coimbra, 3049 Coimbra Codex, Portugal

Key Words: sarcoplasmic reticulum, Ca^{2+} uptake, compound 48/80

calmodulin: 1) They interact directly with the ATPase (4, 8, 9); 2) They interact with a 53000 dalton glycoprotein (2) which appears to have no direct regulation on the Ca^{2+} transport kinetic (10), but it has been reported to influence the coupling between the Ca^{2+} transport and the ATPase activity (11); and 3) They induce membrane perturbations due to their partitioning into the lipid phase of the sarcoplasmic reticulum (3,6).

In spite of these observations, the presence of calmodulin in skeletal muscle sarcoplasmic reticulum has been extensively reported (1, 2, 12-15), and several calmodulin-binding proteins were recently identified in these membranes (16-19). Calmodulin stimulates kinase activity in sarcoplasmic reticulum membranes (1, 2, 5, 17, 18, 20, 21), but stimulation of the ATPase activity was never observed. It has been suggested that calmodulin modulates the Ca^{2+} release rather than the Ca^{2+} uptake by skeletal sarcoplasmic reticulum (1, 13, 17, 21).

Compound 48/80, which was described as a powerful and selective calmodulin antagonist (22, 23), has been recently utilized to investigate the role of calmodulin in the sarcoplasmic reticulum activity (5, 9, 13). However, some controversial results have been reported.

Tuana and MacLennan (5) observed that compound 48/80 inhibits the ATP-dependent Ca^{2+} uptake but not the Ca^{2+} -ATPase of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. They suggested that compound 48/80 reduces the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} accumulation by enhancing the Ca^{2+} release without affecting the Ca^{2+} uptake mechanism. In contrast, the results of Hasselbach and Migala (8) and those of Alves and de Meis (9) indicate that compound 48/80 inhibits the Ca^{2+} pump by acting directly on the Ca^{2+} -ATPase.

In this work, we observed that compound 48/80 inhibits the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase, but the inhibitory effect depends on several factors such as temperature, oxalate and Ca^{2+} concentration. On the other hand, under certain conditions (absence of oxalate), Ca^{2+} uptake may be partially inhibited by the drug without significant effect on the ATPase. It appears that two targets exist for the action of 48/80 on the Ca^{2+} accumulation by sarcoplasmic reticulum.

MATERIALS AND METHODS

Materials

All reagents were analytical grade. Compound 48/80 was obtained from Sigma Chemical Company, St. Louis, M.O., U.S.A. ^{45}Ca CaCl_2 was purchased from Amersham, England.

Isolation of sarcoplasmic reticulum

Sarcoplasmic reticulum was isolated from rabbit white skeletal muscle as previously described (24).

The protein was determined by the biuret method using bovine serum albumin as standard (25).

Measurement of the $(\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+})$ - ATPase activity of sarcoplasmic reticulum

The ATPase activity was assayed by following continuously the liberation of H^+ associated with the ATP hydrolysis (26-28). Sarcoplasmic reticulum membranes (1mg) were incubated at several temperatures in a medium containing 5 mM Tris-HCl, 40 mM KCl, 5 mM MgCl_2 , 5 mM potassium oxalate (if present), 100 μM CaCl_2 and several concentrations of compound 48/80 (if present) in a total volume of 2 ml at the pH of 7.0. The reaction was started by adding 1 mM Mg-ATP previously adjusted at pH 7.0. At this pH, the hydrolysis of 1 mol ATP corresponds to the liberation of 0.75 mol of H^+ .

In some experiments, various amounts of Ca^{2+} were added to the medium and 1 mM EGTA was used as a Ca^{2+} buffer to obtain various pCa values in the reaction mixture.

The ATPase activity is expressed by the values obtained for the initial velocities of ATP hydrolysis. Thus, the ATPase measurements are not masked by changes in intravesicular and extravesicular Ca^{2+} concentrations which occur in the latest stages of the Ca^{2+} uptake reaction by native sarcoplasmic reticulum vesicles.

Measurement of active Ca^{2+} -uptake by sarcoplasmic reticulum vesicles

Ca^{2+} uptake by sarcoplasmic reticulum was measured by the isotopic method (29). The reticulum vesicles (1 mg) were incubated at 25°C or 37°C in a medium containing 5 mM Tris-HCl, 40 mM KCl, 5 mM MgCl_2 , 5 mM potassium-oxalate (if present), 100 μM [^{45}Ca] CaCl_2 (10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$), 1 mM ATP and several concentrations of compound 48/80 (if present) in a total volume of 2 ml at the pH 7.0. At 15 seconds after addition of ATP, 0.1 mg of protein were removed from the medium by filtering through glass microfiber filters (Whatman GF/B) pre-washed with 4 ml of 0.32 M sucrose buffered with 20 mM Tris-HCl, pH 7.2. After filtration of the samples in a vacuum pump apparatus, the filters were washed again with 4ml of the same solution. Blanks without protein were treated the same way as the samples.

The dried filters were placed in vials containing 6ml of scintillation fluid whose composition per L. of toluene is: 7.3g 2,5-diphenyloxazole (PPO), 176 mg p-bis-(2-(5-phenyloxazolyl)) benzene (POPOP) and 250 ml Triton X-100. Finally, the radioactivity was counted in a Packard TriCarb liquid scintillation spectrophotometer, model 460-CD. The quenching of radioactivity in the samples was corrected by using the external standard technique described in the manufacturer's instructions.

RESULTS

Effect of compound 48/80 on the ($\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}$) ATPase activity of sarcoplasmic reticulum membranes

Compound 48/80, a condensation product of N-methyl-p-methoxy-phenethylamine with formaldehyde, was utilized in studies of the Ca^{2+} transport activity by sarcoplasmic reticulum.

Fig. 1 shows that the ATPase activity decreases as the concentration of compound 48/80 increases in the medium up to about 160 $\mu\text{g}/\text{ml}$. At 25°C, the value for the ATPase activity (~ 625 nmol ATP hydrolyzed. mg^{-1} protein. min^{-1}) is little affected by several concentrations of compound 48/80 whether the oxalate anion does not exist in the reaction medium (Fig. 1A), but it is significantly reduced when the precipitating agent is present in the medium (Fig. 1B). Under these conditions, the ATPase activity is maximally inhibited by the drug (>80 $\mu\text{g}/\text{ml}$) from about 570 to 200 nmol ATP hydrolyzed per mg of protein per minute. In contrast, at 37°C, which is the optimal temperature for the ATPase activity, there is a significant inhibition of the enzyme by compound 48/80 either in the absence (Fig. 1A) or in the presence of oxalate (Fig. 1B).

By comparing the extent of the ATPase inhibition by the drug at different temperatures, we can observe that, in the absence of oxalate, negligible ATPase inhibition occurs at 25°C, whereas at 37°C, the inhibitory effect is stronger and it increases to about 50% at the highest drug concentrations utilized (Fig. 1A, insert). On the other hand, when oxalate is present in the medium, strong inhibition (up to 70%) is observed either at 25°C or at 37°C (Fig. 1B, insert). It appears that high temperatures (-37°C) facilitate the reactivity of compound 48/80 with the ATPase, but maximal inhibition by the drug is determined by the presence of oxalate.

Following the thermotropic behaviour of the $(\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+})$ -ATPase between 8°C and 37°C (Fig. 2), we observed that compound 48/80 does not alter significantly the activation energy for the ATP hydrolysis neither at temperatures below ($E \sim 14.8$ Kcal/mol) nor above ($E \sim 7.9$ Kcal/mol) the temperature (19°C) at which a break in the Arrhenius plot occurs (Fig. 2B). However, at 37°C and in the absence of oxalate, it appears that compound 48/80 sharply declines the activity of the enzyme, whereas it is maximal in the absence of the drug (Fig. 2A). Similar results were obtained in the presence of oxalate, except that the inhibition is strong at all temperatures studied (results not shown).

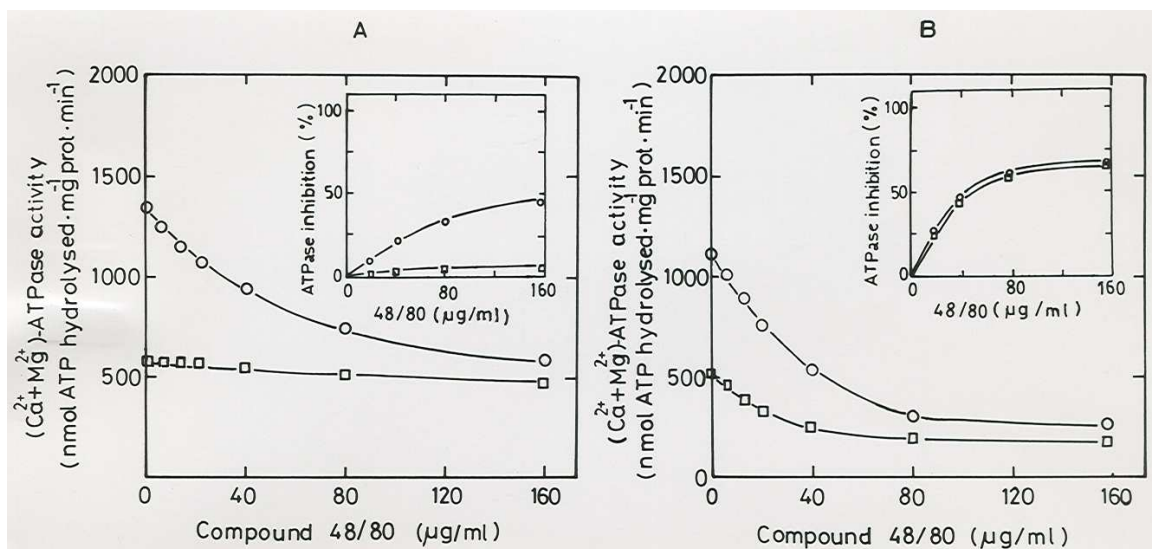


FIGURE 1

Effect of compound 48/80 on the $(\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+})$ -ATPase activity of sarcoplasmic reticulum membranes. Sarcoplasmic reticulum vesicles (1mg) were incubated at 25°C or at 37°C in a medium (2ml) containing 5 mM Tris - HCl, 40 mM KCl, 5 mM MgCl_2 , 5 mM potassium oxalate (if present), 100 μM CaCl_2 , 1 mM MgATP and several concentrations of compound 48/80 at the pH value of 7.0. The $(\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+})$ -ATPase activity was determined as described in Materials and Methods. A, ATPase activity in the absence of oxalate; B, ATPase activity in the presence of oxalate. (o), ATPase activity at 37°C; (\square), ATPase activity at 25°C. Insert, it is represented the percentage of ATPase inhibition by compound 48/80 at both temperatures, 25°C and 37°C. The results correspond to the mean values of three repetitive experiments.

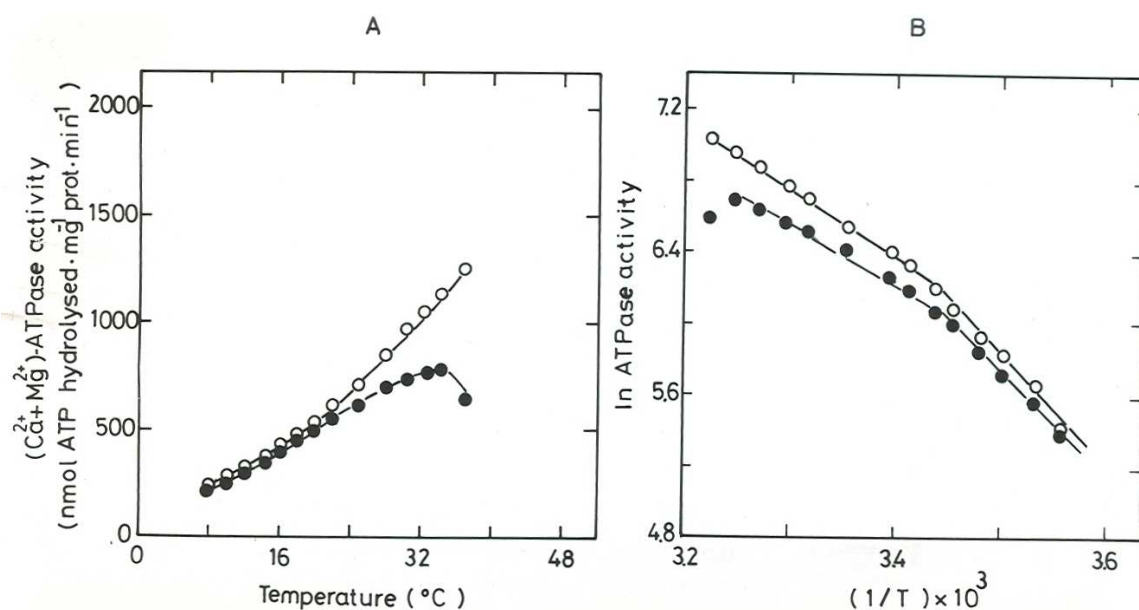


FIGURE 2

Thermotropic behaviour of the sarcoplasmic reticulum ATPase in the presence and absence of compound 48/80. Sarcoplasmic reticulum vesicles were incubated at various temperatures in a medium as described in Fig. 1, except that it did not contain oxalate. A, temperature-dependent activity; B, Arrhenius analysis; (o), absence of compound 48/80; (·), presence of compound 48/80. The results correspond to a representative experiment from a group of three repetitive assays.

Besides the influence of temperature and oxalate on the inhibitory power of compound 48/80, we observed that the ATPase inhibition by the drug is also dependent on the Ca²⁺ concentration in the reaction medium (Fig. 3).

The inhibitory effect of compound 48/80 is very strong (~70%) at low Ca²⁺ concentrations and decreases as the Ca²⁺ concentration increases in the medium up to 10⁻³M. (Fig. 3A and Fig. 4). This effect of Ca²⁺ is essentially visualized in the absence of oxalate since, in its presence, the inhibitory effect of the drug is high (~75%) at all Ca²⁺ concentrations studied (Fig. 4).

The results indicate that Ca²⁺ protects the enzyme from the inhibitor. However, Lineweaver-Burk analysis, which was performed at the stimulatory Ca²⁺ concentrations, showed that the effect is not due to simple competition between Ca²⁺ and compound 48/80 for the ATPase binding sites (Fig. 3 B). Both K_{0.5} (Ca) and V_{max} values are altered by the drug. In the absence of oxalate, compound 48/80 (80 μg/ml) shifts the K_{0.5} (Ca) value from 0.6 μM to 1.6 μM and it reduces the V_{max} value from about 1660 to 800 nmol ATP hydrolyzed · mg⁻¹ protein · min⁻¹ (Fig. 3A and B).

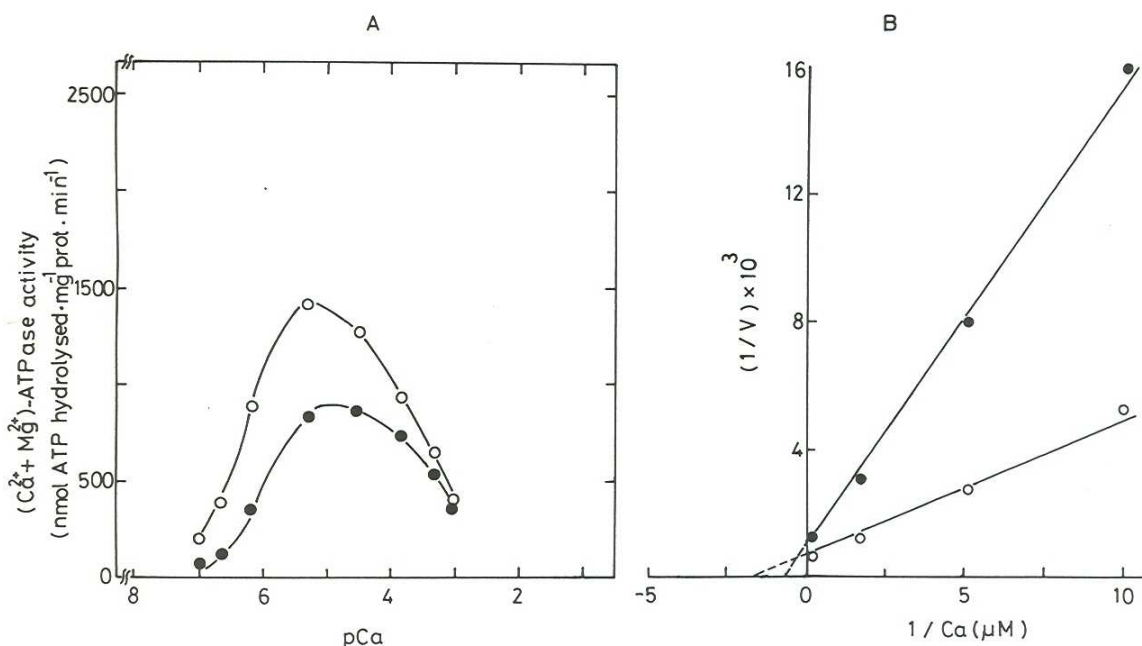


FIGURE 3

Ca^{2+} -dependence of compound 48/80 inhibition of the sarcoplasmic reticulum ($\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}$) - ATPase. Sarcoplasmic reticulum vesicles were incubated at 37° C in a medium as described in Fig. 1. The Ca^{2+} concentrations were adjusted by using 1 mM EGTA in a reaction medium without oxalate. A, Ca^{2+} -dependent ATPase activity; B, Lineweaver - Burk plot obtained at the Ca^{2+} concentrations which stimulate the ATPase (o), absence of compound 48/80; (.) presence of compound 48/80. The results are expressed as the mean values of four repetitive experiments.

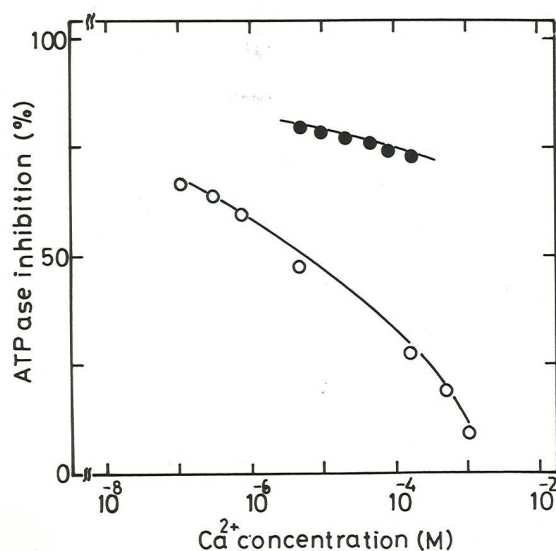


FIGURE 4

Influence of Ca^{2+} concentration on the inhibition of sarcoplasmic reticulum ATPase by compound 48/80. The membranes were incubated at 37°C with 80 µg/ml compound 48/80 and various concentrations of CaCl_2 in a medium as described in Fig. 1. (o), ($\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}$)-ATPase inhibition in the absence of oxalate; (o), ($\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}$)-ATPase inhibition in the presence of oxalate. The results represent the mean values of four repetitive experiments.

At pCa values of 3, the ATPase is significantly inhibited by the excess, of Ca^{2+} and no further inhibition by compound 48/80 occurs (Fig. 3A). It appears that a Ca^{2+} dependent conformation of the enzyme prevents interaction with the drug.

Effect of compound 48/80 on the Ca^{2+} uptake by sarcoplasmic reticulum membranes

Since the inhibitory effect of compound 48/80 on the Ca^{2+} -ATPase activity by sarcoplasmic reticulum depends on several factors, such as temperature, oxalate and Ca^{2+} concentration, we investigated whether these factors also alter the effect of compound 48/80 on the Ca^{2+} uptake by sarcoplasmic reticulum.

We observed that high temperatures ($\sim 37^\circ\text{C}$) and oxalate increase the inhibitory effect of compound 48/80 on the Ca^{2+} uptake by the reticulum vesicles (Fig. 5). The influence of temperature is particularly evident in the absence of oxalate (Fig. 5A). Under these conditions, we observed that at 25°C , Ca^{2+} uptake is similarly inhibited ($\sim 22\%$) by several concentrations of compound 48/80, whereas at 37°C , the inhibitory effect of the drug enhances up to 55% as the concentration of 48/80 increases in the medium (Fig. 5A, insert). On the contrary, in the presence of oxalate (Fig. 5B), the Ca^{2+} taken up by the vesicles ($100\text{ nmol Ca}^{2+} \cdot \text{mg}^{-1}\text{ protein} \cdot 15\text{ sec}^{-1}$ at 25°C , or $200\text{ nmol Ca}^{2+} \cdot \text{mg}^{-1}\text{ protein} \cdot 15\text{ sec}^{-1}$ at 37°C) is significantly inhibited (up to 75%) by increasing concentrations of compound 48/80 either at 25°C or at 37°C , respectively (Fig. 5B, insert).

These experiments show that, at 25°C and in the absence of oxalate, a partial Ca^{2+} uptake inhibition occurs (Fig. 5A) without significant alteration of the ATPase activity (Fig. 1A). It appears that, under these conditions, another mechanism rather than the Ca^{2+} -pump mediates primarily the effect of 48/80 on the Ca^{2+} transport activity of sarcoplasmic reticulum. This mechanism is maximally sensitive to $20\ \mu\text{g} / \text{ml}$ 48/80, and, probably, represents the Ca^{2+} release channel which, as reported previously (30), is stimulated at these drug concentrations.

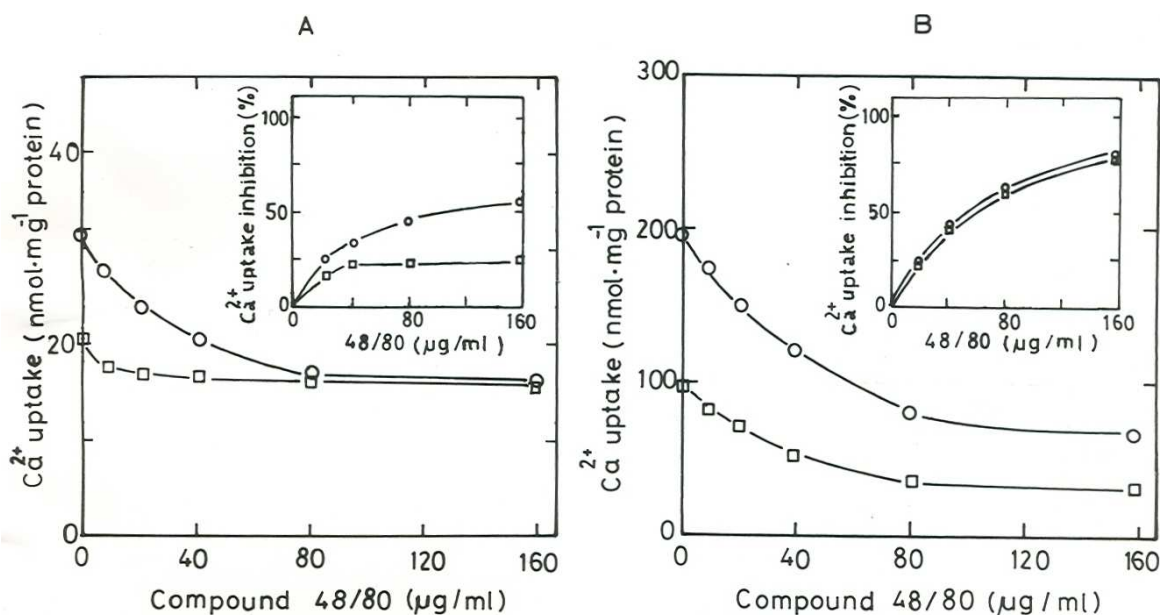


FIGURE 5

Effect of compound 48/80 on the Ca^{2+} uptake by sarcoplasmic reticulum membranes. The reticulum vesicles (1mg) were incubated at 25°C or 37°C in a medium (2 ml) containing 5 mM Tris - HCl, 40 mM KCl, 5 mM MgCl_2 , 5 mM potassium oxalate (if present), 100 μM [^{45}Ca] CaCl_2 (10 μCi / μmol), 1mM ATP and several concentrations of compound 48/80, at the pH value of 7.0. The Ca^{2+} uptake was determined at 15 sec. of reaction by filtering aliquots of 200 μl and by counting the filter radioactivity as described in Material and Methods. A, Ca^{2+} uptake in the absence of oxalate; B Ca^{2+} uptake in the presence of oxalate. (o), Ca^{2+} uptake at 37°C; (\square), Ca^{2+} uptake at 25°C. Insert, it is represented the percentage of Ca^{2+} uptake inhibition by compound 48/80 at both temperatures, 25°C and 37°C. The results represent the mean values of three repetitive experiments.

These results are in agreement with those depicted in Fig. 6 which shows the time course of Ca^{2+} accumulation measured in the presence and in the absence of compound 48/80, at both temperatures 25°C and 37°C.

At 25°C and in the absence of oxalate, about 30 nmol Ca^{2+} .mg⁻¹ protein are taken up by the reticulum vesicles and they are retained, in steady state, for periods of reaction above two minutes (Fig. 6A). In contrast, at 37°C, the Ca^{2+} , which is rapidly taken up by the vesicles, is gradually released along time, probably due to leakiness of the membrane at this temperature (Fig. 6A). In both cases, we observed that addition of 48/80 (80 $\mu\text{g/ml}$) to the reaction medium reduces Ca^{2+} accumulation, although the same profile of Ca^{2+} uptake is maintained at several time intervals (Fig. 6A). At 25°C, there is about 22% inhibition, whereas at 37°C, 48/80 reduces Ca^{2+} uptake by about 45%. These observations indicate that, at 25°C and in the absence of oxalate, a small fraction (~22%) of the Ca^{2+} taken up by the vesicles is released by 48/80. This

effect is probably due to the action of the drug on the Ca^{2+} release channel (30), since the Ca^{2+} - ATPase is not altered (Fig. 1). On the other hand, at 37°C , the higher inhibition of Ca^{2+} uptake by 48/80 is explained by a superimposed effect on the Ca^{2+} pump.

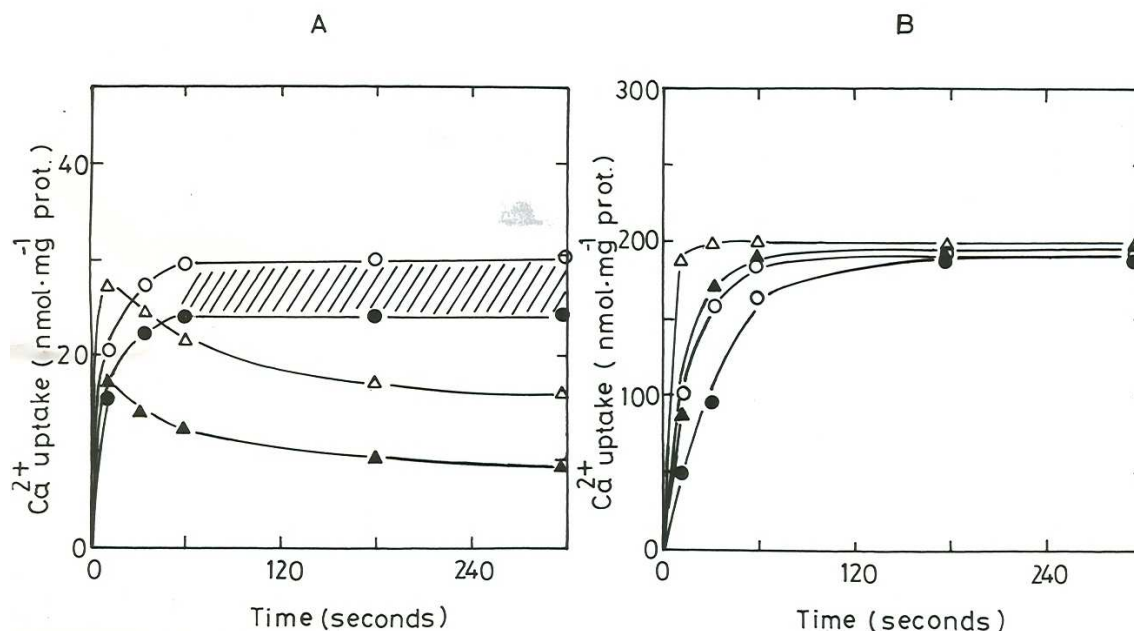


FIGURE 6

Time course of Ca^{2+} accumulation by sarcoplasmic reticulum at 25°C and 37°C , in the presence and absence of compound 48/80. Sarcoplasmic reticulum vesicles were incubated at 25°C or at 37°C , in the absence or in the presence of compound 48/80 as described in Fig. 5. Aliquots of 0.1 mg of protein were removed from the medium by filtration at several time intervals. A. Ca^{2+} accumulation in the absence of oxalate. B. Ca^{2+} accumulation in the presence of oxalate. (o), Ca^{2+} uptake at 25°C in the absence of 48/80; (.), Ca^{2+} uptake at 25°C in the presence of 48/80 (80 $\mu\text{g}/\text{ml}$); (Δ), Ca^{2+} uptake at 37°C in the absence of 48/80; (\blacktriangle), Ca^{2+} uptake at 37°C in the presence of 48/80 (80 $\mu\text{g}/\text{ml}$). The cross-hatched space represents 48/80 - induced Ca^{2+} release, probably through the Ca^{2+} channel. The larger space between the curves obtained at 37°C represents 48/80-reduction of Ca^{2+} uptake due to inhibition of the Ca^{2+} pump and, probably, stimulation of the Ca^{2+} release channel. The results correspond to a representative experiment from a group of three repetitive assays.

In the presence of oxalate, the rate of Ca^{2+} uptake is reduced by 48/80 at both temperatures (Fig. 6B). However, maximal amounts of Ca^{2+} accumulated (200 nmol. mg^{-1} protein) are maintained either at 25°C or at 37°C . It appears that, under these conditions, 48/80 - induced Ca^{2+} release is not visualized due to Ca^{2+} oxalate precipitation inside the vesicles.

DISCUSSION

The effect of compound 48/80 on the active Ca^{2+} transport by skeletal sarcoplasmic reticulum has been studied by several investigators (5, 8, 9, 13). Tuana and MacLennan (5) suggested that compound 48/80 inhibits the Ca^{2+} uptake by acting on the Ca^{2+} release channel, whereas other investigators (8, 9) suggested that the drug acts directly on the ATPase.

In this work, we found that compound 48/80 inhibits both the Ca^{2+} -dependent ATP hydrolysis and the active Ca^{2+} uptake by sarcoplasmic reticulum. However, the inhibitory effect of the drug depends on several factors such as temperature, oxalate and Ca^{2+} concentration.

In the absence of oxalate, the Ca^{2+} -ATPase inhibition by compound 48/80 is significantly increased at high temperatures ($\sim 37^\circ\text{C}$) and at low Ca^{2+} concentrations ($< 10^{-5}$ M). Compound 48/80 decreases the affinity of the enzyme for Ca^{2+} and reduces the V_{max} of the reaction. It appears that the Ca^{2+} ion protects the enzyme against compound 48/80. However, the Ca^{2+} pump inhibition is not due to simple competition between Ca^{2+} and the drug for the ATPase binding sites. Indeed, in the stimulating Ca^{2+} concentration range ($\text{pCa} > 5$), we observed that over a 100 fold difference in the concentration of free Ca^{2+} , less than a 2 fold difference in the degree of inhibition of the ATPase occurs. This effect is consistent with results previously obtained with another calmodulin antagonist, calmidazolium (6). Nevertheless, we detected a shift of the ATPase affinity for Ca^{2+} similar to that observed by Chiesi and Carafoli (2) using trifluoperazine as a calmodulin antagonist. It was suggested that trifluoperazine decreases the Ca^{2+} affinity of the ATPase by blocking the enzyme regulation through the 53 000 Mr protein (2), which appears to have no effect on the Ca^{2+} transport kinetic (10), but it has been observed to be colocalized with the Ca^{2+} ATPase (31) and to influence the coupling ratio between the Ca^{2+} transport and the ATP hydrolysis by sarcoplasmic reticulum membranes (11). Like trifluoperazine, compound 48/80 appears to shift the $(\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+})$ -ATPase from a high [$K_{0.5}(\text{Ca}) = 0.6 \mu\text{M}$] to a low [$K_{0.5}(\text{Ca}) = 1.6 \mu\text{M}$] affinity form for Ca^{2+} . It appears that the drug-induced alteration in the $K_{0.5}(\text{Ca})$ of the ATPase reflects loss of its modulation, rather than competition of compound 48/80 for the high affinity Ca^{2+} binding sites. On the other hand, the protector effect of high Ca^{2+} concentration indicates that Ca^{2+} -dependent conformations of the ATPase are involved in the inhibitory mechanism of the drug.

It is not apparent whether calmodulin mediates the drug effects observed, but it is interesting to notice that different calmodulin antagonists have similar Ca^{2+} -dependent effects on the sarcoplasmic reticulum ATPase (2, 6). It is not ruled out that some nonspecific inhibition of the

ATPase may be induced by calmodulin antagonists due to their partitioning in the lipid phase of the membrane (3, 6). However, the inhibitory effect appears to be specifically determined by the concentration of free Ca^{2+} . Furthermore, the potentiator effect of oxalate for the ATPase inhibition by compound 48/80 also reflects the Ca^{2+} action, as it was previously suggested (9). According to Alves and de Meis (9), compound 48/80 does not interact with the pump system when the ATPase is in the 2 Ca E* configuration. Thus, when oxalate is present, the ratio E/2 Ca E increases, and the ATPase is strongly inhibited by compound 48/80 (9). It is not evident why Tuana and MacLennan did not observe ATPase inhibition by 48/80 in the presence of oxalate. Probably, it was due to a masking effect caused by a 48/80-induced delay in the ATPase declining which is associated to the external Ca^{2+} suppression during the reaction of Ca^{2+} uptake (8). This effect did not influence our results since, in contrast to those investigators, we continuously measured the ATPase activity and we considered the values of initial velocities for the ATP hydrolysis.

On the other hand, we observed that temperature also influences the inhibition of the sarcoplasmic Ca^{2+} pump by compound 48/80. At temperatures below 25°C, and in the absence of oxalate, the ATPase is slightly affected by compound 48/80, whereas at high temperatures (~37°C), the ATPase is significantly inhibited by the drug. The activation energy for the ATP hydrolysis is not significantly altered by compound 48/80 up to 37°C. However, at this temperature, the activity of the enzyme sharply declines, whereas it is maximal in the absence of the drug. It appears that a temperature - induced conformational change of the enzyme (32) facilitates the accessibility of the drug to its effector site.

We also observed that compound 48/80 inhibits the Ca^{2+} accumulation by the reticulum vesicles. At 25°C and in the absence of oxalate, about 22% inhibition is observed, in spite of no significant alteration of the ATPase occurring (Fig. 1). It appears that, at 25°C, 48/80 inhibits Ca^{2+} accumulation by inducing Ca^{2+} release without significant effect on the ATPase. Probably, this release is mediated by the Ca^{2+} channel, since it is sensitive to low concentrations of 48/80 (20 µg/ml), as we observed before (30).

At 37°C, inhibition of Ca^{2+} uptake is higher than that observed at 25°C since both the Ca^{2+} pump and the Ca^{2+} channel are affected by the drug (Fig. 1, Fig. 5 and Fig. 6).

When oxalate is present in the medium, it induces precipitation of Ca-oxalate inside the vesicles and prevents the Ca^{2+} release, so that only the effect of 48/80 on the pump is visualized. Under these conditions, a better correlation is observed between the effect of 48/80 on the ATPase

activity and on the Ca^{2+} uptake by sarcoplasmic reticulum, in agreement with the observations of Alves and de Meis (9).

The results reported here indicate that compound 48/80 inhibits the Ca^{2+} -ATPase activity of sarcoplasmic reticulum, but, under certain conditions, (absence of oxalate) the Ca^{2+} uptake may be primarily reduced by the drug without significant effect on the ATPase. It appears that both the Ca^{2+} pump and the Ca^{2+} release channel may be target systems for the action of 48/80 on the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} accumulation.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants from the National Institute for Scientific Research of the Portuguese Ministry of Education and from the Calouste Gulbenkian Foundation.

REFERENCES

1. Campbell KP, MacLennan OH - A calmodulin-dependent protein kinase system from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. Phosphorylation of a 60,000-dalton protein. *J Biol Chem* 257:1238-1246, 1982.
2. Chiesi M, Carafoli E - The regulation of Ca^{2+} transport by fast skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 257:984-991, 1982.
3. Ho MM, Scales OJ, Inesi G - The effect of trifluoperazine on the sarcoplasmic reticulum membrane. *Biochim Biophys Acta* 730: 64-70, 1983.
4. Volpe P, Costello B, Chu A, Fleischer S - The effect of phenothiazines on Ca^{2+} fluxes in skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *Arch. Biochem Biophys* 233:174-179, 1984
5. Tuana BS, MacLennan OH - Calmidazolium and compound 48/80 inhibit calmodulin-dependent protein phosphorylation and ATP-dependent Ca^{2+} uptake but not Ca^{2+} -ATPase activity in skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 259:6979-6983, 1984.
6. Anderson KW, Coll RJ, Murphy AJ - Inhibition of skeletal sarcoplasmic reticulum Ca-ATPase activity by calmidazolium. *J Biol Chem* 259:11487-11490, 1984.
7. Vale MGP - Effects of phenothiazine drugs on the active Ca^{2+} transport by sarcoplasmic reticulum. *Biochem Pharmacol* 34: 4245-4249, 1985.
8. Hasselbach W, Migala A - Inhibition of calmodulin-dependent phosphorylation simultaneously inhibit calcium uptake and calcium-dependent ATPase activity in skeletal muscle sarcoplasmic reticulum and transiently induce calcium release. *Z. Naturforsch* 39 c:1189-1191, 1984.

9. Alves EW, de Meis L - Effect of compound 48/80 and ruthenium red on the Ca^{2+} ATPase of sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 261:16854-16859, 1986.
10. Leberer E, Charuk JHM, Clarke DM, Green NM, Zubrzyoka-Graarn E, MacLennan DH - Molecular cloning and expression of cDNA encoding the 53,000-dalton glycoprotein of rabbit skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 264:3484-3493, 1989.
11. Leonards KS, Kutchal H - Coupling of Ca^{2+} transport to ATP hydrolysis by the Ca^{2+} -ATPase of sarcoplasmic reticulum: potential role of the 53-kilodalton glycoprotein. *Biochemistry* 24:4876-4884, 1985.
12. Campbell KP, MacLennan DH, Jorgensen AO - Staining of the Ca^{2+} -binding proteins, calsequestrin, calmodulin, troponin c, and S-100, with cationic carbocyanine dye "stains-all". *J Biol Chem* 258:11267-11273, 1983.
13. Meissner G - Evidence of a role for calmodulin in the regulation of calcium release from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *Biochemistry* 25:244-251, 1986.
14. Vale MGP - Regulation of intracellular Ca^{2+} concentration: its function on the calmodulina and calpain regulatory systems. *Ciênc Biol (Coimbra)* 11:149-157, 1986.
15. Campbell KP - Protein components and their roles in sarcoplasmic reticulum function. In: *Sarcoplasmic Reticulum in Muscle Physiology* Entman M.L. and Van Winkle W.R., (eds.) CRC Press Inc., Boca Raton, FL, Vol. 1 pp. 65-99, 1986.
16. Seiler S, Wegener AD, Whang DD, Hathaway DR, Jones LR - High molecular weight proteins in cardiac and skeletal muscle junctional sarcoplasmic reticulum vesicles bind calmodulin, are phosphorylated, and are degraded by Ca^{2+} -activated protease. *J Biol Chem* 259:8550-8557, 1984.
17. Sato H, Fukunaga K, Araki S, Ohtsuki I, Miyamoto E - Identification of the multifunctional calmodulin-dependent protein kinase in the cytosol, sarcoplasmic reticulum and sarcolemma of rabbit skeletal muscle. *Arch Biochem Biophys* 260:443-451, 1988.
18. Tuana BS, MacLennan DH - Isolation of the calmodulin-dependent protein kinase system from rabbit skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *FEBS Lett* 235:219-223, 1988.
19. Vale MGP - Affinity labeling of calmodulin-binding proteins in skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 263:12872-12877, 1988.
20. Chiesi M, Carafoli E - Role of calmodulin in skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *Biochemistry* 22:985-993, 1983.
21. Kim DH, Ikemoto N - Involvement of 60-kilodalton phosphoprotein in the regulation of calcium release from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 261:11674-11679, 1986.
22. Gietzen K, Engelmann PA, Wuthrich A, Konstantinova A, Bader H - Compound 48/80 is a selective and powerful inhibitor of calmodulin-regulated functions. *Biochim Biophys Acta* 736:109-118, 1983.

23. Gietzen K - Comparison of the calmodulin antagonists compound 48/80 and calmidazolium. *Biochem J* 216: 611-616, 1983.
24. Vale MGP, Carvalho AP - Utilization of X-537A to distinguish between intravesicular and membrane-bound calcium ions in sarcoplasmic reticulum. *Biochim Biophys Acta* 413:202-212, 1975.
25. Layne E - Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins. In: *Methods in Enzymology*, Colowick SP, and Kaplan NO, (eds), Academic Press, New York, Vol.3 pp.447-454, 1957.
26. Martonosi A, Feretos R - Sarcoplasmic reticulum. II Correlation between adenosine triphosphatase activity and Ca^{2+} uptake. *J. Biol. Chem.* 239:659-668, 1964.
27. Deamer DW - Isolation and characterization of a lysolecithin-adenosine triphosphatase complex from lobster muscle microsomes. *J Biol Chem* 248:5477-5485, 1973.
28. Madeira VMC, Antunes-Madeira MC, Carvalho AP - Activation energies of the ATPase activity of sarcoplasmic reticulum. *Biochim Biophys Res Commun* 58,897-904, 1974.
29. Martonosi A, Feretos R - Sarcoplasmic reticulum. I. The uptake of Ca^{2+} by sarcoplasmic reticulum fragments. *J Biol Chem* 239:648-658, 1964.
30. Vale MGP - Effects of compound 48/80 on the Ca^{2+} release by reversal of the Ca^{2+} pump and by the Ca^{2+} channel of sarcoplasmic reticulum membranes. *Arch Biochem Biophys* 279:275-280, 1990.
31. Leberer E, Timms BG, Campbell KP, MacLennan DH - Purification, calcium binding properties and ultrastructural localization of the 53,000-160,000 (sarcalumenin)- dalton glycoproteins of the sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 265:10118-10124, 1990.
32. Inesi G, Millman M, Eletr S - Temperature -induced transitions of function and structure in sarcoplasmic reticulum membranes. *J Mol. Biol.* 81:483-504, 1973.

SESSÕES INTERNAS DO INSTITUTO

MÉTODOS DE EXTRACÇÃO E SEPARAÇÃO DE LÍPIDOS DA MEMBRANA – ACÇÃO DOS DETERGENTES¹

*Yolanda Pinto*²

As membranas eritrocitárias obtidas por hemólise hipotónica são passíveis de serem solubilizadas por solventes apolares ou por detergentes. Os fosfolípidos da membrana resultantes da extracção são separados nas diferentes classes de cromatografia de camada fina (TLC).

1. BREVE INTRODUÇÃO À MEMBRANA ERITROCITÁRIA

A membrana eritrocitária representa material de estudo privilegiado: é fácil de obter a partir de grandes quantidades de eritrócitos não contaminados por outros tipos celulares. Contém proteínas (52%), lípidos (40%) e glícidos (8%). Os constituintes lipídicos são fosfolípidos, glicolípidos e lípidos neutros.

1.1. Fosfolípidos – Representam a maior parte dos lípidos da membrana e são o suporte da estrutura em dupla camada. Compreendem principalmente os fosfoglicerolípidos.

Uma molécula de fosfoglicerolípido contém: um resíduo de glicerol, dois de ácidos gordos, um de ácido fosfórico e um radical X (Fig. 1). A variedade resulta da diversidade do radical X (etanolamina, serina, colina ou inositol), assim como do comprimento e grau de saturação das cadeias carbonadas dos ácidos gordos. Juntamente com os fosfoglicerolípidos, existe outro tipo de fosfolípidos de estrutura complexa: a esfingomiéline.

¹ Apresentação em sessão científica interna em 27/Abril/1987

² Assistente estagiária do Instituto de Bioquímica, FML

Palavras-chave: detergentes, eritrócito, lípidos, membrana

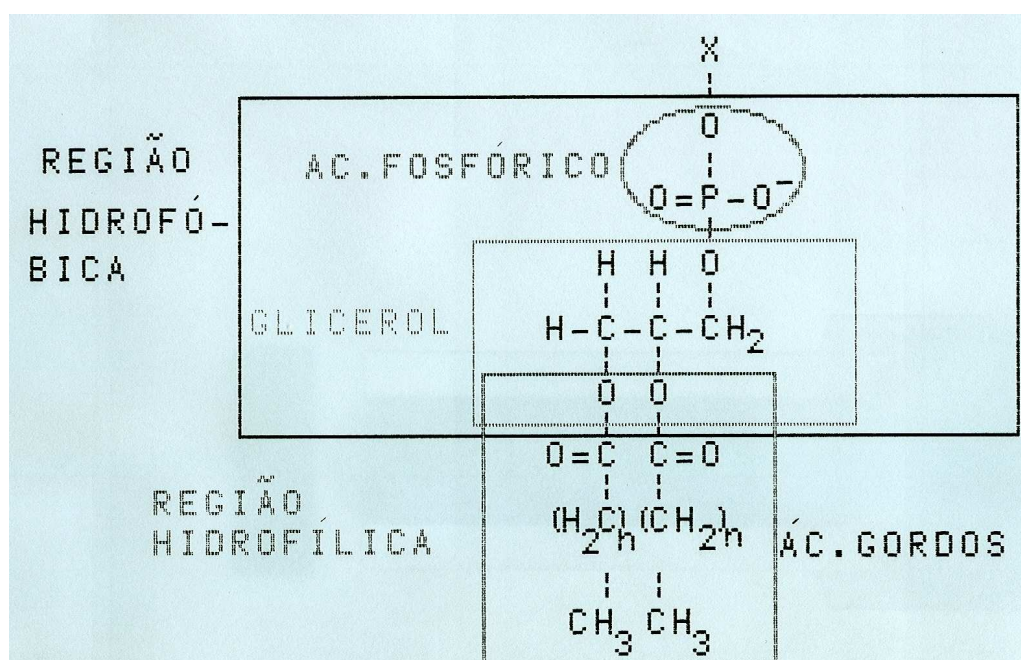


FIGURA 1

Representação esquemática de um fosfoglicerolípido

- 1.2. Glicolípidos – Menos abundantes que os anteriores, compreendem essencialmente os glicoesfingolípidos (contêm uma parte glicídica, um resíduo de ácido gordo e esfingosina).
- 1.3. Lípidos neutros – Incluem o colesterol e os seus ésteres, os triglicéridos e os ácidos gordos (separados no mesmo sistema cromatográfico).

O colesterol presente em concentração elevada (20% dos lípidos) na membrana eritrocitária humana, situa-se exclusivamente nas regiões hidrofóbicas da membrana.

2. TÉCNICA DE PREPARAÇÃO E SEPARAÇÃO DOS LÍPIDOS DAS MEMBRANAS ERITROCITÁRIAS UTILIZADAS

Os eritrócitos uma vez lavados, são hemolisados por choque hipotónico. Em seguida, as membranas são separadas por centrifugação e lavadas várias vezes, para eliminar os contaminantes citoplásmicos. Um dos métodos utilizados é o de Dodge.

- 2.1. Extração de lípidos – Dada a variedade de forças intermoleculares envolvidas na disposição estrutural dos constituintes da membrana, é utilizada solventes não polares (éter etílico, benzeno, clorofórmio) na remoção de lípidos associados hidrofobicamente, e

solventes polares (metanol, etanol) para quebrar as ligações de hidrogénio ou forças electrostáticas entre os lípidos e as proteínas da membrana.

- 2.2. Descrição do método de Folch e Col. (1957) – Os lípidos são extraídos por homogeneização das membranas eritrocitárias com clorofórmio: metanol (2:1). Filtra-se o homogeneizado. O filtrado, que contém lípidos associados com substâncias não lipídicas, ficará livre destas substâncias por contacto com pelo menos cinco vezes aquele volume de água (implica cerca de 1% de perda lipídica). A separação de fases é feita por repouso ou por centrifugação. A fase superior contém todas as substâncias não-lipídicas: e a inferior contém essencialmente os lípidos. Para garantir a ausência de lípidos na fase superior adiciona-se CaCl_2 ou MgCl_2 0,003N, ou KCL ou NaCl 0,05N.

Para armazenar lípidos por períodos de várias semanas, o resíduo deverá ser diluído em clorofórmio: metanol (2:1) e guardado entre 0°C e -15°C; se forem armazenados por períodos longos deve adicionar-se um antioxidante (tocoferol ou hidroxitolueno butilado 0,05%) e guardá-los a temperaturas de -40°C ou inferiores.

- 2.3. Separação cromatográfica – Vários métodos têm sido desenvolvidas para separação e análise de lípidos. Estes incluem fraccionamento por solventes, cromatografia em coluna, cromatografia em camada fina normal (TLC) ou de alta resolução (HPTLC), e cromatografia líquida de alta pressão (HPLC). A técnica mais frequentemente usada é a TLC em sílica gel. Esta é relativamente rápida, extremamente versátil e separa completamente diferentes classes de lípidos, podendo fazer-se doseamentos qualitativos e semi-quantitativos. A reprodutibilidade de um desenvolvimento cromatográfico em TLC ou HPTLC depende da realização de um grande número de passos preliminares (Quadro I). Nenhum sistema único de solventes separa todas as classes de lípidos. Uma grande variedade de solventes tem sido utilizada para separar determinadas classes (Quadros II e III).

QUADRO I

Condições para desenvolvimento cromatográfico

A reprodutibilidade de um desenvolvimento cromatográfico em TLC ou HPTLC depende de:

- Escolha do solvente
 - Preparação de placas de espessura constante
 - Secagem e activação das placas
 - Aplicação das amostras
 - Grau de saturação das tinas cromatográficas
 - Método de detecção escolhido
-

As diferenças entre HPTLC e TLC (Quadro IV) são principalmente em relação à tina e ao tempo de migração: a tina é horizontal e permite a migração simultânea do solvente nos dois lados da placa, permitindo deste modo o dobro das aplicações em relação à TLC.

Para separar lípidos por HPLC (Quadro V) deve usar-se a cromatografia de fase reversa. Esta baseia-se em princípios opostos aos da fase normal. A fase estacionária é sílica ligada quimicamente a compostos alquilsililo, originando uma superfície hidrofóbica não polar. A retenção do soluto é principalmente devida a interações hidrofóbicas entre solutos e a superfície estacionária hidrocarbonada. Geralmente usam-se como fases móveis polares água com metanol, acetonitrilo e/ou outros solventes orgânicos miscíveis com água. Os solutos são eluídos por ordem decrescente de polaridade (aumento de hidrofobicidade) e, por aumento do comportamento polar (aquoso) da fase móvel, aumenta a retenção dos solutos. As colunas de fase reversa são estáveis a pH 2-7 e temperaturas elevadas.

Apesar de os sistemas aperfeiçoados para resolução cromatográfica continuarem a ser desenvolvidos, não existe nenhum método simples capaz de separar completamente todas as misturas lipídicas, incluindo os isómeros geométricos, posicionais e estereoquímicos em cada espécie molecular. É necessário utilizar combinações apropriadas de técnicas analíticas para conseguir separação e quantificação de um máximo de componentes.

QUADRO II

Solventes utilizados em TLC para separação de fosfolípidos (Higgins JA)

A) TLC unidimensional

- clorofórmio:metanol:água (65:35:5 ou 65:25:4 v/v)
- clorofórmio:metanol:ácido acético:água (25:15:4:2 ou 100:55:16:6 ou 50:25:7:3 ou 60:50:1:4 v/v)
- clorofórmio:propanol:ácido propiónico:água (4:6:2:1 v/v)

B) TLC bidimensional

- clorofórmio:metanol:amónia (65:35:5 v/v)
 - clorofórmio:acetona:metanol:ácido acético:água (50:20:10:10:5 v/v)
 - clorofórmio:metanol:hidróxido de amónio 7N (65:30:4 v/v)
 - clorofórmio:metanol:ácido acético:água (170:25:25:6 v/v)
 - clorofórmio:metanol:água (65:15:2 v/v)
 - clorofórmio:metanol:acetona:ácido acético:água (65:10:20:10:3 v/v)
 - 1-butanol:ácido acético:água (60:20:20 v/v)
 - clorofórmio:metanol:acetona:ácido acético:água (5:1:2:1:0.5 v/v)
-

2.4. Acções dos detergentes – Geralmente usam-se detergentes ou sais biliares para solubilizar várias preparações de membranas biológicas. Os detergentes parecem ligar-se às membranas, excepto em concentrações muito baixas; tal ligação afecta as propriedades da membrana de vários modos, muito deles até agora desconhecidos. Estas variações podem envolver alterações subtis na permeabilidade ou, para concentrações elevadas de detergente, efeitos drásticos, tais como lise das membranas e fusão.

O dodecilsulfato de sódio extrai proteínas e lípidos separadamente: enquanto o desoxicolato de sódio solubiliza as proteínas e os fosfolípidos em paralelo, o colesterol é solubilizado quando 60% das proteínas e dos fosfolípidos forem extraídos.

QUADRO III

Solventes utilizados em TLC para separação de lípidos neutros

- heptano:éter:metanol:ácido acético (90:20:2:3 v/v)
- hexano:éter dietílico:ácido acético: (60:10:1 ou 80:20:1 ou 70:30:1 ou 75:23:2 v/v)
- éter do petróleo:éter etílico:ácidoacético (85:15:1 v/v)

QUADRO IV

Comparação entre TLC e HPTLC

	TLC	HPTLC
Dimensões da placa	20x20 cm 10x20 cm	10x10 cm 10x20 cm
Adsorvente	sílica-gel	sílica-gel
Espessura da placa	0,25 mm	0,12 mm
Volume de aplicação	1-10 µl	≈ 0,1-0,2 µl
Diâmetro das manchas	≈ 3-6 µl	≈ 1-1,5 µl
Diâmetro das manchas separadas	≈ 6-15 µl	≈ 2-5 µl
Migração	10-15 cm	3-6 cm
Tempo de migração	≈ 30-200 min	≈ 3-20 min
Aplicações/placa	≈ 10	≈ 18 ou 36
Nº de amostras numa placa numa análise dupla se usar 3 padrões	2	6 ou 15

QUADRO V

Comparação entre HPLC e cromatografia líquida convencional (CL)

	HPLC	CL
Enchimento	Coluna pequena e fechada; partículas pequenas	Coluna grande e aberta; partículas grandes
Aplicação da amostra	Injecção/válvula	Topo da coluna
Fluxo de efluente	Pressão controlada	Acção da gravidade (bomba peristáltica)
Detecção	Contínua	Descontínua
Duração	Minutos/horas	Horas/dias
Resolução	Superior	Inferior
Automatização	Elevada	Reduzida
Custo da aparelhagem	Elevado	Reduzido
Conclusão – HPLC – vários cromatogramas/dia: melhor resolução e muito sensível		

O Triton X-100 começa por solubilizar a maior parte das proteínas e lípidos em paralelo, mas as proteínas são libertadas mais rapidamente enquanto a esfingomiéline fica de preferência retida no “pellet”. Para concentrações elevadas de Triton, a solubilização da proteína cessa e os lípidos residuais são completamente solubilizados. Embora estes detergentes solubilizem as proteínas duas vezes mais rapidamente do que os fosfolípidos, esta solubilização nunca é completa. Do mesmo modo, os fosfolípidos são solubilizados mais rapidamente do que o colesterol. Para elevadas concentrações de detergente, os fosfolípidos e o colesterol são rapidamente solubilizados até cerca de 95%-100%.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bouhours JF, Bouhours D – J Lipid Res 1984; 25:613.
- Christie WW, Hunter ML – J Chromatogr 1985; 325:473.
- Delaunay J, Fischer S – Nouv Presse Méd 1977; 6:1041.
- Delaunay J, Fischer S – Nouv Presse Méd 1977; 6:1129.
- Dodge JT, Mitchell C, Hanahan DJ – Arch Biochem Biophys 1983; 100:119.
- Folch J, Lees M, Stanley GHS – J Biol Chem 1957; 226:497.
- Heape AM, Juguelin H, Boiron F, Cassagne C – J Chromatogr 1985; 322:391.
- Helenius A, Simons K – Biochim Biophys Acta 1975;415:29.
- Higgins JA – In: “Biological Membranes. A Pratical Approach”. JBC Findlay, WH Evans (eds), JRL Press, Oxford, Washington DC, 1987.
- Kirkpatrick FH, Gordesky SE, Marinetti GV – Biochim Acta 1974; 345:154.
- Sotirhos N, Thörngren C, Herslöf B – J Chromatogr 1985; 331:313.

METODOLOGIA E RESULTADOS OBTIDOS COM TÉCNICAS DE DOSEAMENTO DO PLASMINOGÉNIO, ALFA₂-ANTIPLASMINA E ANTITROMBINA III¹

*Luís Cardoso*²

A coagulação sanguínea e a fibrinólise são fenómenos em equilíbrio instável, dependentes da intervenção em cascata, de múltiplos factores proteicos. São descritos métodos e resultados de três dessas glicoproteínas.

IDENTIFICAÇÃO ESTRUTURAL E FUNCIONAL

O plasminogénio, alfa₂-antiplasmina e antitrombina III são três glicoproteínas com acção nos fenómenos hemostáticos.

O plasminogénio (PG) consiste numa pró-enzima da cascata fibrinolítica que, após activação por clivagem da ligação ARG560-VAL561, se transforma na plasmina (protease serínica) cuja função é degradar a fibrina. Esta acção surge quando estão cumpridas as funções hemostáticas do rolhão de fibrina, logo que o balanço entre a coagulação e a fibrinólise favorecem a preponderância deste último sistema.

Entre os activadores do PG contam-se o activador tecidual (t-PA), a estreptocinase, a urocinase e a calicreína. O PG tem peso molecular de cerca de 90 000 dalton, encontrando-se no plasma na concentração de cerca de 20mg/dl.

A elevada capacidade proteolítica de plasmina, bem como a sua afinidade para outros substratos que não a fibrina, justificam a existência no plasma de inibidores proteásicos encarregues de frenar a sua actividade sempre que esta é inadequada. O mais importante inibidor proteásico da

¹ Apresentação em sessão científica interna de 4/Maio/1987

² Assistente estagiário do Instituto de Bioquímica, FML

Palavras-chave: alfa-antiplasmina, antitrombina III, coagulação, fibrinólise, plasminogénio

plasmina é a alfa₂-antiplasmina (alfa₂-AP). A sua afinidade para a plasmina aumenta quando esta apresenta os centros de fixação da lisina livres. Estes centros estão envolvidos na interacção plasmina-fibrina.

A alfa₂-AP apresenta peso molecular de cerca de 70 000 e concentração plasmática de cerca de 6mg/dl.

A antitrombina III (ATIII) é o principal inibidor da coagulação sanguínea. É um inibidor das proteases serínicas, cuja principal função é inibir a actividade proteolítica da trombina, responsável pela conversão do fibrinogénio em fibrina. A velocidade desta reacção aumenta extraordinariamente na presença de heparina.

Além de inibir a trombina, a ATIII exerce também actividade inibidora sobre os factores IX, I XI e XII activados, e calicreína. O seu peso molecular é de 58000 e a concentração plasmática de cerca de 29mg/dl.

A presença de quantidades adequadas e normalmente funcionais destas proteínas assume particular importância nos fenómenos hemostáticos. Alterações qualitativas e quantitativas, congénitas ou adquiridas, têm sido detectadas nalgumas situações patológicas.

METODOLOGIA DO DOSEAMENTO

Para o seu doseamento dispõe-se actualmente de três métodos: a imunodifusão radial (IDR) simples, a coagulometria e o método cromogénico. A Alfa₂-AP é apenas doseável pelo método cromogénico.

Na IDR simples é utilizada uma placa com gel contendo anticorpos específicos para a proteína que se pretende dosear, e orifícios destinados à aplicação da amostra. O valor obtido será proporcional ao diâmetro do halo de precipitação que resulta da reacção antigénio-anticorpo.

Trata-se de um método quantitativo e de fácil execução, tendo como principais desvantagens o tempo que decorre entre a aplicação da amostra e a obtenção dos resultados (cerca de 48 horas), e a impossibilidade de detectar moléculas anormais ou não funcionais que mantenham a mesma estrutura antigénica.

A coagulometria baseia-se no prolongamento do tempo de formação de um coágulo de fibrina, em função da quantidade de plasminogénio ou antitrombina III presentes na amostra.

Para a determinação do PG por este método é necessário incubar uma diluição da amostra com fibrinogénio e estreptocinase durante um tempo pré-determinado. Ao juntar-se trombina inicia-se a contagem até à formação do coágulo (Quadro I).

A determinação da ATIII requer a incubação de amostra diluída com uma mistura de quantidades “estandardizadas” de trombina e heparina. A contagem de tempo até à formação do coágulo de fibrina inicia-se após a adição de fibrinogénio.

QUADRO I

Método coagulométrico para doseamento do plasminogénio e antitrombina III.

Principais etapas:

PLASMINOGÉNIO		ANTITROMBINA III
Fibrinogénio +		Trombina +
Estreptocinase		Heparina

Amostra diluída		Amostra diluída

INCUBAÇÃO		

Trombina		Fibrinogénio

Início imediato da contagem de tempo até à formação do coágulo		

Para que a execução do método coagulométrico, o sangue deverá ser anticoagulado com citrato de sódio na proporção de 1/10.

A principal limitação deste método consiste na falta de “estandardização” devido à grande variabilidade de métodos existentes para a detecção do coágulo.

O doseamento pelo método cromogénico baseia-se na transformação de um substrato cromogénico em p-nitroanilina, sendo a absorvência deste composto lida por espectrofotometria a 405nm. O substrato cromogénico difere consoante a sua conversão em p-nitroanilina ocorra pela actividade proteásica da plasmina ou da trombina.

Para o doseamento do PG procede-se à incubação da amostra com estreptocinase durante 10 minutos a 37°C (ou a qualquer outra temperatura escolhida para o ensaio). A estreptocinase (em excesso) liga-se ao PG, transformando-o num activador do PG, com a consequente passagem de todas as moléculas de PG a plasmina.

Ao adicionar-se o substrato cromogénico é iniciada a sua conversão em p-nitroanilina, sendo a reacção interrompida com ácido acético após dois minutos (Quadro II). A percentagem de plasminogénio da amostra é assim proporcional ao valor da sua absorvância.

QUADRO II

Sequência de fases do doseamento do plasminogénio pelo método cromogénico

AMOSTRA	BRANCO
Plasma + Estreptocinase	Plasma + Soro fisiológico
----- INCUBAR 3 MINUTOS A 37° C -----	
SUBSTRATO CROMOGÉNICO -----	
AGITAR E INICIAR CONTAGEM (2 MINUTOS) -----	
ÁCIDO ACÉTICO (20%) -----	
AGITAR IMEDIATAMENTE E LER ABSORVÊNCIAS A 405nm -----	

Para a determinação da alfa₂-AP, incuba-se plasmina quer com a amostra quer com igual quantidade de soro fisiológico durante um minuto. A alfa₂-AP presente na amostra vai inibir parte da plasmina, o que não acontece na incubação com soro fisiológico. É importante não exceder um minuto de incubação a fim de evitar que outros inibidores proteásicos mais lentos, presentes na amostra, inibam de forma significativa a actividade proteásica da plasmina, influenciando assim nos resultados.

Após a introdução do substrato cromogénico, que se deixa reagir durante dois minutos, a diferença de absorvância entre a plasmina incubada com soro fisiológico (denominada valor enzimático da plasmina) e a plasmina incubada com a amostra é função da alfa₂-AP presente (Quadro III).

QUADRO III

Sequência de fases no doseamento da alfa₂-antiplasmina pelo método cromogénico

VALOR ENZIMÁTICO PLASMINA	AMOSTRA	BRANCO
Soro fisiológico + Plasma	PLASMA + PLASMINA	Soro fisiológico + Plasma
----- INCUBAR 1 MINUTO A 37° C -----		
SUBSTRATO CROMOGÉNICO -----		
AGITAR E INICIAR CONTAGEM (2 MINUTOS) -----		
ÁCIDO ACÉTICO (20%) -----		
AGITAR IMEDIATAMENTE E LER ABSORVÂNCIAS A 405cm -----		

A determinação da ATOOO é semelhante à descrita anteriormente para a alfa₂-AP, apresentando contudo algumas diferenças. A amostra é incubada (diluída com trombina e heparina) durante 5 minutos. O substrato cromogénico difere do utilizado nos dois ensaios anteriores, em virtude da protease responsável pela sua conversão em n-nitroanilina ser a trombina (Quadro IV).

A diferença entre a absorvência do valor enzimático da trombina e da amostra (onde decorreu inibição pela ATIII) é função da percentagem deste inibidor presente.

O doseamento pelo método cromogénico requer anticoagulação do sangue com citrato de sódio na proporção de 1/10.

Precisão, fiabilidade e reprodutibilidade são as principais vantagens atribuídas a este método. Há que conceder, no entanto particular atenção ao controlo da temperatura e tempos de reacção, sem o que há o risco de introduzir factores de erro importantes. O recurso a pessoal treinado ou a utilização de material especialmente concebido permitem ultrapassar facilmente estes problemas.

Apesar de termos utilizado nos nossos ensaios no I. Bioquímica/FML apenas material comum de laboratório. Os resultados obtidos com este método apresentaram boa reprodutibilidade. Pensamos que a utilização do método cromogénico deve ser ponderada, sobretudo em relação à IDR (método de execução extremamente fácil e reprodutível) quando se pretende um ensaio funcional destas três proteínas. A coagulometria constitui também uma alternativa no ensaio funcional destas proteínas, apresentando no entanto as desvantagens já referidas atrás.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Verstraete M, Vermeylen J – Cellular, chemical and rheological factors in thrombosis and fibrinolysis. In: “Thrombosis”, Pergamon Press, London – New York, 1984, pp. 54.
- Reboud-Ravaux M – Les activateurs du plasminogène: aspects généraux et développements récents. *Biochimie* 1985; 67:1197-1216.
- Travis J, Salvesen GS – Human plasma proteinase inhibitors. *Ann Rev Biochem* 1983; 52:655-709.
- Bailey GS – Immunodiffusion in gels. In: “Methods in Molecular Biology”. Vol. 1. JM Walker (ed), Humana Press, Clifton, New Jersey, 1984; pp. 301-310.
- Kolde J-J – Chromo Time System – A New Generation of Coagulation Analyses. *Behring Inst Mitt* 1985; 78:176-187.

O 2,3-BISFOSFOGLICERATO¹

Maria Manuela Nunes²

A combinação do oxigénio à hemoglobina é afectada pelo principal fosfato orgânico eritrocitário, o 2,3-bisfosfoglicerato.

IMPORTÂNCIA DO 2,3-BISFOSFOGLICERATO ERITROCITÁRIO NO MECANISMO DE TRANSPORTE DE OXIGÉNIO

As actividades metabólicas teciduais exigem um adequado fornecimento de oxigénio, o qual é assegurado pelos eritrócitos que, para tal, necessitam de conter hemoglobina em quantidade e qualidade apropriadas.

A hemoglobina transporta O_2H^+ e CO_2 . A ligação destas moléculas é regulada por interacções alostéricas entre locais diferentes da molécula de hemoglobina.

PROPRIEDADES ALOSTÉRICAS DA MOLÉCULA DE HEMOGLOBINA

A hemoglobina apresenta três tipos de comportamento alostérico:

- (a) A ligação do oxigénio à molécula permite a ligação de mais oxigénio à mesma molécula; é o efeito homotrópico positivo.
- (b) A afinidade da hemoglobina para o oxigénio é alterada pelo pH do meio, estando deste modo relacionada com o número de equivalentes de H^+ que se dissociam por mole de hemoglobina, quando a forma desoxi é transformada na forma oxi ($xHHb + 4O_2 \rightleftharpoons Hb(O_2)_4 + xH^+$). Este efeito alostérico, resultante da concentração do ião H^+ no meio, é conhecido por efeito Bohr.

¹ Apresentação em sessão científica interna de 25/Maio/1987

² Assistente estagiário do Instituto de Bioquímica, FML

Palavras-chave: 2,3-difosfoglicerato, eritrocito, hemoglobina, transporte de oxigénio

(c) A hemoglobina apresenta ainda um efeito heterotrópico negativo de grande significado fisiológico, que envolve a sua ligação com o 2,3-bisfosfoglicerato (2,3-BPG). Outros polifosfatos orgânicos, como o ATP e o inositol pentafosfato, apresentam efeito semelhante.

O aspecto sigmóide da curva, que relaciona a saturação da hemoglobina pelo oxigénio (Fig. 1) em função da pressão deste gás (curva de equilíbrio ou de dissociação da oxi-hemoglobina), fundamenta-se na possibilidade de combinação de cada molécula de hemoglobina reduzida com nenhuma, uma ou até quatro moléculas de oxigénio.

Benesch and Benesch demonstraram que o 2,3-BPG se liga à hemoglobina e exerce um efeito muito acentuado na sua afinidade para o oxigénio.

Os glóbulos vermelhos representam um caso especial de elevada concentração celular em 2,3-BPG. Este composto fosforilado é um intermediário da glicólise eritrocitária, sintetizado na via de Rapoport-Luebering por acção da 2,3-bisfosfoglicerato-mutase.

O modelo de Monod de alosterismo explica as interacções heterotrópicas que envolvem a ligação de hemoglobina com o 2,3-BPG. Assim, em relação à hemoglobina na conformação T (desoxi), existe uma “cavidade” suficientemente grande entre as cadeias beta, que admite a ligação do 2,3-BPG. Esta cavidade é limitada por grupos carregados positivamente, que se ligam firmemente ao 2,3-BPG; esta molécula exhibe elevada densidade de cargas negativas

Como o 2,3-BPG se liga preferencialmente ao estado T, a hemoglobina desloca o equilíbrio R-T a favor do estado T (Fig. 1). Daqui resulta que a conformação da desoxi-hemoglobina tenha estabilidade superior à conformação da oxi-hemoglobina. Neste estado, para que a hemoglobina se ligue ao oxigénio é necessário que este esteja presente em elevada concentração. Em condições fisiológicas, a pressão de oxigénio intra-pulmonar é suficientemente elevada para saturar a hemoglobina quase por completo, mesmo quando na presença de elevados níveis de 2,3-BPG.

EFEITO DO 2,3-BPG NA OXIGENAÇÃO TECIDUAL

Nas situações em que aumentam as necessidades teciduais em oxigénio ou diminui a capacidade de transporte de oxigénio pelo sangue, são accionados mecanismos de compensação como, por exemplo, o aumento da função pulmonar, do débito cardíaco e, a longo prazo, da concentração

de hemoglobina. Porém, a adaptação mais precoce consiste na diminuição da afinidade da hemoglobina para o oxigénio, induzida por diversos factores.

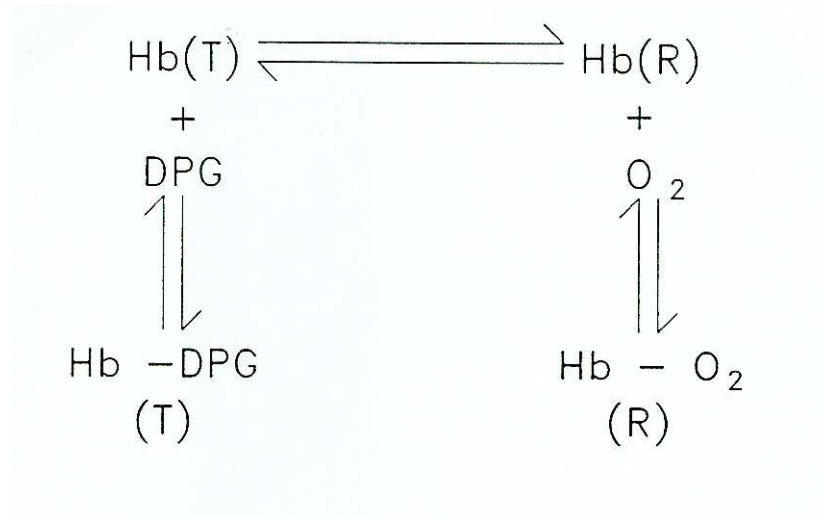


FIGURA 1

Representação esquemática do equilíbrio entre a molécula de 2,3-BPG e O₂, relativamente às conformações T e R da hemoglobina.

O aumento da concentração do 2,3-BPG eritrocitário em condições de hipóxia tecidual, é um dos factores que ocasiona a diminuição da afinidade da hemoglobina para o oxigénio.

Os níveis de 2,3-BPG são controlados por um mecanismo de retroacção pelo produto final e pela concentração de ião hidrogénio.

Em situações de hipóxia aumenta rapidamente a percentagem de desoxi-hemoglobina intraglobular. Em consequência da grande avidez da desoxi-hemoglobina para o 2,3-BPG, diminuem os níveis deste composto no estado livre e, portanto, a quantidade de produto capaz de inibir a sua própria síntese; daqui resulta um aumento da síntese de 2,3-BPG.

A diminuição da concentração hidrogeniónica estimula a síntese de 2,3-BPG e, inversamente, o aumento da concentração do ião H⁺ reduz a síntese daquele composto fosforilado. Porém, o ajustamento dos níveis de 2,3-BPG pelo pH é precedido pela acção exercida pelo pH (efeito Borh) na afinidade da hemoglobina para o oxigénio. Daqui resulta a diminuição da afinidade para o oxigénio em acidémia e o inverso em alcalémia.

A afinidade da hemoglobina para o oxigénio encontra-se diminuída em indivíduos que residem em elevada altitude e em situações patológicas associadas a hipóxia. Verifica-se, nestes casos, desvio para a direita da curva de dissociação do oxigénio (diminuição da afinidade), o que permite a manutenção de um fornecimento adequado de oxigénio aos tecidos. A concentração de 2,3-BPG nos glóbulos vermelhos destes indivíduos encontra-se aumentada, facto justificável como mecanismo de adaptação à hipóxia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Benesch R, Ruth E, Benesch RE – Intracellular organic phosphates as regulators of oxygen release by haemoglobin. *Nature* 1969; 221:618.
- Benesch RE, benesch R, Kwong S – Binding of diphosphoglycerate and ATP to oxyhemoglobin dimers. *J Mol Biol* 1986; 190:481.
- Benesch R, Benesch RE, Yu CI – Reciprocal binding of oxygen and diphosphoglycerate by human haemoglobin. *Biochemistry* 1968; 50:526.
- Eaton JW, Brewer GJ – The relationship between red cell 2,3-diphosphoglycerate and levels of haemoglobin in the human. *Biochemistry* 1968; 61:756.
- Rose ZB, Liebowitz J – 2,3-diphosphoglycerate phosphatase from human erythrocyte. *Biol Chem* 1970; 245:3232.
- Martins e Silva J – Factores intervenientes no controlo da microcirculação e da oxigenação tecidual. *O Médico* 1977; 82:1-27.
- Devlin TM – “Textbook of Biochemistry”, 2^a ed John Wiley & Sons. New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore, 1986.
- Charache S, Grisolia S – Effect of 2,3-diphosphoglycerate on oxygen affinity of blood in sickle cell anemia. *J Clin Inv* 1970; 49:806.
- Lenfant C, Torrance J, English E, Finch CA, Reynafarje C, Ramos J, Faure J – Effect of altitude on oxygen binding by haemoglobin and on organic phosphate levels. *J Clin Inv* 1968; 47:2652.
- Eaton JW, Brewere GJ, Grover RF – Role of red cell 2,3-diphosphoglycerate in the adaptation of man to altitude. *J Lab Clin Med* 1969; 73:603.

LIPOSOMAS: PRINCÍPIOS TEÓRICOS E METODOLOGIA¹

Yolanda Pinto²

A dispersão de fosfolípidos sintéticos em água ou solução aquosa induz à formação de vesículas uni- ou multilamelares, chamadas liposomas. À diversidade destas membranas sintéticas quanto ao número de camadas e/ou às dimensões resulta da variedade dos métodos de preparação associados aos diferentes tipos de classes de fosfolípidos, solventes e emulsionares, e da razão lípido/água. Os liposomas têm sido utilizados para encapsular enzimas, drogas antitumorais, antibióticos, em meios de administração terapêutica ou experimental.

1. DEFINIÇÃO

Os liposomas são vesículas artificiais de fosfolípidos que podem ser comparados a uma membrana biológica, visto que a camada exterior separa o interior de toda a estrutura do meio aquoso externo (Fig. 1).

Os liposomas classificam-se em MLV (vesículas multilamelares grandes), SUV (vesículas unilamelares pequenas) e LUV (vesículas unilamelares grandes) (Quadro I, Fig. 2).

As vesículas multilamelares consistem em camadas lipídicas concêntricas separadas por camadas aquosas enquanto as unilamelares apresentam uma única camada lipídica a rodear um interior aquoso.

¹ Apresentação em sessão científica interna em 8/Junho/1987

² Assistente estagiária do Instituto de Bioquímica, FML

Palavras-chave: liposomas, fosfolípidos, membrana, metodologia, transporte, vesículas

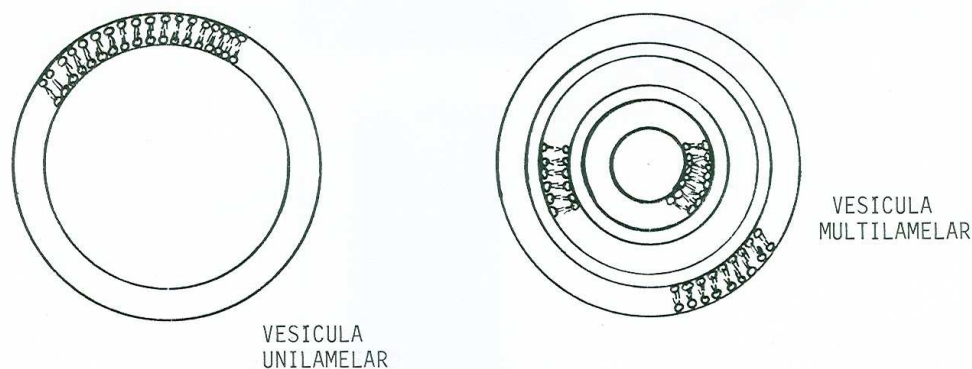


FIGURA 1

Representação esquemática bidimensional da estrutura de um liposoma (a) e da membrana celular (b). As áreas assinaladas (ABCD; EFGH) atravessam cada uma das estruturas a) e b) referenciadas (C. Proença, Martins e Silva, 1983).

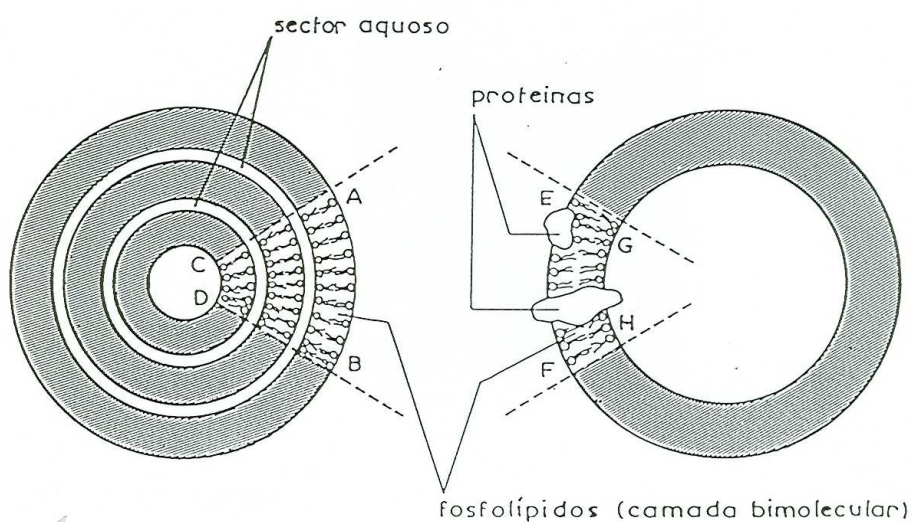


FIGURA 2

Representação esquemática de vesículas multilamelares e unilamelares (adaptado de Ostro, 1987).

QUADRO I

Classificação dos liposomas

Tipo	MLV	SUV	LUV
Tamanho (nm)	100-5000	20-50	60>1000
Volume de captura (µl/mg)	4,1	0,5	13,7
Eficiência de encapsulação (%)	5-15	0,5-1,0	35-65

2. TÉCNICAS DE PREPARAÇÃO

As diferentes técnicas de preparação de liposomas podem ser classificadas em dois grupos: as da formação de MLV e LUV e as de formação de SUV.

2.1. Preparação de MLV

Os lípidos são dissolvidos num solvente orgânico e secos num evaporador rotativo sob vácuo. O resíduo lipídico, sob a forma de película seca e fina, é disperso em água ou em solução aquosa. Substâncias solúveis em água são adicionadas à fase aquosa antes da mistura com os lípidos, enquanto as substâncias insolúveis em água deverão ser incorporadas no filme lipídico ou, mais propriamente, no solvente orgânico. O rendimento é heterogéneo e a capacidade de encapsulação para drogas é muito baixa. A geometria esférica não é caracterizável e os liposomas são muito grandes para determinadas aplicações. Se os fosfolípidos forem acídicos também se formam LUV além de MLV (Quadro II).

2.2. Preparação de SUV

Por ultra-sonicação de MLV pode obter-se SUV. Este método ainda é usado por ser rápido e fácil, mas apresenta várias desvantagens (Quadro III). Outros métodos têm sido desenvolvidos para obter SUV. Entre eles salienta-se o método de preparação “ethanol injection” que consiste em injectar uma solução etanólica de fosfolípidos em água ou em soluções aquosas. Este método tem a vantagem de quase todas as vesículas formadas serem SUV (Quadro II).

2.3. Preparação de LUV

Para transportar drogas a atenção centra-se neste tipo de liposomas, especialmente nos de diâmetro compreendido entre 50 e 200 nm. As técnicas mais importantes são: evaporação de fase reversa, ultrassonicação breve de MLV, infusão de éter, fusão induzida pelo cálcio (limitada a fosfolípidos acídicos) e remoção de detergentes das micelas lípido/detergente, por filtração gel ou por diálise (Quadro II). As desvantagens primárias destas técnicas são a formação de populações de vesículas mais ou menos heterogéneas, e a necessidade de técnicas de separação e fraccionamento complicadas; os solventes orgânicos não podem ser completamente removidos, e a ultrassonicação poderá conduzir a degradação de fosfolípidos e/ou de substâncias encapsuladas.

QUADRO II

Vantagens e desvantagens de técnicas de preparação de vesículas
(SUV e LUV; KH Schmidt, 1986)

Métodos	Vantagens	Desvantagens
Injecção de soluções etanólicas de fosfolípidos em água	- Quase todas as vesículas unilamelares (SUV)	- População heterogénea - Dispersão lipídica resultante muito diluída - Capacidade de encapsulação muito baixa
Remoção de colato ou outros detergentes por filtração gel	- População quase homogénea - Vesículas unilamelares (SUV)	- Retenção de detergente - Dispersão lipídica resultante diluída
Dispersão de fosfolípidos acídicos em água	- Grande capacidade de encapsulação	- Restrita a fosfolípidos acídicos - Tamanho das partículas dependente da força iónica e natureza do ião - População heterogénea - MLV além de LUV
Infusão de éter	- Grande capacidade de capsulação-conveniente para macromoléculas - Unilamelar (LUV)	- Baixa eficiência de encapsulação - População heterogénea - Exposição a elevadas temperaturas e a solventes orgânicos dos compostos encapsulados
Fusão induzida pelo cálcio	- Grande capacidade de encapsulação-conveniente para macromoléculas - Unilamelar (LUV)	- Restrita a fosfolípidos acídicos - População heterogénea - Tamanho das partículas sensíveis a condições ambientais
Evaporação de fase reversa	- Eficiência de encapsulação muito elevada - Unilamelar (LUV)	- Irradiação ultra sónica - Uso de solventes orgânicos - População heterogénea - Por vezes MLV além de LUV - Não reprodutível

QUADRO III

Desvantagens dos métodos de irradiação ultrasónica (KH Schmidt, 1986)

A) SONICAÇÃO PROLONGADA

- Mistura heterogénea de SUV e de alguns MLV
- Baixa capacidade de encapsulação
- Baixa eficiência de encapsulação
- Necessidade de atmosfera inerte (azoto)
- Arrefecimento é necessário para manter temperatura constante
- Possível degradação de fosfolípidos e compostos encapsulados devido a energia de sonicação não constante
- Grande perda de material lipídico
- Possível oxidação de fosfolípidos
- Exclusão de moléculas com $M_r > 40000$
- Não reprodutível à escala semi-industrial

B) SONICAÇÃO RÁPIDA

- Mistura muito mais heterogénea de MLV, LUV e SUV
 - Todas as desvantagens de A)
-

Um método ideal de preparação de liposomas deverá ser simples, padronizado, reprodutível, de baixo custo, e o rendimento deverá ser homogéneo e estável durante um dado período de tempo. A reprodutibilidade é muito difícil de conseguir e o tamanho dos liposomas não pode ser controlado, logo a escolha da técnica de preparação de liposomas é frequentemente um compromisso. Presentemente, o único método que satisfaz todos estes requisitos é a técnica de remoção de detergente por diálise. O lípido é dissolvido e seco sob vácuo: este resíduo é solubilizado por um detergente adequado formando uma mistura micelar lípido/detergente. A remoção contínua de detergente conduz espontaneamente à formação de liposomas (Quadro IV).

QUADRO IV

Vantagens e desvantagens da remoção de detergente por diálise controlada (KH Schidt, 1986)

VANTAGENS:

- Preparação de LUV ou SUV homogêneos de tamanho definido
- Excelente reprodutibilidade
- Tamanho das vesículas pode variar entre 20 e 100 nm ou mais, dependendo do detergente
- Distribuição de tamanho extremamente limitada
- Completa remoção de alguns detergentes por diálise
- Uso de diferentes compostos lipídicos na mistura, com carga ou não, sintéticos ou naturais, saturados ou insaturados
- Sem efeitos de diluição durante a preparação
- Rendimento lipídico elevado (obtenção superior a 95%)
- Grande variabilidade de parâmetros instrumentais e experimentais
- Possível produção a escala industrial
- Apenas liposomas unilamelares
- Preparação de liposomas fácil evitando degradação ou desnaturação de compostos lábeis

DESVANTAGENS

- Incorporação de colesterol limitada
 - Alguns detergentes não são completamente removidos durante a diálise
 - Pouca escolha nos detergentes
 - Não utilizável se houver incompatibilidade com os compostos encapsulados
 - Capacidade média de encapsulação
 - Em alguns casos pouca eficiência de encapsulação
-

Assim, de acordo com a escolha do método de preparação, fosfolípidos (Quadro V), solventes, emulsionantes, razão lípido/emulsionante e componentes adicionais de membrana usados (tais como, alfa-tocoferol, colesterol ou proteínas) pode preparar-se uma grande variedade de liposomas.

QUADRO V

Peso molecular (PM) e temperatura de transição (Tt) de fosfolípidos que podem ser usados na preparação de liposomas (KH Schmidt, 1986).

	NOME	PM	Tt (°C)
CH	Colesterol	387	—
CL	Cardiolipina	1456	—
DCP	Dicetilfosfato	547	—
DLPC	Dihexadecil-lectina	706	—
DLPC	Dilauril-lectina	622	—
DMPC	Dimiristoil-lectina	678	+ 23
DNB-BA	3,5 Dinitrobenzoilbutilamida	279	—
DNB-PE	3,5 Dinitrobenzoilfosfatidiletanolamina	914	—
DPPA	Dipalmitoil-ácido fosfatidico	650	67
DPPC	Dipalmitoil-lectina	734	+ 41
DPPE	Dipalmitoilfosfatidiletanolamina	744	60
G	Gangliosido	—	—
LPC	Lisolecitina	—	—
NANA	Ácido N-acetil-neurâmico	309	—
OA	Ácido oleico	283	—
PA	Ácido fosfatidico	700	52
PC	Lectina (fosfatidilcolina)	762	-15-7
PE	Fosfatidiletanolamina	720	48
PG	Fosfatidilglicerol	790	23
PI	Fosfatidilinositol	850	—
PL	Fosfolípido	—	—
PS	Fosfatidilserina	760	+ 5
SPH	Esfingomielina	814	+ 32
SPL	Fosfolípidos de soja	—	—
TL	Tri-inoleina	879	—

3. PROPRIEDADES E CARACTERIZAÇÃO

A geometria do liposoma depende da concentração e composição relativa dos dois componentes principais (lípidos e água), além da temperatura de formação. O tamanho dos liposomas (Quadro VI) influencia a estabilidade, a incorporação de drogas e o comportamento “in vivo”.

Para determinar o grau de homogeneidade de população de liposomas utiliza-se cromatografia em gel “Sepharose” 4B; colunas de “Sephadex” separam os liposomas do material encapsulado; cromatografia em “Sephacel-DEAE” conduz à separação dos liposomas neutros dos de carga negativa.

Desvios de ^1H , ^{13}C e ^{31}P em NMR dão informação sobre a orientação dos ácidos gordos, densidade de empacotamento e distribuição dos lípidos nas camadas interna e externa. A microscopia electrónica também é usada para caracterizar liposomas, dando informação sobre o tamanho, distribuição e volume.

Quanto à sua estabilidade, nenhuma regra pode ser estabelecida, dado que esta depende de vários factores tais como: tipo de lípido, propriedades da droga, tamanho laminar, homogeneidade, conteúdo electrolítico do meio usado, pH, tipo de técnica de preparação de liposomas e aplicação desejada. A estabilidade pode ser aumentada por incorporação de vários açúcares e colesterol (acima de 30%) na estrutura lipídica.

QUADRO VI

Factores que influenciam o tamanho dos liposomas

- a) – Mistura lipídica utilizada,
 - b) – Velocidade de diálise (tipo e espessura)
 - c) – Tipo de detergente
 - d) – Razão molar lípido/detergente
 - e) – Concentração de lípido
 - f) – Tipo de composto encapsulado
 - g) – pH
 - h) – Temperatura
-

4. INTERACÇÃO LIPOSOMAS - CÉLULAS

“In vitro” e, talvez, “in vivo”, os liposomas interactivam com as células de quatro modos: adsorção, endocitose, fusão e transferência lipídica (Fig. 3). O mecanismo de endocitose é restrito a células com acção fagocitária, como fagócitos mononucleares e granulócitos, e verifica-se também em alguns tipos de células tumorais, fibroblastos e células endoteliais. Os mecanismos de adsorção ou fusão ocorrem nos fibroblastos e linfocitos.

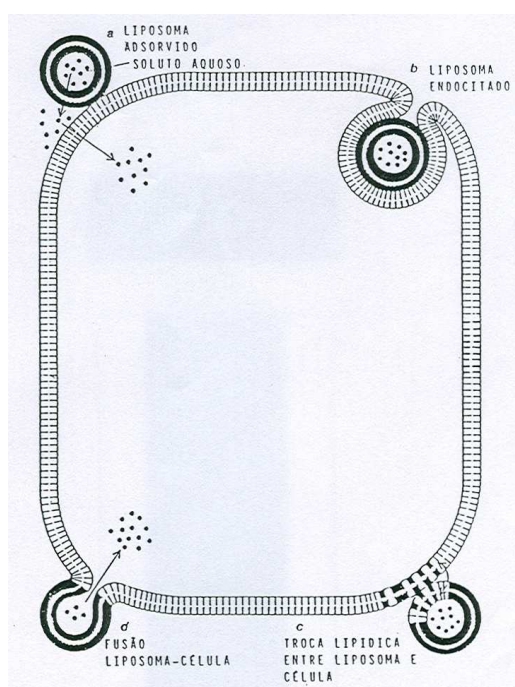


FIGURA 3

A interacção liposoma-célula pode ocorrer de vários modos. Um liposoma pode ser adsorvido por qualquer tipo de célula. Um liposoma adsorvido pode ser endocitado ou internalizado por algumas espécies de células, pode trocar lípidos com a membrana celular ou pode fundir-se com ela (adaptado de Ostro, 1987).

Quando os liposomas são administrados, são gradualmente removidos da corrente sanguínea e sequestrados nos tecidos. Os maiores são captados essencialmente pelos macrófagos do sistema retículo-endotelial, especialmente no fígado e no baço. Os SUV, embora também captados pelos macrófagos, distribuem-se difusamente pelas células parenquimatosas de alguns tecidos. Existem sectores corporais dificilmente acessíveis aos liposomas; estes não atravessam a barreira do cérebro nem os glomérulos renais, são excluídos do sistema nervoso central e penetram pouco o miocárdio e o músculo-esquelético, presumivelmente devido às características do endotélio capilar desses tecidos.

5. APLICAÇÕES E VANTAGENS

O campo de aplicação dos liposomas é extremamente vasto. Centenas de diferentes espécies de substâncias como enzimas, drogas antitumorais, iões, agentes quelantes, antibióticos, cromossomas, vírus, vacinas e muitas outras têm sido encapsuladas em liposomas.

Os liposomas podem ser metabolizados “in vivo” e geralmente não são tóxicos. O comportamento farmacológico e cinético das drogas encapsuladas em liposomas depende das características físicas do transportador (dimensão, carga e natureza) e das propriedades das drogas. Enquanto a droga estiver encapsulada não pode ser metabolizada; as drogas podem ser transportadas do local de administração até ao tecido alvo, sem que haja interacções da droga com o sangue ou outros tecidos que não sejam o alvo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Crommelin DJA – J Pharmac Sci 73:1559, 1984.
- Gregoriadis G – New Engl J Med 295; 704, 1976.
- Gregoriadis G – New Engl J Med 295; 765, 1976.
- Hopkins SJ – Drugs of Today 17:43, 1981.
- Juliano RL – Trends in Pharmacol Sc 2:39, 1981.
- Maierhofer G – International Lab July/August:26, 1985.
- Nicolau C, Paraf A – La Recherche 12:748, 1981.
- Ostro MJ – Sc Amer 256:91, 1987.
- Proença MC, Martins e Silva J – Acta Méd Port 4:1, 1983.
- Schmidt KH – “Liposomes as Drug Carriers”, Georg Thieme, Verlag Stuttgart (ed), New York, 1986

DIABETES E ENVELHECIMENTO¹

Mário Carreira²

Com o envelhecimento das células tornam-se menos eficazes em reparar os seus constituintes. Os tecidos têm a elasticidade diminuída, os vasos sanguíneos ficam mais rígidos, assim como os ligamentos e tendões; o coração e os pulmões tornam-se menos expansíveis.

Os idosos tendem a desenvolver mais facilmente aterosclerose, cataratas e cancro. Os diabéticos partilham algumas destas características com os idosos, nomeadamente a tendência para a aterosclerose e para a formação de cataratas.

No envelhecimento e na diabetes há diminuição da solubilidade do colagénio, com aumento simultâneo das ligações cruzadas entre as fibrilhas. Paralelamente, nos tecidos ricos em colagénio dos idosos e diabéticos, encontram-se quantidades aumentadas de pigmentos fluorescentes de cor amarelo-acastanhada, resultantes da reacção não-enzimática da “browning”, e que são constituídos pelos produtos avançados da glicosilação das proteínas.

No processo de glicosilação não-enzimática das proteínas, também denominado de reacção de “browning”, ou de Maillard, um grupo aldeído (CHO) da glicose liga-se a um grupo amino (NH₂) de uma proteína originando uma base de Schiff. Esta ligação é instável e rearranja-se rapidamente, originando um produto de Amadori, mais estável mas ainda reversível. Se a proteína não é catabolisada, os produtos de Amadori são desidratados e rearranjam-se novamente, originando novas estruturas derivadas da glicose; estas combinam-se com vários anéis moleculares, produzindo estruturas irreversíveis denominadas produtos avançados da glicosilação (“AGE-Advanced Glycosylation End products”).

¹ Apresentação em sessão científica interna de 18/Janeiro/1988

² Investigador voluntário do Instituto de Bioquímica, FML

Palavras-chave: diabetes mellitus, envelhecimento, glicosilação não enzimática das proteínas, produtos avançados da glicosilação (AGE), reacção Maillard

Os AGE são susceptíveis de produzir ligações cruzadas (“cross-link”) entre as proteínas adjacentes, quer porque se ligam a grupos amino de outras proteínas, quer porque a sua ligação altera a conformação da cadeia proteica, expondo grupos sulfidrílicos susceptíveis de produzirem novas ligações. A glicosilação não-enzimática das proteínas de vida longa, como o colagénio, pode explicar a agregação das fibras desta proteína e o aumento de rigidez dos tecidos.

A possibilidade de os produtos de Maillard estarem envolvidos no processo de envelhecimento e na génese das complicações da diabetes tem sido corroborada por alguns dados experimentais.

O colagénio extraído da dura-mater de idosos são e de diabéticos (insulino-dependentes) não-idosos, apresenta níveis semelhantes de absorvência (350 nm) e de fluorescência relativa, que traduzem quantidades sobreponíveis de AGE.

As proteínas de cristalinos humanos com cataratas apresentam espectros de absorvência e de excitação semelhantes aos de cristalinos incubados com glicose-6-fosfato, enquanto cristalinos incubados sem glicose possuem espectros parecidos com os de cristalinos humanos são.

Os macrófagos possuem receptores para os AGE ligados às proteínas podendo contribuir para a remoção destes, mas com a idade tornam-se menos eficientes. Na diabetes o aumento rápido dos AGE provavelmente ultrapassará a capacidade de remoção dos macrófagos. Em ambas as situações o resultado é de acumulação dos AGE.

A presença de elevadas quantidades de AGE nas paredes arteriais poderá contribuir para a aterogénese. Os AGE são capazes de fixar LDL e conseqüentemente acumular lípidos nas paredes arteriais; simultaneamente, fixam o factor de von Willebrand responsável pela agregação plaquetária. As plaquetas e os macrófagos activados produzem factores de crescimento do tecido muscular liso, estimulando o crescimento da placa ateromatosa.

Os produtos de Maillard também poderão estar envolvidos no envelhecimento do ácido desoxiribonucleico (DNA) e no aumento da mutagenicidade. De facto, DNA viral incubado com glicose-6-fosfato passa da forma circular à forma linear, e tem a sua capacidade de tradução diminuída. Também plasmídeos que possuem o gene da resistência à tetraciclina deixam de o exprimir quando incubados com glicose; se reintroduzidos em bactérias estas mostram-se sensíveis a aquele bacteriostático.

Os processos de glicosilação não-enzimática das proteínas são comuns ao envelhecimento e à diabetes, podendo-se deste modo encarar a diabetes como um processo de envelhecimento acelerado.

A utilização de fármacos que impeçam a formação dos AGE poderá contribuir para a prevenção das complicações tardias da diabetes. Neste momento existe um fármaco experimental, a aminoguanidina, que “in vitro” e “in vivo” tem revelado capacidade para estabilizar os produtos de Amadori, impedindo a sua evolução para AGE.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Brownlee M, Vlassara H, Kooney A, Ulrich P, Cerami A – Science 1986; 232:1629-1632.
- Bucala R, Model P, Cerami A – Proc Natl Acad Sci USA 1984; 81:105-109.
- Cerami A, Vlassara H, Brownlee M – Sci Am May 1987; 82-83.
- Chiou S-H, Chylack LT, Tung WH, Bun F – J Biol Chem 1981; 256:5176-5180.
- Monnier VM, Cerami A – Science 1981; 211:491-493.
- Monnier VM, Kohn RR, Cerami A – Proc Natl Acad Sci USA 1984; 81:583-587.
- Vlassara H, Brownlee M, Cerami A – Proc Natl Acad Sci USA 1983; 82:5588-5592.

DISLIPIDÉMIAS E OBESIDADE¹

Leonor Queiroz²

Indivíduos com fenótipos de perfis lipoproteicos a que se atribui um risco aumentado para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (II-A, IV, hipo-HDL), são frequentemente obesos. Por outro lado, os obesos apresentam muitas vezes valores elevados de colesterol total, triglicéridos totais, VLDL, LDL, LDL-colesterol, relação VLDL/TG, tendo contudo baixos níveis de HDL.

A distribuição corporal de gordura também se repercute nestes perfis: quanto mais a adiposidade se desenvolve à custa do abdómen e porção superior do tronco, mais se elevam os triglicéridos plasmáticos.

Na obesidade humana parece haver um “continuum” de resistência à insulina de hiperinsulinismo periférico, estando a insulinémia positivamente correlacionada com a actividade da lipoproteína lipase do tecido adiposo (ATLPL). Esta enzima é sintetizada pelo adipócito indo posteriormente actuar no endotélio capilar do tecido adiposo, onde catalisa o primeiro passo da reacção triglicérido → diglicérido → monoglicérido → glicerol (Fig. 1), fornecendo ácidos gordos livres que entram no adipócito para re-esterificação. O aumento da actividade da ATLPL pode predispor ao armazenamento excessivo de triglicéridos nos adipócitos (causando obesidade relativa mesmo sem hiperfagia).

Tem-se constatado que menos de 5% dos indivíduos que perdem peso por qualquer técnica que não a cirúrgica, o conseguem manter reduzido por 3 a 5 anos, verificando-se uma impressionante tendência dos obesos para a recuperação do peso perdido. Desta tendência surgiu o conceito clínico de *ponderostato*.

¹ Apresentação em sessão científica interna de 25/Janeiro/1988

² Investigadora voluntária do Instituto de Bioquímica, FML

Palavras-chave: dislipidémias, lípidos, obesidade, tecido adiposo.

Após a estabilização da perda de peso, enquanto as restantes alterações metabólicas associadas à obesidade tendem a normalizar, a actividade da ATLPL aumenta ainda mais, para voltar aos níveis anteriores ao emagrecimento após a recuperação.

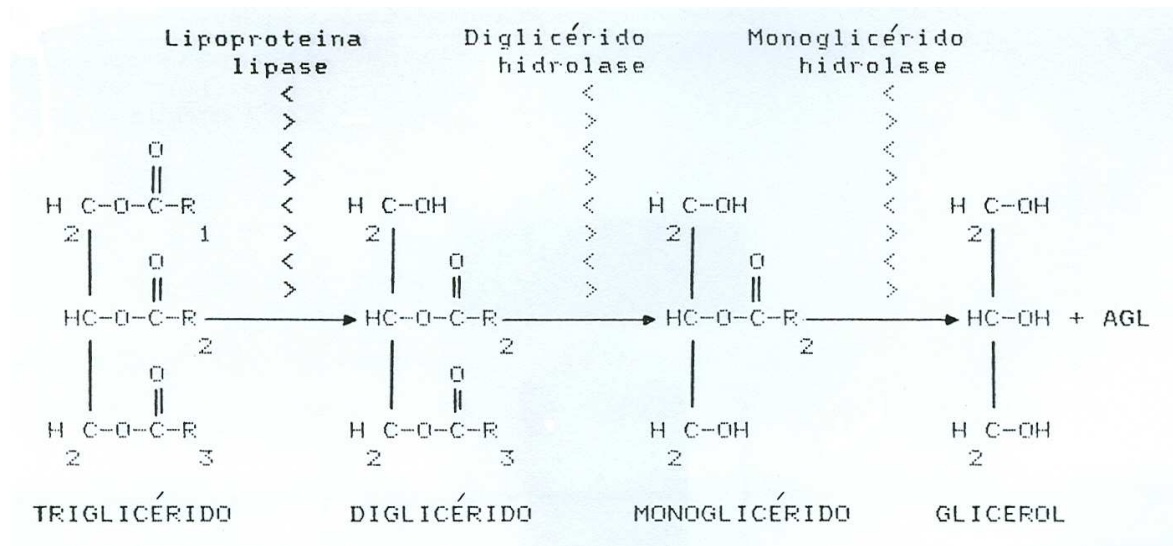


FIGURA 1

Etapas da degradação dos triacilglicéridos

Após a estabilização da perda de peso, enquanto as restantes alterações metabólicas associadas à obesidade tendem a normalizar, a actividade da ATLPL aumenta ainda mais, para voltar aos níveis anteriores ao emagrecimento após a recuperação do peso perdido. Postulou-se que esta variação de actividade enzimática seria um mecanismo de “feed-back” envolvido na fixação de ponderostato, um ponto de equilíbrio em torno do qual oscilaria a massa adiposa do indivíduo e/ou tamanho dos seus adipócitos.

A variação de actividade da ATLPL não indica que seja necessário aumentar o aporte para que se dê a recuperação do peso perdido, mas providencia um ambiente no qual o preenchimento lipídico dos adipócitos se processe rapidamente assim que se aumente ligeiramente a ingestão calórica.

Tendo a lipoproteína lipase um lugar importante no metabolismo das lipoproteínas (Fig. 2) e havendo correlação significativa entre os níveis de actividade da ATLPL e da LPL plasmática, seria de prever que o aumento da actividade da ATLPL correspondesse, nos obesos, ao aumento dos níveis de LDL e HDL com diminuição dos de VLDL e quilomicra, o que no entanto não tem

sido verificado nos estudos existentes. Pôs-se a hipótese de que sendo os obesos doentes, com produção exagerada de VLDL, poderem produzir VLDL que fossem maus substratos para a LPL, ou do seu excesso poder ultrapassar a capacidade catalítica da LPL (qualquer dos processos interfere com a transformação rápida de VLDL em LDL). Não existem contudo estudos conclusivos sobre o assunto.

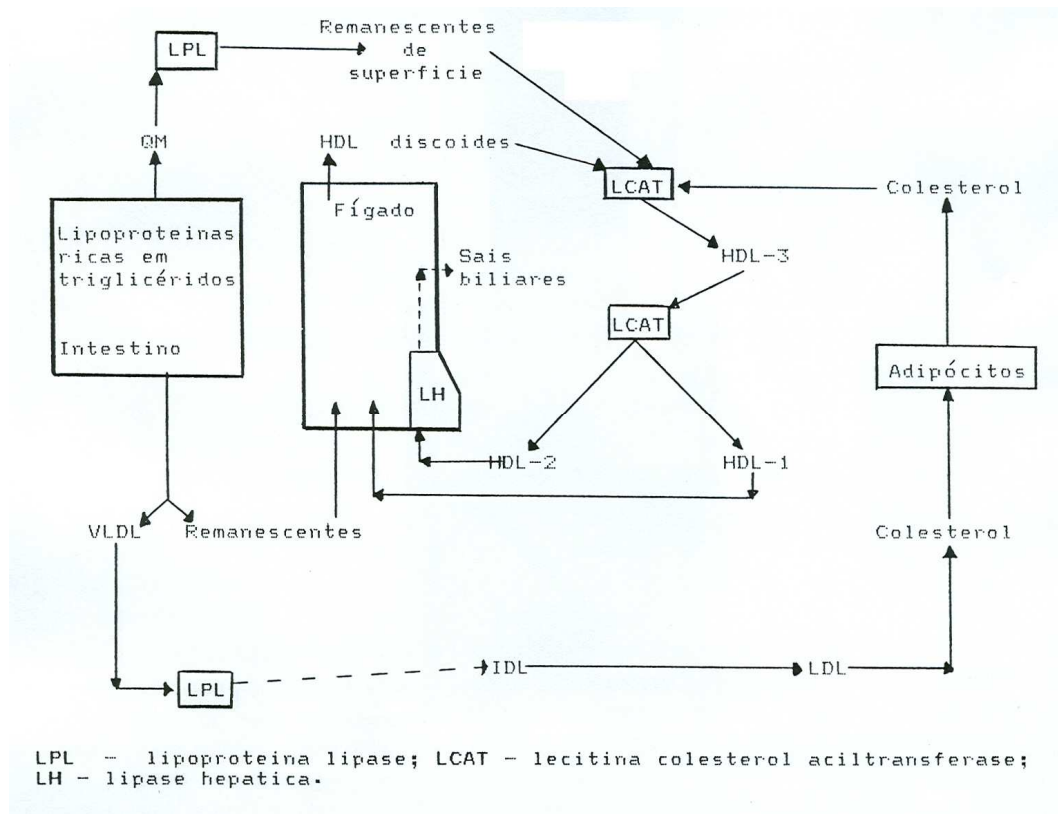


FIGURA 2

Síntese e transporte dos lípidos no organismo

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Orville G Kolterma, Insel J, Saekow M, Olekow M, Olefsky JM – Mecanism of insulin resistance in human obesity – evidence for receptor and postreceptor defect. J Clin Invest 1980; 65:1272-1284.
- Schwartz RS, brunzell JD – Increase of adipose tissue lipoprotein lipase activity with weight loss. L Clin Invest 1981; 67:1425-1430.
- Sadur CN, Eckel RH – Insulin stimulation of adipose tissue lipoprotein lipase – use of the euglicemic clamp technique. J Clin Invest 1982; 69:1119-1125.

- Rebuffe-Srивe M, Basdevant A, Guy-Grand B – Nutritional induction of adipose tissue lipoprotein lipase in obese subjects. *Am J Clin Nutr* 1983; 37:974-980.
- Lewis B – The lipoproteins: predictors, protectors and pathogens. *Br Med J* 1983; 287:1161-1164.
- Iverius PH, Bruzell JD – Human adipose tissue lipoprotein lipase: changes with feeding and relation to postheparin plasma enzyme. *Am J Physiol* 1985; 249:E107-E114.
- Fong BS, Rodrigues PO, Salter AM, Yip BP, Despres JP, Angel A, Gregg RE – Characterization of high-density lipoprotein binding to human adipocyte plasma membranes. *J Clin Invest* 1985; 75:1804-1812.
- Kesäniemi YA, Beltz WF, Grundy SM – Comparisons of metabolism of apolipoprotein B in normal subjects, obese patients and patients with coronary heart disease. *J Clin Invest* 1985; 76:586-595.
- Little JA, Graves K, Suchindran CM, Milner J, McGuire V, Beaton G, Feather T, Matson FH, Christiansen D, Williams OD – Customary diet, anthropometry and dislipoproteinemia in selected North American populations. The lipid research clinics program prevalence study. *Circulation* 1986; 73 (suppl. I):I80-I90.
- La Rosa JC, Levy RI, Hazzard WR – Some clinical implications of the results of the lipid research clinics program prevalence study. *Circulation* 1986; 73 (Suppl. I):I126-I133.
- Bergman MD, Gidez LI, Eder HA – High-density lipoprotein subclasses in diabetes. *Am J Med* 1986; 82:488-492.
- Knopp RH, Walden CE, Heiss G, Johnson JL, Wahn PW – Prevalence and clinical correlates of beta-migrating VDL. Lipid research clinics program prevalence study. *Am J Med* 1986; 81:493-502.
- Raison J, Basdevant A, Guy-Grand B – Relation entre repartition du tissu adipeux e lipides circulants chez la femme obese. *Présse Med* 1987; 16(9):431-433.
- Falko JM, Parr JH, Simpson RN, Wynn V – Lipoprotein analyses in varying degrees of glucose tolerance (comparison between non-insulin-dependent diabetes, impaired glucose tolerant and control populations). *Am J Med* 1987; 83:641-647.
- Patsch JR, Prasad S, Gotto AM, Patsch W – High density lipoprotein-2. Relationship of the plasma levels of this lipoprotein species to its composition, to the magnitude of postprandial lipemia and to the activities of lipoprotein lipase and hepatic lipase. *J. Clin Invest* 1987; 80:341-347.
- Assman G – Lipid metabolism and atherosclerosis. Schattauer Verlag, 1982.
- Crepaldi G – Lipoprotein metabolism and therapy of lipid disorders. Excerpta Med. 1982.

RESPIRAÇÃO MITOCONDRIAL¹

J.P. Guimarães²

A maior parte da energia resultante da degradação dos hidratos de carbono e de outros nutrientes não é armazenada imediatamente sob a forma de ATP, mas sim através da redução de NAD e FAD. A energia acumulada nestes compostos é posteriormente transformada em ATP mediante um complicado processo chamado fosforilação oxidativa, no qual a transferência dos electrões do NADH e FADH₂ para o oxigénio, por intermédio de uma cadeia de aceitadores de electrões, permite o armazenamento de parte da energia acumulada sob a forma de ATP.

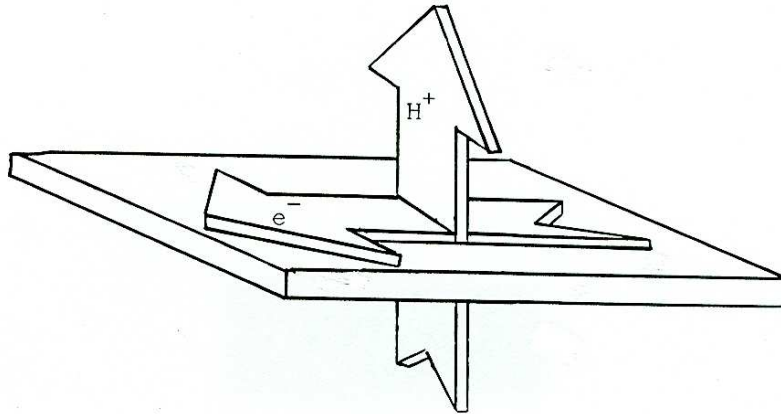
Esta transferência energética não se baseia em reacções químicas, implica a existência de uma membrana que limita um espaço interior em oposição a um espaço exterior, que correspondem à matriz mitocondrial e espaço intermembranar; os componentes da cadeia encontram-se englobados na membrana interna da mitocôndria. Esta “geografia” é importante (Fig. 1), já que se aceita actualmente que as transformações energéticas (o “trânsito” dos electrões em direcção ao oxigénio versus a síntese de ATP) se encontram relacionados entre si pela formação de um gradiente de protões entre os dois lados da membrana interna da mitocôndria. O fluxo de electrões fornece a energia para a translocação de protões para o exterior da matriz mitocondrial, gerando-se assim uma dupla desigualdade: eléctrica (potencial de membrana mais negativo do lado de dentro da matriz: $\Delta\psi \approx \cong$, mais ácido do lado de fora).

Esta energia acumulada sob a forma de um gradiente protónico é utilizável directamente (1) no transporte de iões através da membrana (2), na produção de calor, ou (3) na importação de certas proteínas mitocondriais; do ponto de vista energético o mais importante para a célula é a possibilidade de armazenamento da energia do gradiente sob a forma de ATP.

¹ Apresentação em sessão científica interna de 22/Fevereiro/1988

² Assistente convidado do Instituto de Bioquímica, FML

Palavras-chave: ATP/ADP, cadeia de transporte de electrões, energia química, respiração mitocondrial.



$$\Delta\tilde{\mu}_{H^+} = \Delta p = \Delta\psi - Z\Delta pH$$

$\Delta\psi$ = Potencial de membrana (± 170 mV)

ΔpH = Diferença de pH entre os dois
lados da membrana (± 30 mV)

FIGURA 1

Esquemática da transdução energética mitocondrial

Esquemática e resumidamente, consideram-se os elementos transportadores de electrões da cadeia respiratória agrupados em complexos de carácter estrutural e funcional:

- (I) NADH: ubiquinona oxido-redutase, complexo que contém FMN e grupos FeS, e que catalisa a redução da coenzima Q com electrões provenientes do NADH, associando a esta transferência a translocação vectorial de protões. O complexo I é inibido por várias substâncias do tipo da rotenona, pieridicina A, amital, barbitúricos, BAL (British anti-Lewisite), agentes mercuriais, etc.
- (II) Succinato: ubiquinona oxido-redutase, que é um complexo com acção transportadora de electrões equivalente à do complexo I, mas que recebe os electrões do succinato, além de não ter acção de translocação de protões. Na sua composição entram grupos FeS, citocromo B₅₆₀ e FAD. É inibido por TTFA (2-tenoiltrifluoroacetona) e carboxamidas.
- (III) Ubiquinol: ferricitocromo c oxido-redutase, cuja acção de captação de electrões da ubiquinona reduzida e respectiva transferência para o citocromo c está ligada a translocação vectorial de protões. Da sua composição fazem parte os citocromos b₅₆₂, b₅₆₆, c₁ e grupo FeS. Substâncias como a antimicina A, BAL, mixotiazol e HQNO (2-heptil-4-hidroxiquinolina N-óxido) são inibidores do complexo III

- (IV) Ferrocitocromo c: oxigénio oxido-redutase, vulgarmente chamado citocromo oxidase, é o complexo que catalisa a transferência final dos electrões para o oxigénio, com formação de água. Desta transferência resulta também a translocação de protões. Englobados no complexo IV existem dois grupos heme, designados a e a₃, a cada um dos quais está associado um átomo de cobre. Este complexo é inibido por monóxido de carbono e cianeto.
- (V) ATP sintase. Este complexo é normalmente considerado juntamente com os complexos I-IV, embora não esteja propriamente relacionado com o transporte de electrões. Contudo, do ponto de vista funcional encontra-se indirectamente ligado ao transporte de electrões, pois é este complexo que produz ATP aproveitando o gradiente que resulta da translocação dos protões, à medida que os electrões vão progredindo através da cadeia respiratória. É um complexo composto por dois sectores principais, designados F₀ e F₁, sendo a acção catalítica da responsabilidade da porção F₁, funcionando F₀ como sector de fixação à membrana e associado ao transporte de protões. A articulação destes dois sectores forma uma estrutura comparável a um peão de xadrez, sendo a base e a haste o sector F₀ e a cabeça o sector F₁. A composição do sector F₁ está mais ou menos estabelecida, pensando-se que seja constituído por 5 tipos de subunidades designadas de α e ϵ , sendo a estequiometria mais provável $\alpha_3, \beta_3, \gamma\delta\epsilon$. É ao nível de F₁ que actuam como inibidores o péptido IF₁ (inibidor natural, que se encontra aumentado, por mitocôndrias isoladas a partir de células tumorais) e substâncias como a aurovertina (Fig. 2). A composição do sector F₀ é mais controversa. A haste parece ser composta pelas subunidades F₆ e OSCF, a subunidade que confere susceptibilidade à oligomicina (oligomycin sensitivity-conferring protein), que parece ter acção na translocação de protões, mas que não é a subunidade à qual se ligam a oligomicina e o DCCD (N,N'-diclohexilcarbodiimida). Da base fazem as subunidades SU₆, SU₈, CFB e a subunidade à qual se ligam o DCCD e a oligomicina (designada DCCD-binding protein), entre outras.

Grande parte dos conhecimentos que hoje se tem sobre o funcionamento da cadeia respiratória resultam de experiências feitas com substâncias que, de algum modo, alteram o funcionamento integrado deste complexo sistema de transformação e conservação de energia. Além dos agentes já referidos a propósito de cada complexo, há outras, substâncias, como por exemplo o atractilosido (que inibe o transporte de nucleótidos adenílicos através da membrana interna da mitocôndria) ou certos ionóforos (substâncias que formam complexos com determinados catiões, facilitando o transporte destes através de membranas). É o caso da valionomicina, que ao facilitar o transporte de K⁺ através da membrana, permite que este ião anule o componente eléctrico $\Delta\psi$ do gradiente electroquímico (não alterando o gradiente de pH). A nigericina, pelo contrário, anula apenas o gradiente de pH sem fazer variar o potencial eléctrico, pois permite a passagem

do K^+ , mas por troca com H^+ do lado oposto (como ambos os iões têm carga eléctrica igual o potencial eléctrico não é afectado). Há ainda ionóforos, como a gramicidina A, que facilitam de tal modo o transporte de iões entre os dois lados da membrana que dissipam de imediato todo o tipo de gradiente que tenha a formar-se, funcionando na prática como desacopladores, isto é, substâncias que dissociam por completo o transporte dos electrões da formação de ATP, sendo a energia dissipada sob a forma de calor.

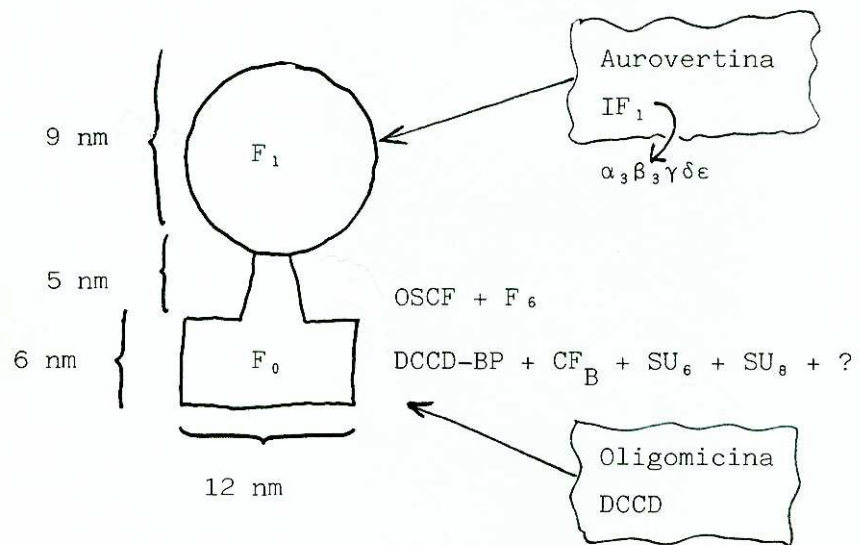


FIGURA 2

Inibidores da ATP síntase

O exemplo clássico de desacoplar é o dinitrofenol, cuja presença torna a membrana permeável aos prótons, de forma que estes tendem a “refluir” imediatamente após terem sido translocados, estabelecendo-se um equilíbrio entre os dois lados da membrana, de modo que o potencial electroquímico é anulado, não havendo por isso energia disponível para “propulsionar” a síntese de ATP.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Colowick SP, Kapman NO – Methods in Enzymology. Vol. LV, Part F. bioenergetics: Oxidative Phosphorylation. Fleischer S, Packer L (eds). Academic Press, New York, 1979.
- Darley-Usmar VM, Rickwood D, Wilson MT – Mitochondria: A Practical Approach. Rickwood D, Hames BD (eds). IRL Press, Oxford, 1987.
- Hay R, Böhni P, Gasser S – How mitochondria import proteins. Biochim Biophys Acta 1984; 779:65-87.

- Lane MD, Pedersen PL, Mildvan AS – The mitochondrion updated. *Science* 1986; 234:526-527.
- Ferguson SJ – The ups and downs of P/O ratios (and the question of non-integral coupling stoichiometries for oxidative phosphorylation and related processes). *Trends Biochem Sci* 1986; 11:351-353.
- Amzel LM, Pedersen PL – Proton ATPases: structure and mechanism. *Ann Rev Biochem* 1983; 52:801-824.
- Luciaková K, Kuzela S – Increased content of natural ATPase inhibitor in tumor mitochondria. *FEBS Lett* 1984; 177:85-88.
- Ernster L, Schatz G – Mitochondria: a historical review. *J Cell Bio* 1981; 91:227s-255s.
- Hatefi Y – The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system. *Ann Rev Biochem* 1985; 54:1015-1069.

ORGANOFOSFORADOS, SEUS MALEFÍCIOS¹

Filomena Dias Alves²

Os organofosforados são usados na agricultura como produtos fitofarmacêuticos. São ésteres de ácidos inorgânicos e fazem parte do grupo dos insecticidas orgânicos.

Quando se usam os organofosforados como insecticidas no combate aos insectos prejudiciais aos frutos, deve ser respeitado o intervalo de segurança do insecticida, que indica o tempo que se deve esperar entre o último tratamento e a colheita, e que, na altura desta, garantirá um nível de resíduos nas culturas tratadas sem problemas toxicológicos para o consumidor.

Podemos considerar dois tipos de toxicidade: aguda e crónica. A toxicidade aguda é uma das mais importantes características de um pesticida, sendo expressa pelo LD50. Na toxicidade aguda podemos considerar quatro classes toxicológicas: I a IV, graus decrescentes de toxicidade. Mais de 50% dos organofosforados pertencem à classe I, a mais tóxica, e apenas 2% à classe IV.

Atendendo à toxicidade crónica os organofosforados (assim como os pesticidas em geral), uma vez aplicados sobre as culturas deixam um depósito nestas; se estes resíduos forem ingeridos diariamente, ao longo de algum tempo, poderão causar uma intoxicação do tipo crónica. Existe pois uma contaminação generalizada e accidental do meio ambiente e da vida animal.

A acção fisiológica destes compostos, consiste essencialmente na inibição de esterases incluindo a acetilcolinesterase (dos tecidos nervosos e eritrócitos) e a pseudocolinesterase (plasma e soro) daqueles, resultando acumulação de acetilcolina nas sinapses colinérgicas. Os organofosforados não se acumulam nos tecidos; o seu efeito cumulativo resulta da diminuição da actividade da colinesterase.

¹ Apresentação em sessão científica interna de 29/Fevereiro/1988

² Assistente estagiária do Instituto de Bioquímica, FML

Palavras-chave: esterases, insecticidas, organofosforados, sistema colinérgico

A absorção destes compostos é mais importante ao nível da pele mas também se faz através das mucosas, pulmões e tubo digestivo.

São altamente lipossolúveis penetrando no sistema nervoso central.

Os organofosforados são metabolizados por enzimas oxidativas e hidrolíticas (fosforilfosfatases), distribuídas por todo o organismo. Existe conversão no fígado de alguns organofosforados numa forma mais tóxica (paratião em paraoxon, e malatião em malooxon).

Finalmente, são excretados na urina, sob a forma de produtos de degradação.

O diagnóstico e a clínica baseia-se no seguinte:

- 1º História ou evidência da exposição ao insecticida;
- 2º Sinais e sintomas de intoxicação, que podem manifestar-se de 5 minutos a 12 horas depois da exposição e sempre antes das 24 horas. Geralmente regredem ao fim de 10 dias; estes sinais e sintomas manifestam-se ao nível do SNC (coma, depressão respiratória, convulsões) e a nível do sistema nervoso periférico, como efeitos muscarínicos (vómitos, diarreia, miose, sudorese, e como efeitos nicotínicos (fasciculações, paralisia flácida); podem ocorrer ainda arritmias cardíacas, edema agudo do pulmão, alterações electrocardiográficas.
- 3º Melhoria dos sinais e sintomas depois da administração de atropina e de reactivadores da colinesterase (pralidoxima ou obidoxima) e/ou tolerância aumentada à atropina.
- 4º Alterações laboratoriais (hemoconcentração, leucocitose eosinopénia, hiperglicémia, glicosúria, acetonúria, albiminúria, inibição da actividade da colinesterase e pseudocolinesterase.

Desde 1984 está em curso um estudo epidemiológico multinacional sobre os efeitos neurotóxicos da exposição crónica a pequenas quantidades de pesticidas organofosforados, este estudo tem sido suportado em dez países europeus pelo programa de desenvolvimento das Nações Unidas, juntamente com a O.M.S., através da sua secção regional para a Europa.

O protocolo deste estudo assenta nos seguintes requisitos:

- 1º Níveis de exposição e absorção nos grupos de residentes ou comunidades agrícolas próximas de campos pulverizados.
- 2º Flutuações dia-a-dia dos níveis de exposição.
- 3º Relação entre efeitos agudos e crónicos (insidiosos) no SNC e sistema nervoso periférico.

4º Consideração da paraoxonase sérica como indicador da susceptibilidade individual aos efeitos tóxicos destes compostos.

Os efeitos tóxicos agudos são bem conhecidos, enquanto os efeitos tóxicos crónicos que podem ser causados a longo termo por baixos níveis de exposição, estão mal caracterizados. Podemos considerar que existe inibição irreversível, cumulativa e crónica da actividade da colinesterase. A toxicidade crónica pode ser pois uma sequela de intoxicação aguda ou resultar da exposição prolongada a baixos níveis de organofosforados. Esta intoxicação crónica faz-se sentir essencialmente ao nível do sistema nervoso (neuropatia tardia e da memória, ansiedade, depressão), surgindo alterações no electroencefalograma, e também a nível dermatológico (aftas, dermatite de contacto, estomatite ulcerosa).

Quando existe uso descontínuo ou sazonal dos pesticidas, devem ser realizados estudos três vezes por ano: pré-sazonal, sazonal e pós-sazonal. Cada país deve seleccionar três grupos de risco: alto, médio e baixo; cada um destes grupos constituído por vinte a trinta pessoas sem história de ingestão de drogas neurotóxicas, agentes físicos causadores de neuropatia, doenças psiquiátricas, neurológicas ou hepáticas. Podemos assim analisar os efeitos tóxicos crónicos dos insecticidas organofosforados.

A Organização Mundial de Saúde recomenda os seguintes métodos para avaliação da absorção e exposição aos organofosforados:

- 1º Monitorização ambiental
- 2º Monitorização biológica
- 3º Vigilância médica.

A vigilância biológica é considerada a mais importante; baseia-se no doseamento da acetilcolinesterase (indicador de exposição), e da pseudocolinesterase (indicador da exposição e do efeito tóxico), e na determinação dos alquilofosfatos urinários; suplementarmente, e de acordo com os meios da instituição, a determinação da actividade da paraoxonase sérica, da N.T.E. linfocitária ou plaquetária e de oxidase.

Não pode ser usada uma só determinação isolada da actividade da colinesterase para avaliar se um indivíduo foi exposto a um insecticida organofosforado; há que efectuar três doseamentos basais de acetilcolinesterase e pseudocolinesterase (anteriores à exposição e com uma semana de intervalo), assim como determinar valores pós exposição (três doseamentos nos 14 dias a seguir à exposição). Há retorno da actividade da acetilcolinesterase ao valor normal, anterior à

exposição, ao fim de cinco semanas e da pseudocolinesterase ao fim de quatro semanas. Quando se administram oximas (pralidoxima, obidoxima) verifica-se retorno imediato da acetilcolinesterase ao valor normal, mas não da pseudocolinesterase. Quando não há valores basais anteriores à exposição, e para confirmar a absorção fazem-se doseamentos da actividade da acetilcolinesterase e pseudocolinesterase nos 14 dias após a exposição, verificando-se aumento gradual da actividade de ambos, mas sendo mais lento o restabelecimento da actividade da acetilcolinesterase.

Os alquilofosfatos urinários, dimetil e detilfosfatos, indicam apenas exposição e absorção.

A paraxonase sérica, que apresenta grande variação genética está envolvida na destoxificação do paraoxon, indicando apenas susceptibilidade ao paratião.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Maroni M, Järvisalo J, la Ferla F – The Who-Undp epidemiological study on the health effects of exposure to organophosphorus pesticides. *Toxicol Letters* 1986; 33:115-123.
- Franklim CA, Muir NI, Moody RP – The use of biological monitoring in the estimation of exposure during the application of pesticides. *Toxicol Letters* 1986; 33:127-136.
- Lavy TL, Mattice JD – Progress in pesticide exposure studies and future concerns. *Toxicol Letters* 1986; 33:61-71.
- Coye MJ, Barnett PG, Midtling JE, Velasco AR, Romero P, Clements CL, Rose TG – Clinical confirmation of organophosphate poisoning by serial cholinesterase analyses. *Arch Intern Med* 1987; 147:438-442.
- Richards PR, Kramer JW, Baker DB, Krieger KA – Pesticides in rainwater in the northeastern United States. Peter Richards, *Nature* 1987; 327:129-131.
- Saldanha C – Acetilcolinesterase. Tese de Doutoramento, Lisboa, 1986.

PROTEÍNAS C e S¹

*Luís Cardoso*²

A proteína C encontra-se no plasma sob a forma de um zimogénio dependente da vitamina K. Tem o peso molecular de 66.000 e é constituída por duas cadeias polipeptídicas uma leve (P.M. – 21.000) e uma pesada (P.M. 41.000), ligadas entre si por pontes bissulfito. Apresenta na sua constituição cerca de 23% de hidratos de carbono e dez resíduos de ácido γ -carboxiglutâmico na porção amino-terminal.

A activação da proteína C confere-lhe propriedade anticoagulante. Esta ocorre após a hidrólise pela trombina da ligação peptídica entre os resíduos de aminoácidos 12 e 13 (Arg-Leu) da cadeia pesada, com a libertação de um pequeno péptido, e a transformação da molécula numa protease serínica. O resíduo de serina do seu centro activo encontra-se localizado na cadeia pesada.

A activação da proteína C decorre de forma lenta, sem a presença do cofactor endotelial trombomodulina. Esta proteína, presente na membrana plasmática da célula endotelial, forma complexos estequiométricos com a trombina, aumentando a velocidade de activação da proteína C cerca de 800 vezes. A ligação da trombina à trombomodulina leva também à diminuição da actividade fibrinogenolítica da trombina. Esta acção, demonstrada no coelho, não foi confirmada no homem.

A actividade anticoagulante da proteína C activada é devido a inactivação (por proteólise) dos factores V e VIII da coagulação. Essa inactivação é mais marcada quando aqueles factores se encontram nas suas formas activadas e em presença de fosfolípidos e Ca^{2+} . A inactivação decorre com muito maior rapidez na presença de proteína S, em virtude desta proteína facilitar a interacção Ca^{2+} -dependente entre a proteína C activada e os fosfolípidos.

¹ Apresentação em sessão científica interna de 7/Março/1988

² Assistente estagiário do Instituto de Bioquímica, FML

Palavras-chave: hemostase, proteína C, proteína S

A proteína S é uma glicoproteína com dez resíduos de ácido γ -carboxiglutâmico, dependentes da vitamina K na sua porção aminoterminal, e um peso molecular de cerca de 70.000. Há evidência de que esta proteína é sintetizada e tem expressão a nível endotelial. É constituída por uma única cadeia polipeptídica e aparentemente destituída da actividade proteásica. A proteólise da proteína S pela trombina diminui a sua afinidade para o cálcio, e provavelmente a sua ligação aos fosfolípidos.

A proteína S encontra-se no plasma sob duas formas: uma livre e outra ligada à proteína ligante de C4b. Esta proteína, cofactor na proteólise de C4b pelo activador de C3b constitui um importante sistema de controlo da cascata do complemento. Desconhece-se o significado da ligação da proteína S à proteína ligante de C4b, contudo essa ligação parece ocorrer em local diferente daquele em que se liga a porção C4b do complemento, não afectando a proteólise pelo inactivador de C3b.

A proteína C activada não é inibida pela antitrombina III mesmo na presença de heparina. Foi recentemente isolado um inibidor proteásico específico para a proteína C. A ligação deste inibidor à proteína C, aumenta em presença de elevadas concentrações de heparina e sulfato de dextrano. A carência deste inibidor em situações de deficiência congénita combinada de factor V e VIII proposta por Marlar e Griffin em 1980, não foi confirmada por outros autores.

A activação da proteína C leva também a um aumento da fibrinólise o qual tem sido associado a um aumento da actividade do activador tecidual do plasminogénio. Este aumento de actividade parece ser devido a diminuição do inibidor específico daquele activador.

A deficiência de proteína C está associada a um maior risco de trombose. Os indivíduos afectados de doença tromboembólica com défice heterozigótico de proteína C, são habitualmente jovens em que não se identifica qualquer outro factor de risco para trombose. Broekmans e Cols propuseram em 1983, com base num estudo de três famílias holandesas, tratar-se de uma forma de transmissão hereditária autossómica dominante de penetrância variável.

O défice homozigótico de proteína C manifesta-se por púrpura fulminante neonatal, por vezes fatal. Os níveis de proteína C são nestes casos extremamente baixos ou mesmo não detectáveis. No estudo de recém-nascido com deficiência quase total de proteína C foi confirmada a deficiência parcial (35 a 65% do valor normal) nos progenitores e outros familiares. Contudo, nem todos estes indivíduos apresentavam história de tromboembolismo venoso.

Miletich e Cols em 1987, com base num estudo efectuado em 5422 dadores de sangue, propuseram que a prevalência da deficiência heterozigótica fosse 1/200 a 1/300, não sendo sempre acompanhada de trombose. A prevalência muito maior proposta por este autor relativamente a Broekmans (o qual estimou uma prevalência de cerca de 1/16.000) é, segundo Miletich, devido à aceitação de que a deficiência heterozigótica raramente ocorre na população sem trombose. Ainda segundo Miletich, a prevalência do défice homozigótico é muito superior à esperada, se aceitarmos que a frequência do défice homozigótico é apenas de 1/16.000.

Miletich e Cols sugerem que a associação de trombose a deficiência de proteína C é devida à presença concomitante de outras anomalias moderadas não detectáveis, nomeadamente, défice de antitrombina III, proteína S, trombomodulina, cofactor II da heparina, plasminogénio, activadores do plasminogénio, e outros.

As alterações funcionais da proteína C são geralmente heterozigóticas, manifestando-se por discrepância entre os níveis antigénicos de proteína C e o seu valor obtido por doseamento funcional.

A deficiência adquirida de proteína C pode ocorrer em situações de coagulopatia de consumo, e em situações de síntese hepática deficiente, como foi demonstrado por Rodeghiero e Cols em doentes com leucemia aguda. Encontra-se também descrito um caso de doença trombótica fatal num doente com paraproteinemia à IgG, em que a imunoglobulina inibia completamente a actividade anticoagulante da proteína C activada.

A deficiência de proteína S está também associada a trombose recorrente. Comp, em 1984, descreveu um caso de dois irmãos com doença trombótica recorrente e sem níveis detectáveis de proteína S por ensaio funcional. Contudo, estes doentes apresentavam proteína S quando avaliada antigenicamente.

Segundo Comp, a maioria dos indivíduos com deficiência de proteína S apresentavam níveis antigénicos normais, ou ligeiramente abaixo, e uma diminuição dos valores obtidos por ensaio funcional. A explicação para este facto reside em que a proteína S presente estava, quase na totalidade, ligada à proteína ligante de C4b. Propôs nestes casos a designação de défice de tipo I. Nos indivíduos em que havia deficiência marcada, quer de proteína livre quer ligada, propôs a designação de défice de tipo II.

A hereditariedade da deficiência de tipo I é autossômica dominante. Curiosamente os dois indivíduos descritos com déficit de tipo II são filhos de indivíduos com deficiência de tipo I, sendo provável que tenham herdado um gene anormal de cada um dos progenitores.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Broekmans AW, Veltkamp JJ, Bertina RM – Congenital protein C deficiency and venous thromboembolism. A study of three dutch families. *N Engl J Med* 1983; 309:340-344.
- Barbui T, Finazzi G, Mussini L, Riganti M, Donati MB, Colucci M, Collen D – Hereditary dysfunctional protein C (Protein C Bergamo) and thrombosis. *Lancet* 1984; 2:819.
- Comp PC, Esmon CT – Generation of fibrinolytic activity by infusion of activated protein C into dogs. *J Clin Invest* 1981; 68:1221-1228.
- Comp PC, Esmon CT – Recurrent venous thromboembolism in patients with a partial deficiency of protein S. *N Engl J Med* 1984; 311; 1525-1528.
- Comp PC, Nixon RR, Cooper MR, Esmon CT – Familial protein S deficiency is associated with recurrent thrombosis. *J Clin Invest* 1984; 74:2082-2088.
- Comp PC, Nixon RR, Esmon CT – Determination of functional levels of protein C, an antithrombotic protein, using thrombin-thrombomodulin complex. *Blood* 1984; 63:15-21.
- Comp PC, Doray D, Patton D, Esmon CT – An abnormal plasma distribution of protein S occurs in functional protein S deficiency. *Blood* 1986; 67:504-508.
- Canfield WM, Kisiel W – Evidence of normal functional levels of activated protein C inhibitor in combined factor V/VIII deficiency disease. *J Clin Invest* 1982; 70:1260-1272.
- Dahlbäck B, Stenflo J – High molecular weight complex in plasma between vitamin K-dependent protein S and complement component C4b-binding protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78:2512-2516.
- Dahlbäck B – Purification of human vitamin K-dependent protein S and its limited proteolysis by trombin. *Biochem J* 1983; 209:837-846.
- Dahlbäck B – Purification of human C4b-binding protein and formation of its complex with vitamin K-dependent protein S. *Biochem J* 1983; 209:847-856.
- Dahlbäck B, Hildebrand B – Degradation of human complement component C4b in the presence of the C4b-binding protein-protein S complex. *Biochem J* 1983; 209:857-863.
- Esmon CT, Owen WG – Identification of an endothelial cell cofactor for thrombin-catalyzed activation of protein C. *proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78:2249-2252.
- Esmon CT, Esmon NL, Harris KW – Complex formation between thrombin and thrombomodulin inhibits both thrombin-catalyzed fibrin formation and factor V activation. *J Biol Chem* 1982; 257:7944-7947.

- Esmon NL, Owen WG, Esmon CT – Isolation of a membrane –bound cofactor for thrombin-catalyzed activation of protein. *C J Biol Chem* 1982; 257:859-864.
- Esmon CT – The regulation of natural anticoagulant pathways. *Science* 1987; 235:1348-1352.
- Griffin JH, Evatt B, Zimmerman TS, Kleiss AJ – Deficiency of protein C in congenital thrombotic disease. *J Clin Invest* 1981; 68:1370-1373.
- Griffin JH, Mosher DF, Zimmerman TS, Kleiss AJ – Protein C, an antithrombotic protein, is reduced in hospitalized patients with intravascular coagulation. *Blood* 1982; 60:261-264.
- van Hinsbergh VWM, Bertina RM, van Wijngaarden A, van Tilburg NH, Emeis JJ, Haverkate F – Activated protein C decreases plasminogen activator-inhibitor activity in endothelial cell-conditioned medium. *Blood* 1985; 65:444-451.
- Kisiel W – Human plasma protein C. Isolation, characterization, and mechanism of activation by thrombin. *J Clin Invest* 1979; 64:761-769.
- Mitchell CA, Rowell JA, Hau L, Young JP, Salem HH – A fatal thrombotic disorder associated with an acquired inhibitor of protein C. *N Engl J Med* 1987; 317:1638-1642.
- Marciniak E; Wilson HD, Marlar RA – Neonatal purpura fulminans: a genetic disorder related to the absence of protein C in blood. *Blood* 1985; 65:15-20.
- Maruyama I, Salem HH, Ishii H, Majerus PW – Human thrombomodulin is not an efficient inhibitor of the procoagulant activity of thrombin. *J Clin Invest* 1985; 75:987-991.
- Miletich J, Sherman L, Broze Jr, G – Absence of thrombosis in subjects with heterozygous protein C deficiency. *N Engl J Med* 1987; 317:991-996.
- Marlar RA, Griffin JH – Deficiency of protein C inhibitor in combined factor V/VIII deficiency disease. *J Clin Invest* 1980; 66:1186-1189.
- Marlar RA, Kleiss AJ, Griffin JH – Mechanism of action of human activated protein C, a thrombin-dependent anticoagulant enzyme. *Blood* 1982; 59:1067-1072.
- Rodeghiero F, Mannucci PM, Vigano S et al – Liver dysfunction rather than intravascular coagulation as the main cause of low protein C and antithrombin III in acute leukaemia. *Blood* 1984; 63:965-969.
- Salem HH, Maruyama I, Ishii H, Majerus PW – Isolation and characterization of thrombomodulin from human placenta. *J Biol Chem* 1984; 259:12246-12251.
- Schwarz HP, Fischer M, Hopmeier P, Batard MA, Griffin JH – Plasma protein S deficiency in familial thrombotic disease. *Blood* 1984; 64:1297-1300.
- Seligsohn U, Berger A, Abend M, Rubin L, Attias D, Zivelin A, Rapaport S – Homozygous protein C deficiency manifested by massive venous thrombosis in the newborn. *N Engl J Med* 1984; 310:559-562.
- Sills RA, Marlar RA, Montgomery RR, Deshpande GN, Humbert JR – Severe homozygous protein C deficiency. *J Pediatr* 1984; 105:409-413.
- Suzuki K, Nishiura J, Hashimoto S – Protein C inhibitor. Purification from human plasma and characterization. *J Biol Chem* 1983; 258:163-168.

- Suzuki K, Nishioka J, Hashimoto S, Kamiya T, Saito H – Normal titer of functional and immunoreactive protein C – inhibitor in plasma of patients with congenital combined deficiency of factor V and factor VIII. *Blood* 1983; 62:1266-1270.
- Walter FJ – Regulation of activated protein C by protein S. The role of phospholipid in factor Va inactivation. *J Biol Chem* 1981; 256:11128-11131.

COLINESTERASES E PARATIÃO¹

Teresa Luísa Quintão²

A butirilcolinesterase (BuChE) e a acetilcolinesterase (AChE) são hidrolases pertencentes ao grupo das esterases carboxílicas.

Das suas múltiplas localizações no organismo humano são particularmente acessíveis a estudo a AChE dos glóbulos vermelhos e a BuChE do plasma. As suas localizações fazem sugerir funções igualmente variadas.

Em relação à AChE do sistema nervoso as hipóteses são de que ela intervenha na neurotransmissão colinérgica e dopaminérgica, na regulação das catecolaminas, somatostatina e ácido gama-aminobutírico, e na hidrólise da substância P e das encefalinas.

No músculo-esquelético é bem conhecida a acção da AChE a nível da junção neuromuscular na degradação da acetilcolina.

A AChE poderá estar envolvida na trombocitopoiese, visto que esta diferenciação celular é estimulada pela acetilcolina.

A AChE eritrocitária pode ser uma proteína vestigial, interferir no equilíbrio colinérgico-dopaminérgico, contribuir para a integridade da membrana do glóbulo vermelho, influenciar o transporte iónico e a permeabilidade da membrana.

A BuChE está relacionada com a sensibilidade à succinilcolina que alguns indivíduos com uma variante atípica da enzima apresentam, pode ser um teste de função hepática, controlar a colina e a acetilcolina plasmáticas; está envolvida no metabolismo das beta-lipoproteínas, podendo funcionar como índice de risco cardiovascular, faz a remoção de ésteres intermediários de colina

¹ Apresentação em sessão científica interna de 21/Março/1988

² Assistente convidada do Instituto de Bioquímica, FML

Palavras-chave: colinesterases, intoxicação, organofosfatos

podendo talvez promover o crescimento celular, e tem relação com a assimilação de nutrientes.

Inúmeras substâncias de utilização correntes podem alterar a actividade destas enzimas (ex: fenotiazidas, penicilina, vitamina K, ácido fólico, anti-maláricos, contraceptivos orais).

As actividades enzimáticas são modificadas por variadas situações patológicas como por exemplo: defeitos do tubo neural, certas doenças do sistema nervoso, certas anemias, hipertensão essencial, hiperlipoproteinémias. A gravidez é uma situação fisiológica em que há diminuição da actividade da BuChE.

A determinação da actividade enzimática pode ser feita por medição do pH ou por métodos colorimétricos.

Os organofosforados são substâncias que causam inibição enzimática destas enzimas por formação de ésteres de fosfato orgânico. Tem sido descrito que a sua administração crónica provoca a diminuição do número de receptores muscarínicos, induzindo o desenvolvimento de tolerância.

A determinação das actividades enzimáticas em indivíduos com intoxicação aguda pelo paratião mostrou a sua diminuição. Em alguns indivíduos verificou-se uma descida dos mesmos valores já depois de se ter iniciado a recuperação, o que poderá corresponder a uma libertação de organofosforado pelo fígado.

“In vitro”, os estudos feitos com várias concentrações de paratião em amostras de sangue venoso, sugerem a existência de duas populações, uma com maior resistência à inibição que a outra.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Carlota Saldanha – Acetilcolinesterase. Tese de doutoramento, Lisboa, 1985.
- Rev Port Med Mil 1982; 30:195.
- Ann Inst Pasteur 1961, 101:104-119.
- Blood 1986; 67:540-543.
- Clin Chim Acta 1978; 85:55-59.
- Clin Biochem 1980; 13:239-243.

PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS¹

J. Rodrigues Loureiro²

Sumário

A purificação das proteínas e posterior caracterização é um passo fundamental na compreensão dos processos bioquímicos em que estão envolvidas. Existem vários métodos de separação proteica com base em características moleculares, mais ou menos específicas de cada proteína. Estes métodos, isoladamente, são de um modo geral insuficientes para a obtenção de elevados graus de purificação proteica, a partir de misturas complexas, sendo habitualmente necessária a associação sequencial de dois ou mais, com base em critérios de separação diferentes. São referidos os princípios teóricos de cada um desses métodos, suas principais vantagens e desvantagens e o seu posicionamento numa estratégia de purificação.

INTRODUÇÃO

Os mecanismos moleculares de um processo bioquímico não podem ser completamente compreendidos sem que as moléculas dos reagentes envolvidos tenham sido isoladas e caracterizadas. De facto, a compreensão dos processos bioquímicos tem progredido à medida que as técnicas de purificação e caracterização de biomoléculas se têm desenvolvido e aperfeiçoado.

A separação e purificação de uma determinada proteína, presente numa dada amostra, pode ser feita com base em uma ou mais características da sua molécula que a diferenciem dos restantes constituintes da amostra. Assim, pode-se recorrer a diferentes métodos, designadamente: precipitação – com base em diferenças de solubilidade em função do pH, força iónica e constante dieléctrica do solvente; filtração em gel e centrifugação em gradiente de densidade – com base

¹ Apresentação em sessão científica interna de 18/Abril/1988.

² Assistente convidado do Instituto de Bioquímica, FML

Palavras-chave: metodologia de purificação proteica, proteínas

em diferenças de dimensão molecular; cromatografia de troca iónica – com base em diferenças de carga molecular; cromatografia de afinidade – com base na actividade biológica da proteína; cromatofocagem e focagem isoeléctrica – com base em diferenças nos pontos isoeléctricos; electroforese de zona em gel – com base em diferenças de carga e dimensão molecular. Para se conseguirem graus elevados de purificação, torna-se geralmente necessária a utilização sequencial de mais do que um método, baseados em critérios de separação diferentes.

As estratégias de purificação são delineadas individualmente para cada proteína, podendo no entanto tecer-se algumas considerações genéricas sobre os seus passos fundamentais.

Antes de se iniciar a purificação, tem obviamente que se proceder à extracção de uma amostra que contenha a proteína que se pretende purificar. Os processos de extracção utilizáveis variam com o material biológico em causa. Por se situarem fora do âmbito deste texto, não serão aqui mencionados.

A amostra resultante da extracção é, habitualmente, muito diluída, tem um volume grande e é composta por uma grande variedade de proteínas e outras biomoléculas. Por isso, o primeiro método a usar num processo de purificação deve ter, preferencialmente, capacidade para receber grandes volumes de amostra e um efeito de concentração, em detrimento de uma boa selectividade que será reservada para os passos seguintes. Assim, inicialmente pode-se usar, entre outros, métodos como a precipitação, a filtração em gel ou a cromatografia de troca iónica.

PRECIPITAÇÃO

As proteínas presentes na amostra possuem composições diferentes em aminoácidos ionizáveis e, como tal, têm pontos isoeléctricos (valores de pH do meio para os quais a carga total das suas moléculas é zero) diferentes. Quando se ajusta o pH da amostra ao ponto isoeléctrico de uma das proteínas presentes, as suas moléculas perdem a carga eléctrica, pelo que desaparecem as forças de repulsão electrostática existentes entre elas e coalescem, formando precipitados insolúveis. As restantes proteínas existentes na amostra, que possuem pontos isoeléctricos acima ou abaixo permanecerão em solução. É este o princípio teórico da chamada precipitação isoeléctrica.

Outro método de precipitação utilizável consiste na elevação da força iónica do meio. A força iónica exprime a concentração e o número de cargas eléctricas dos iões presentes numa solução. As proteínas globulares existentes numa solução proteica apresentam variações de solubilidade

em função da força iónica do solvente. Assim, quando no solvente existem baixas concentrações de sais de iões divalentes, como o cloreto de magnésio ou o sulfato de amónio, (estes induzem maiores alterações da solubilidade proteica que os monovalentes), a solubilidade das proteínas globulares é grande. À medida que essa concentração aumenta, há uma diminuição da solubilidade e para valores suficientemente altos, as proteínas precipitarão. Os valores da força iónica a que se dá a precipitação variam de proteína para proteína, assim permitindo a separação das que tenham comportamentos substancialmente diferentes. As proteínas assim precipitadas podem ser posteriormente solubilizadas, sem que haja grande risco de desnaturação. O sulfato de amónio, em virtude da sua grande solubilidade na água, permite a obtenção de forças iónicas muito elevadas, sendo por isso, o agente precipitante mais usado.

Também se pode induzir a precipitação proteica, adicionado à amostra solventes orgânicos com constantes dieléctricas (medida da capacidade de um meio reduzir as forças electrostáticas entre duas partículas ionizadas nele dissolvidas) menores que a água. É o caso do etanol ou das acetonas que, ao serem adicionados à amostra, reduzem-lhe as propriedades dieléctricas, aumentando as forças de atracção iónica entre cargas opostas, com diminuição do grau de ionização das moléculas proteicas e, conseqüentemente, da sua solubilidade. A diminuição da solubilidade por adição destes solventes varia de proteína para proteína, pelo que precipitam em tempos diferentes à medida que as propriedades dieléctricas do meio baixam. Este método tem a vantagem de induzir a desnaturação proteica se não se trabalhar a temperaturas muito baixas.

Estes métodos constituíram os primórdios das técnicas de purificação, sendo ainda frequentemente usados como etapas iniciais. Contudo, para se obterem graus de purificação razoáveis, torna-se necessário aplicar outros métodos mais precisos.

FILTRAÇÃO EM GEL

Se aplicarmos uma amostra composta por moléculas de diferentes dimensões (fase móvel) a uma coluna com um gel (fase estacionária) constituído por partículas com poros de determinado diâmetro, as moléculas da amostra serão eluídas da coluna por ordem decrescente das suas dimensões moleculares. A separação dos constituintes da amostra em função das dimensões moleculares deve-se ao facto de as moléculas maiores não penetrarem nas porosidades das partículas do gel e, conseqüentemente, a sua migração ao longo da coluna não é retardada. Pelo contrário, moléculas de menores dimensões, ao penetrarem nos poros do gel, distribuem-se por um volume líquido maior (volume da fase móvel acrescido de parte do volume da fase

estacionária) e, por esse motivo, o deslocamento através da coluna é retardado. Quanto maior for a fracção do volume da fase estacionária acessível a determinada espécie molecular presente na amostra, mais tarde esta será eluída. Essa fracção será tanto maior quanto menor for a molécula e/ou quanto maiores forem os poros das partículas constituintes do gel.

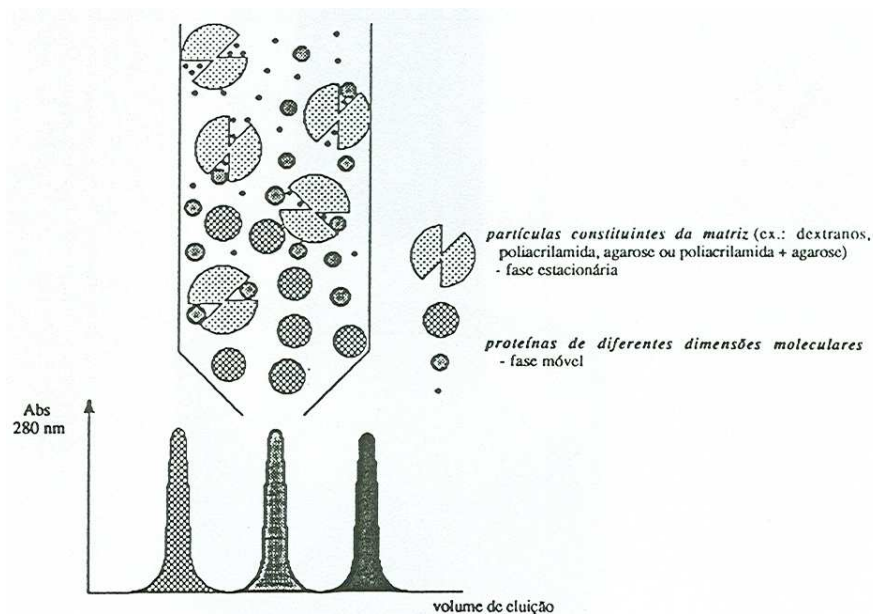


FIGURA 1

Esquema de coluna de filtração em gel; a maioria das proteínas apresenta grandes absorvâncias da radiação U.V. com comprimento de onda de 280nm devido à presença de tirosina e triptofano nas suas moléculas, proporcionando um método rápido e relativamente sensível para detecção proteica nas várias fracções eluídas de uma coluna de cromatografia. (Adaptado de “Gel Filtration” de Pharmacia Fine Chemicals).

O gel pode ser seleccionado segundo uma série de parâmetros de modo a adequá-lo à separação que pretendemos obter, nomeadamente: limite de exclusão – definido como o peso molecular da menor molécula que não difunde para o espaço intra-partícula do gel e, como tal, todas as substâncias acima deste limite serão eluídas numa só zona –, gama de fraccionamento – valores de peso molecular entre os quais a separação se faz de uma forma linear –, forma e dimensões das partículas.

A filtração em gel pode aplicar-se nas chamadas separações de grupo ou em fraccionamentos. A primeira consiste na separação de espécies moleculares que difiram marcadamente nas suas dimensões. São exemplos, a dessalinização de proteínas antes da liofilização ou concentração, a mudança do tampão em que se encontra suspensa a amostra, de modo a prepará-la para a próxima etapa do processo de purificação, a remoção de cofactores ou inibidores de uma

suspensão enzimática, a conclusão de reacções entre proteínas e reagentes de baixo peso molecular, a remoção de marcadores de baixo peso molecular (ex: isótopos radioactivos) em excesso após a marcação de proteínas. O fraccionamento consiste na separação de moléculas com dimensões idênticas e, neste caso, a escolha do gel e das condições experimentais é crítica se se pretende obter bons resultados. Com este objectivo, é usada geralmente como parte de um esquema de purificação em que se incluem métodos de separação.

Além das suas aplicações como método de separação, pode também utilizar-se na caracterização de moléculas purificadas, nomeadamente na determinação dos seus pesos moleculares. O volume de eluição, ou seja o volume de solvente que é necessário aplicar à coluna de cromatografia para se conseguir a eluição de um dado soluto é inversamente proporcional às dimensões das moléculas desse soluto. Podem-se fazer curvas de calibração com substâncias de peso molecular conhecido, relacionando o peso molecular com o volume de eluição. Repetindo-se depois a experiência com a substância em estudo, usando o mesmo gel e nas mesmas condições, pelo volume de eluição saberemos o peso molecular. A filtração em gel pode ainda usar-se para determinar a constante de equilíbrio de uma reacção.

Tem as vantagens de ser tecnicamente fácil, usar matrizes inertes, sem risco de desnaturação proteica e poder separar proteínas numa grande gama de pesos moleculares. Pode ser usada como etapa inicial ou tardia de um processo de purificação. Com passo inicial, tem como objectivo fazer uma primeira eliminação de substâncias contaminantes mas, por aumentar bastante o volume da amostra, não é muito recomendável. Como passo tardio, é muito usada para remoção de contaminantes presentes desde o início ou introduzidos pelos métodos previamente usados ou para substituição da fase móvel em que se encontra suspensa a proteína por uma que seja volátil e, como tal, passível de liofilização.

ULTRACENTRIFUGAÇÃO

Um outro método de separação proteica, em função das dimensões e massa molecular, é a ultracentrifugação em gradiente de densidade nas suas variantes zonal ou isopícnica, que podem ser usadas não só com intuítos analíticos como também como técnicas preparativas. A amostra contendo as várias proteínas é colocada sobre um meio de centrifugação de densidade crescente em direcção ao fundo do tubo. A velocidade angular do rotor da centrífuga (que pode ser superior a 80000 r.p.m.) gera uma força centrífuga actuante sobre as moléculas presentes na amostra, as quais migram em direcção ao fundo do tubo através do gradiente de densidade. As

moléculas proteicas tendem a dispor-se em bandas que correspondem às áreas em que a força centrífuga que as impele para o fundo é anulada pela força de atrito que se opõe ao movimento. Se se pensar que a força que se opõe ao deslocamento das macromoléculas é maior em direcção ao fundo do tubo (porque a densidade do meio é crescente) e que a força centrífuga que impele as moléculas proteicas para o fundo é tanto maior quanto maior for a sua massa ($F = mw^2r$ em que F é a intensidade da força centrífuga, m a massa da partícula, w a velocidade angular e r a distância da partícula ao eixo central de rotação), compreende-se que as macromoléculas de maior massa migrarão até zonas mais profundas porque só aí a força de atrito é suficiente para anular a força centrífuga de que vêm animadas, enquanto as de menor massa serão detidas mais à superfície, por forças de atrito menores.

A ultracentrifugação isopícnica difere da zonal apenas pelo facto de na primeira o gradiente de densidade não ser pré-formado, constituindo-se durante a centrifugação.

É uma técnica dispendiosa em que as separações entre proteínas com coeficientes de sedimentação (S) próximos ($S = v/w^2r$ em que v é a velocidade de sedimentação ou de migração da partícula ao longo do tubo, w é a velocidade angular e r é a distância da partícula em relação ao eixo central de rotação) são inferiores às conseguidas através de outros métodos, nomeadamente os cromatográficos. Por isso, é mais usada como técnica de extracção, permitindo, por exemplo, isolar o orgânito ou sub-orgânito celular onde existe a proteína que pretendemos purificar.

CROMATOGRAFIA DE TROCA IÓNICA

É um método de cromatografia em coluna cujo princípio teórico reside no facto de um meio (fase estacionária) carregado positiva ou negativamente poder estabelecer selectivamente ligações iónicas com algumas das moléculas presentes numa amostra (fase móvel) e, numa fase posterior, uma vez modificadas as condições de pH ou de força iónica, essas ligações poderem ser quebradas, libertando as várias moléculas adsorvidas, em diferentes momentos.

O meio de cromatografia é constituído por uma matriz à qual estão ligados covalentemente os grupos funcionais. Quando estes têm carga positiva, diz-se que o meio é um permutador aniónico porque estabelece ligações iónicas com moléculas carregadas negativamente. Quando têm carga negativa, diz-se que o meio é um permutador catiónico.

Em princípio, qualquer permutador serviria para separar qualquer proteína, bastando para tal suspender a amostra com a proteína a isolar num tampão com pH acima ou abaixo do seu ponto isoelétrico, consoante pretendêssemos usar respectivamente um permutador aniónico ou catiónico. Contudo, há que ter em conta, primeiro que tudo, os valores de pH entre os quais não há desnaturação da proteína em causa. Assim, se a proteína é mais estável acima do seu ponto isoelétrico, dever-se-á usar um permutador aniónico, enquanto se a estabilidade molecular da proteína for maior abaixo do seu ponto isoelétrico, o permutador a usar deverá ser catiónico.

O tampão em que se suspende a amostra deverá ser composto por catiões quando se usar um permutador aniónico e por aniões sempre que o permutador for catiónico, a fim de evitar competição na ligação aos grupos funcionais entre estes iões e as moléculas da proteína a purificar.

A força iónica do tampão inicial deverá ser a mais alta que ainda permita a adsorção das moléculas da proteína que nos interessa isolar, enquanto a do tampão de eluição deverá ser a menor que já permita a sua eluição, com o objectivo de eliminar o maior número possível de proteínas contaminantes.

Na figura 2, procura-se ilustrar esquematicamente a realização de uma cromatografia de troca iónica.

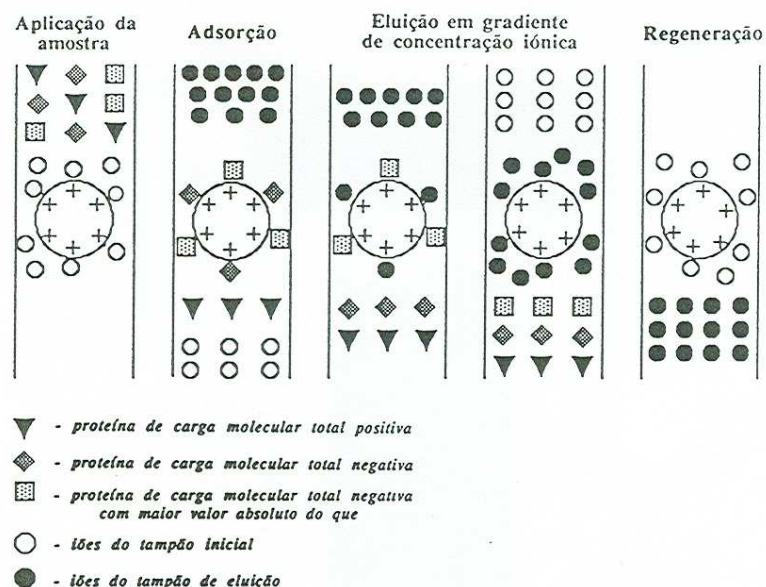


FIGURA 2

As várias fases de uma cromatografia de troca iónica (adaptado de “Ion Exchange Chromatography”, Pharmacia Fine Chemicals).

Assim, consideremos uma amostra contendo três proteínas diferentes (A, B, C) que, em suspensão no tampão escolhido, têm respectivamente carga molecular positiva (A) e carga negativa (B e C), sendo a da proteína C maior em valor absoluto que a da B. Foi escolhido um permutador aniônico. A proteína A por possuir carga positiva não é adsorvida e é a primeira a ser eliminada da coluna, ao contrário das proteínas B e C que estabelecem ligações iônicas com o meio. O passo seguinte é a eluição, em que vamos procurar que as moléculas adsorvidas se separem em tempos diferentes. A eluição poderá ser feita através de um gradiente de força iônica ou de pH. Os melhores resultados conseguem-se com gradientes contínuos, sendo os de força iônica mais fáceis de obter. No caso esquematizado, utilizou-se um gradiente de força iônica, ou seja, foi aplicado à coluna um tampão com concentração iônica crescente que permitiu quebrar as ligações dos grupos funcionais do meio com as proteínas, primeiro libertando-se a B (ligação mais fraca) e só depois a C. A eluição por gradiente de pH consiste em aplicar um tampão com valores de pH crescentes ou decrescentes (consoante o permutador é catiónico ou aniônico, respectivamente) de modo a aproximar o pH do meio do ponto isoelétrico das moléculas proteicas adsorvidas, ponto esse em que, em virtude de as suas cargas moleculares totais serem zero, se quebram as ligações iônicas estabelecidas com o meio, sendo então eluídas da coluna. Quando se usam gradientes de força iônica estes serão obviamente sempre crescentes.

A cromatografia de troca iônica é frequentemente usada como passo intermediário de um processo de purificação por ser compatível com a estabilidade da maioria das proteínas o tempo suficiente para se acumularem as quantidades necessárias para a execução das fases subsequentes. Após a cromatografia de troca iônica, a amostra fica habitualmente contaminada por elevadas concentrações salinas. Estes sais podem ser removidos por precipitação com sulfato de amónio seguido de diálise ou, mais recentemente, pode-se recorrer à cromatografia de fase reversa ou de interação hidrofóbica (a qual, ao contrário da anterior, não usa solventes orgânicos e portanto não comporta qualquer risco de desnaturação proteica).

CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE

É um método de cromatografia em coluna mais específico na medida em que, ao contrário dos anteriormente descritos, não se baseia apenas em diferenças físico-químicas mas também e, fundamentalmente, nas suas actividades biológicas.

Permite virtualmente separar qualquer proteína, bastando para tal dispor de um meio composto por uma matriz e um ligando que fixe reversivelmente, com maior ou menor especificidade, a

proteína em causa. Assim, se a proteína a separar for uma enzima, o ligando poderá ser um seu inibidor, cofactor ou substrato; se se trata de um anticorpo, o ligando poderá ser um antígeno ou um hapteno; se pretendemos isolar um receptor hormonal ou uma proteína transportadora, o ligando a usar poderá ser, respectivamente a hormona ou a substância transportada. Existem ligandos específicos de substância (ex: a procainamida em relação à colinesterase) e específicos de grupo (exs: a concanavalina A relativamente às glicoproteínas, a proteína A para as IgG, 5'AMP para enzimas com NAD^+ como cofactor e cinases ATP dependentes).

A execução de uma cromatografia de afinidade engloba várias fases, conforme esquematizado na figura 3.

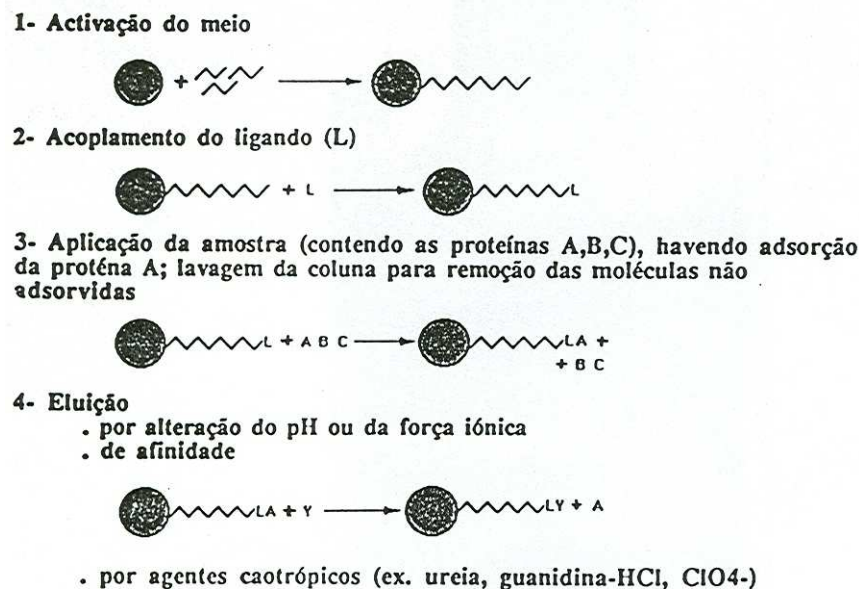


FIGURA 3

Esquema das várias etapas de uma cromatografia de afinidade (adaptado de “Affinity Chromatography”, Pharmacia Fine Chemicals).

A primeira fase é a activação do meio de cromatografia que consiste na criação de um braço espaçador ligado à matriz ao qual se vai numa segunda fase acoplar o ligando. O meio está então apto a receber a amostra com a proteína que se pretende isolar, a qual será fixada reversivelmente pelo ligando. Na fase seguinte, procede-se à lavagem para remoção das moléculas não adsorvidas após o que se pode processar a eluição das moléculas fixadas pelo ligando. A eluição pode ser feita por vários processos: a) alteração do pH ou da força iónica - utilizável quando as interações iónicas são importantes na formação do complexo ligando-proteína; b) eluição de afinidade - consiste na adição ao tampão de eluição de uma substância que se ligue ao ligando ou

à proteína adsorvida com maior afinidade que a proteína ou o ligando, respectivamente, assim quebrando a ligação existente; é o caso da eluição dos isoenzimas da desidrogenase láctica, adsorvidos a um gel de 2',5'ADP-agarose, com um gradiente de concentração de NADH (o NADH liga-se com diferentes afinidades aos vários isoenzimas da desidrogenase láctica, causando, assim, a sua eluição em tempos desfasados); c) agentes caotrópicos - se os outros métodos não permitirem a eluição, ter-se-á que recorrer a métodos mais agressivos que consistem na utilização de substâncias como a ureia, a guanidina-HCl, o ClO_4^- que, ao provocarem uma desnaturação ligeira da molécula proteica, quebram a sua ligação ao meio de afinidade; devem ser usados com precaução para não causarem desnaturações irreversíveis.

CROMATOFOCAGEM

É também um método de cromatografia em coluna que permite separar proteínas segundo os seus pontos isoeléctricos. É uma técnica desenvolvida a partir da cromatografia de troca iónica em que se gera um gradiente de pH no permutador iónico. Na figura 4, admitimos, como exemplo, uma amostra contendo duas proteínas, a A (com ponto isoeléctrico de 7.0) e a B (com ponto isoeléctrico de 8.0) que é aplicada a um meio de cromatografia que equilibrado a pH 9 toma carga positiva (I). A amostra é aplicada à coluna em suspensão numa solução tamponada a pH 6.0 a qual vai gerar ao longo da coluna um gradiente de pH contínuo (II e III). As proteínas A e B que a pH 6.0 têm carga positiva serão fixadas pelo meio em pontos diferentes da coluna, correspondentes aos níveis em que o pH do meio se mantém acima dos seus pontos isoeléctricos, respectivamente, 7.0 e 8.0. À medida que o tampão pH 6.0, contendo as duas proteínas vai correndo, o pH desta vai decrescendo gradual e continuamente de cima para baixo, baixando, conseqüentemente, o nível de fixação de uma e outra (sempre que o pH desce abaixo do respectivo ponto isoeléctrico, a proteína ao tomar carga positiva, liberta-se do meio, deslocando-se até um nível mais inferior, onde sendo o pH superior ao seu ponto isoeléctrico, toma carga negativa e, como tal, liga-se ao permutador aniónico usado). Ambas as proteínas migram de forma continua ao longo da coluna mas, visto terem pontos isoeléctricos diferentes, deslocam-se com um desfasamento tal que a eluição de uma se faz primeiro que a da outra, permitindo assim a sua separação.

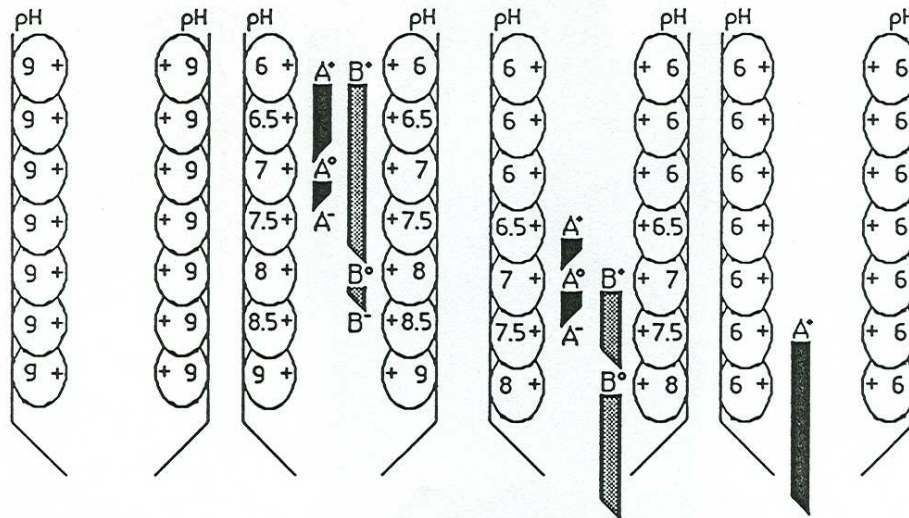


FIGURA 4

Esquema da realização de uma cromatofocagem.

Este método alia a elevada resolução das separações baseadas em diferenças de pontos isoelétricos, à grande capacidade das cromatografias de troca iónica.

ELECTROFORESE DE ZONA

A electroforese de zona é aquela em que a amostra é aplicada sobre uma fase sólida, a qual pode ser composta por papel, acetato de celulose, gel de amido, gel de poliacrilamida. No caso das proteínas, são os geis, principalmente os de poliacrilamida, os meios que dão melhores resoluções.

A separação electroforética em gel de poliacrilamida tem como base as diferenças de mobilidade das proteínas quando sujeitas a um campo eléctrico, o que depende da carga e dimensões das respectivas moléculas, havendo também a considerar um efeito de filtração molecular através dos poros do gel (no caso da poliacrilamida, e ao contrário do gel de amido, as dimensões desses poros podem ser seleccionadas e são perfeitamente reproduzíveis).

Num processo de purificação, a electroforese em gel de poliacrilamida surge habitualmente como teste analítico para determinar a pureza de uma amostra após outros processos de separação ou para avaliar características físicas, químicas ou biológicas de uma proteína purificada. No entanto, pode também ser usada como técnica preparativa, ou seja, visando a

obtenção de um purificado de proteína para posterior caracterização e estudo. Com este objectivo, só é aplicável a misturas simples de proteínas. Misturas mais complexas terão que ser primeiramente transformadas em misturas simples por outros processos de purificação, nomeadamente cromatográficos. Para a preparação de grandes quantidades de uma só proteína, é conveniente o uso de um aparelho próprio de electroforese em gel de poliacrilamida que permite a recolha das várias bandas proteicas à medida que são eluídas pela base de uma coluna contendo o gel. Se se pretende obter apenas quantidades inferiores a 1mg, poder-se-á fazer a excisão da zona do gel onde se encontra a banda proteica em causa, procedendo-se seguidamente à eluição da proteína. A eluição poderá ser feita por solubilização do gel (tecnicamente mais simples mas com a desvantagem de se poder lesar a estrutura proteica e de se contaminar a amostra com moléculas de poliacrilamida de cadeia longa), por difusão (os fragmentos do gel contendo a banda que nos interessa são macerados para aumentar a área de superfície, sendo depois adicionado um tampão adequado numa proporção volumétrica de cerca de 3:1 em relação ao gel) ou por electroforese, induzindo a migração da proteína para fora da zona do gel.

FOCAGEM ISOELÉCTRICA

A técnica consiste basicamente numa electroforese em gel de poliacrilamida no qual se criou previamente um gradiente de pH. As proteínas, sujeitas a um campo eléctrico, movem-se até às zonas do gel onde o pH corresponde aos seus pontos isoeléctricos, aí se immobilizando pois possuindo, então, cargas moleculares iguais a zero, não são atraídas nem para o ânodo nem para o cátodo.

Permite determinar o ponto isoeléctrico de uma proteína e, com esse objectivo, usa-se frequentemente antecedendo uma cromatofocagem quando não é conhecido o ponto isoeléctrico da proteína que se pretende separar. As restantes aplicações, como parte de uma estratégia de purificação, são sobreponíveis às da electroforese em gel de poliacrilamida.

CONCLUSÃO

Na figura seguinte, apresenta-se esquematicamente o modo como as várias técnicas de separação proteica se podem articular entre si. Usam-se inicialmente técnicas com maiores capacidades, com efeito de concentração da amostra mas com menor especificidade, recorrendo-se, nas fases subsequentes, a técnicas potencialmente mais selectivas para a proteína que se pretende purificar.

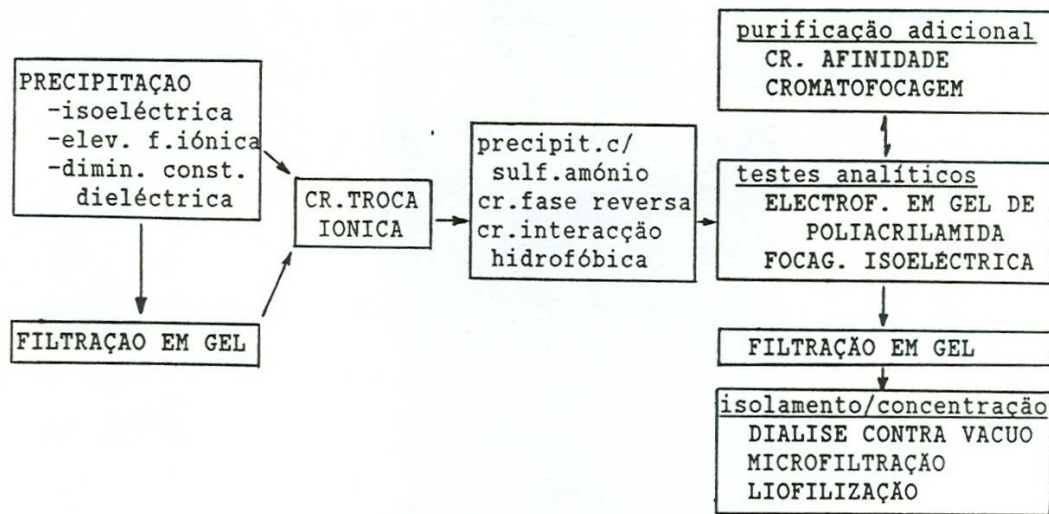


FIGURA 5

Aplicação sequencial de várias técnicas de purificação proteica (adaptado de “Ion Exchange Chromatography”, Pharmacia Fine Chemicals).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Boyer R – “Modern Experimental Biochemistry”, Addison-Wesley Publishing Company, Reading, Massachusetts, 1986.
- Walker JM – “Methods in Molecular Biology. I – proteins”, Humana Press, 1984.
- Fischer L – “Gel Filtration Chromatography”, Elsevier, 1980.
- “Gel filtration – theory and practice”, Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, 1980.
- “Ion Exchange Chromatography – principles and methods”, Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, 1987.
- Dean PDG (editor), “Affinity Chromatography – a practical approach”, Academic Press, 1982.
- “Affinity Chromatography – principles and methods”, Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, 1986.
- “Chromatofocusing”, Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, 1981.
- Andrews AT – “Electrophoresis – theory, techniques and biochemical and clinical applications. Clarendon Press, 1986.
- “Polyacrylamide Gel Electrophoresis – laboratory techniques”, Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, 1983.
- Fallon A – “Applications of HPLC in Biochemistry”, Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford, 1987.

TRANSPORTE IÓNICO NO ERITROCITO; IMPORTÂNCIA FISIOLÓGICA DO PERMUTADOR Na^+/H^+

M. Manuela Nunes²

Tem sido demonstrado o papel desempenhado pelos aniões em processos de transporte transmembrana que envolvem mecanismos específicos de troca com aniões e, cotransporte anião-catião.

O transporte rápido de aniões é uma função especializada da membrana do glóbulo vermelho (G.V.), permitindo que este desempenhe um importante papel fisiológico, facilitando a remoção de CO_2 dos tecidos e a sua libertação nos alvéolos.

O CO_2 formado nos tecidos difunde rapidamente para dentro dos glóbulos vermelhos, aonde é convertido em H^+ e HCO_3^- pela anidrase carbónica (Fig. 1).

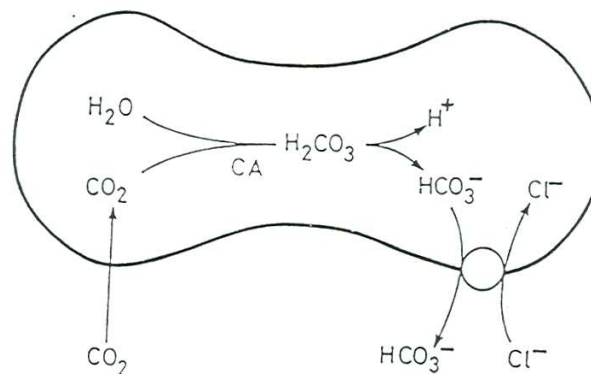


FIGURA 1

Difusão do CO_2 através da membrana eritrocitária. O HCO_3^- formado é trocado com Cl^- extracelular. CA (anidrase carbónica), (adaptado de SB Hladky, TJ Rink, 1977).

¹ Apresentação em sessão científica interna de 16/Maio/1988

² Assistente estagiária do Instituto de Bioquímica, FML

Palavras-chave: eritrócito, mecanismos de transporta iónico

Os prótons são tamponados pela hemoglobina, enquanto o HCO_3^- celular é permutado por Cl^- plasmático permitindo, deste modo, um aumento da capacidade de transporte de CO_2 (Fig. 1). Nos capilares pulmonares ocorre o processo inverso; o HCO_3^- plasmático entra no G.V. por troca com Cl^- intracelular; no eritrócito forma-se ácido carbónico que é desidratado, formando-se CO_2 que difunde para o espaço alveolar. A entrada e saída de HCO_3^- é extremamente rápida e só é possível se a membrana de G.V. for livremente permeável aos iões.

Este processo envolve custo energético, para compensar a acumulação de iões e água causada pela elevada concentração de hemoglobina evitando que ocorra inchamento e lise do G.V.. O sistema é mantido simultaneamente, por uma baixa permeabilidade iónica e por um movimento rápido de aniões. Para isso, a membrana do G.V. além de apresentar baixa permeabilidade para os catiões dispõe de um sistema especializado para uma permuta rápida de aniões.

Um desses transportadores é uma proteína intrínseca de 95KDa, conhecida como banda 3, a qual sendo um mediador rápido do transporte aniónico, maximiza essa taxa, associando o efluxo de um anião ao influxo de outro. Este sistema é altamente selectivo. O Cl^- é transportado um Milhão de vezes mais rapidamente do que um catião com a mesma dimensão.

A elevada selectividade não se refere à afinidade dos diferentes iões para o local de transporte, mas essencialmente à taxa de translocação dos aniões através da membrana. Estas translocações aniónicas envolvem provavelmente alterações conformacionais na molécula da banda 3, tornando acessível o local de transporte de um e outro lado da membrana.

A tendência para a acidificação do meio eritrocitário por fluxos passivos de H^+ e HCO_3^- e pela produção ácida metabólica deve ser contrariada por mecanismo regulador de extrusão ácida.

A observação de que o transporte de aniões pode ser inibido por inibidores específicos e em alguns casos requerer ATP, faz sugerir que a regulação depende de processos de transporte funcionalmente acoplados.

A regulação do pH intra-eritrocitário (pHi) passa por reacções que envolvem o influxo de Na^+ em sistema de cotransporte Na^+/Cl^- ou $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$ (Figs. 2A e 2B).

É possível induzir uma extrusão ácida aparentemente activa, numa situação em que HCO_3^- e H^+ , em contraste com iões Na^+ e Cl^- , estão inicialmente em equilíbrio electroquímico.

O permutador de Na^+/H^+ troca H^+ intracelular por Na^+ extracelular, enquanto a razão $\text{Na}^+_{\text{o}}/\text{H}^+_{\text{o}}$ é maior do que $\text{Na}^+_{\text{i}}/\text{H}^+_{\text{i}}$. Assumindo que o sistema simétrico e considerando que Na^+_{o} é aproximadamente 140 mM e Na^+_{i} é aproximadamente 14 mM a troca pode aumentar o pH_{i} acima do pH_{o} .

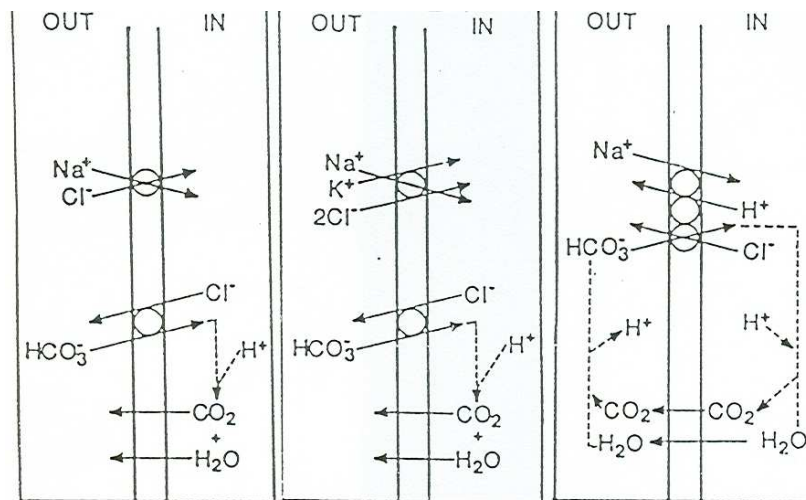


FIGURA 2

Tipos de fluxos iônicos envolvidos na regulação do pH intraeritrocitário (adaptado de Else K Hoffman, 1986).

A energia necessária para a manutenção do pH_{i} é indirectamente proveniente da bomba de Na^+ e é mantida sob a forma de gradiente químico de Na^+ . Este mecanismo não permite que o sistema atinja o equilíbrio termodinâmico, situação que poderia alcalinizar excessivamente o citoplasma. Verifica-se que um aumento do transporte de Cl^- para o interior do eritrócito pode ser energizado por diminuição da troca do ião bicarbonato se a razão $\text{HCO}_3^-_{\text{i}}/\text{HCO}_3^-_{\text{o}}$ for maior do que a razão $\text{Cl}^-_{\text{i}}/\text{Cl}^-_{\text{o}}$.

O gradiente de bicarbonato pode ser mantido por hidratação intracelular de CO_2 . A formação de ião bicarbonato requer que a formação simultânea de prótons seja removida por um transporte activo primário ou por um sistema de contratransporte, trocando H^+ intracelular por Na^+ extracelular. Os dados indicam que a acção do permutador de Na^+/H^+ é activada pelo menos por uma de duas vias: uma dependente de Ca^{2+} e a outra sensível à razão $\text{H}^+_{\text{i}}/\text{H}^+_{\text{o}}$. O papel directo do H^+ na activação do permutador é sugerido pela evidência de que o transporte de Na^+ , sensível ao amiloride, é activado em células enriquecidas em ATP, as quais apresentam um $\text{pH}_{\text{celular}}$ mais baixo (6.9). Além disso, este fluxo de Na^+ é largamente inibido quando o pH_{i} passa de 6.9 para 7.2.

A regulação do volume eritrocitário faz-se de um modo dinâmico e por trocas controladas, entre o meio interno e externo, que envolvem uma estimulação transitória de locais de passagem transmembrana geralmente “adormecidos”. Estas passagens são constituídas por um número diverso de sistemas de transporte. Estudos realizados revelam uma inter-relação entre a regulação de volume e do pH intra-eritrocitário.

Os sistemas de transporte iónico, descrito como implicados na regulação do pH, ao influenciarem o equilíbrio osmótico induzem entradas e saídas de água que provocarão alterações do volume eritrocitário (Fig. 3).

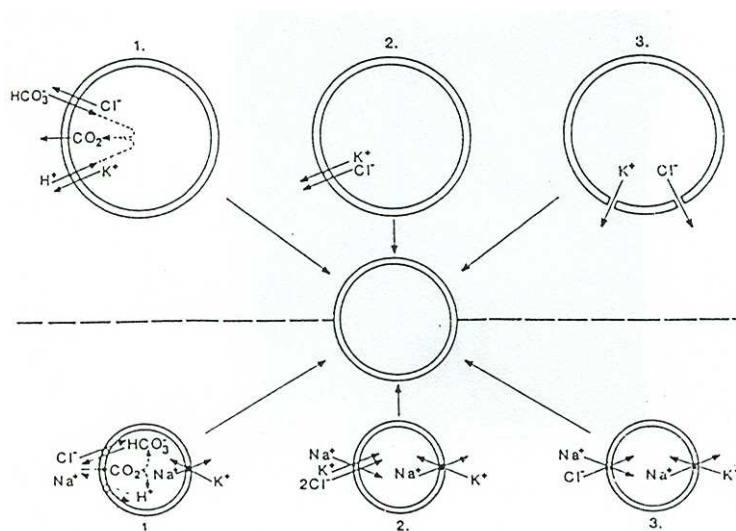


FIGURA 3

Tipos de fluxos iónicos implicados na regulação de volume eritrocitário (adaptado de Else K Hoffman, 1986).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Hoffman EK – “Anion Transport Systems in the Plasma Membrane of Vertebrate Cells”, *Biochem Biophys Acta* 1986; 864:1-31.
- Hladky SB, Rink TJ – pH equilibrium across the red cell membrane. In: “Membrane Transport in Red Blood Cell”, (JC Ellory and VL Lew), Academic Press, New York, 1977, pp
- George Fortes PA – Anion movements in red blood cells. In: “Membrane Transport in Red Blood Cell”, (JC Ellory and VL Lew), Academic Press, New York, 1977, pp
- Knauf PA – The relationship between anion exchange and net anion flow across the human red blood cell membrane. *The J Gen Physiol* 1977; 69:363.

REGULAÇÃO DO CÁLCIO INTRACELULAR¹

Yolanda Pinto²

A manutenção da concentração intracelular de cálcio requer um transporte activo constante de cálcio para o exterior. Nas membranas plasmáticas dos eucariotas existem três tipos de sistemas transportadores de cálcio:

- Canal de cálcio que medeia a importação do cálcio.
- Ca^{2+} -ATPase que medeia a exportação de cálcio.
- Permutador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ que normalmente funciona na direcção de exportação, mas também pode mediar o influxo de cálcio, particularmente em tecidos excitáveis (exemplo: coração).

Estes sistemas ainda podem ser considerados de dois tipos, os de elevada afinidade para o cálcio e os de baixa afinidade, correspondendo respectivamente às ATPases e a canais, uniportes e permutadores.

As Ca^{2+} -ATPases das membranas plasmáticas de diferentes células apresentam propriedades em comum para além de hidrolisarem o ATP e estarem associadas ao transporte de cálcio, nomeadamente:

- Regulação directa pelo complexo Ca^{2+} -calmodulina.
- Activação pelo Mg^{2+} , além do Ca^{2+} .
- Peso molecular de aproximadamente 140 Kdal.
- Formação de um complexo intermediário fosforilado dependente de cálcio.

A (Ca^{2+} - Mg^{2+})-ATPase eritrocitária é uma proteína intrínseca da membrana consistindo numa única cadeia polipeptídica de peso molecular aproximadamente de 138 Kdal. A sua descoberta já data de 1966 (Schatzmann). Foi caracterizada como ATPase do tipo P; podendo ser também chamada (E_1 - E_2) dado existir em dois estados conformacionais diferentes (E_1 e E_2) em momentos

¹ Apresentação em sessão científica interna de 23/Maio/ e 27/Junho/1988

² Assistente estagiária do Instituto de Bioquímica, FML

Palavras-chave: ATPases, cálcio, eritrócito, transporte transmembranar

diferentes do mecanismo de reacção, e conservar a energia do ATP intramolecularmente na forma de um acil-fosfato, mais propriamente um aspartil-fosfato.

O passo da reacção das ATPases tipo P é caracterizado pelo complexo intermediário fosforilado da enzima, formado quando o fosfato γ do ATP reage com um único resíduo de ácido aspártico (Fig. 1). Estas ATPases são inibidas pelo vanadato e estruturalmente consistem todas num péptido (α) de 70-100 Kdal, o qual contém os centros de ligação do ATP e de fosforilação.

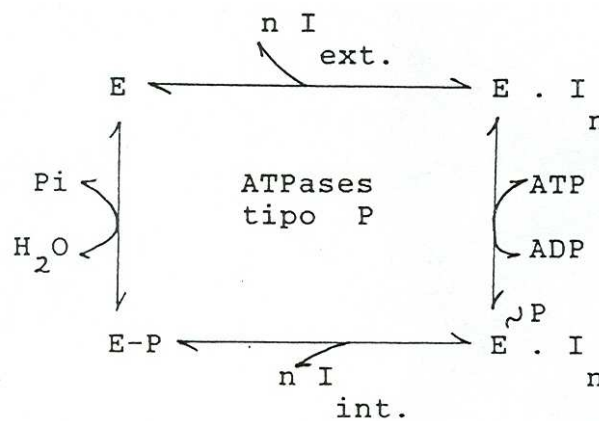


FIGURA 1

Mecanismo de reacção simplificado para ATPases do tipo P. I refere-se ao ião transportado e n o número de iões. (Esquema adaptado de Pedersen e Carafoli, 1987).

A $(Ca^{2+}-Mg^{2+})$ -ATPase mostra assimetria, característica da membrana: o Ca^{2+} só activa se estiver presente na superfície da membrana interna; o ATP só tem acesso ao sistema do lado interno da célula e o fosfato inorgânico é libertado na superfície da membrana interna.

Vários esquemas têm sido propostos para a reacção cíclica da $(Ca^{2+}-Mg^{2+})$ -ATPase eritrocitária. De um modo geral, todos postulam que a enzima (a) existe em dois estados interconversíveis (um com elevada e outro com baixa afinidade para o cálcio, respectivamente designados por E_1 e E_2) e que (b) forma um intermediário fosforilado (aspartil-fosfato) durante o ciclo da reacção.

A reacção cíclica da bomba de cálcio ocorre via formação e quebra de complexos intermediários fosforilados (Fig. 2). O estado enzimático com elevada afinidade para o cálcio (E_1) liga-se ao Ca^{2+} na superfície da membrana citosólica, promovendo reacção com o ATP e formação do complexo intermediário ($E_1.P.Ca$). A transição conformacional desta forma, na de menor energia ($E_2.P.Ca$) resulta numa diminuição da afinidade do(s) centro(s) activo(s) para o Ca^{2+} e

reorientação do(s) centro(s) para a superfície externa da membrana eritrocitária. Esta variação conformacional é estimulada pelo Mg^{2+} (estes iões também são necessários para a hidrólise do ATP e transporte de Ca^{2+}). A translocação de Ca^{2+} deverá resultar do deslocamento de Ca^{2+} deste estado de baixa afinidade produzindo $E_2.P$.

Os processos, quer moleculares quer químicos, pelos quais a hidrólise do ATP está associada ao transporte de Ca^{2+} através da membrana eritrocitária ainda não estão completamente elucidados.

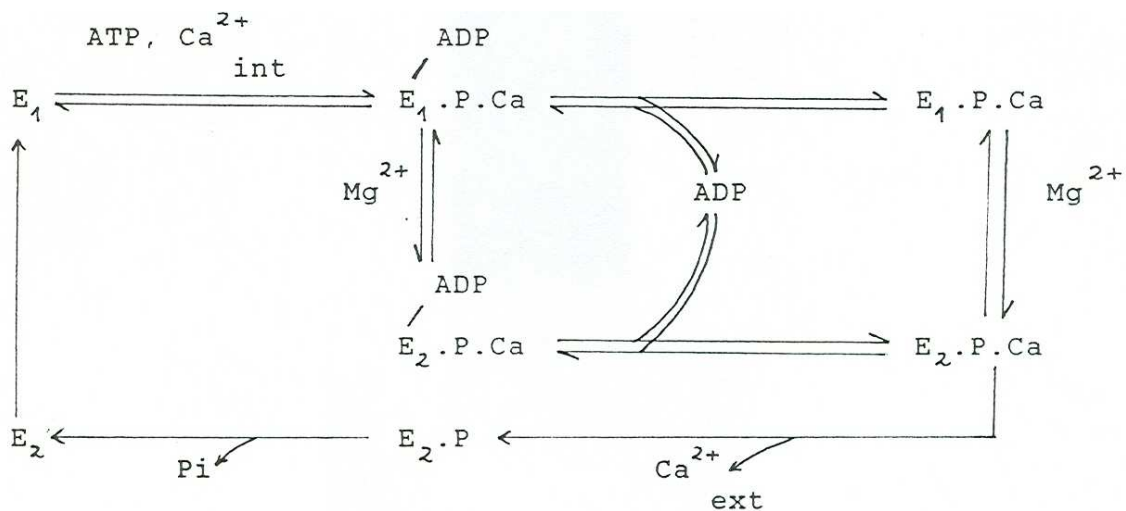


FIGURA 2

Representação esquemática da bomba de cálcio eritrocitária (adaptado de Cavieres, 1987).

Também não está completamente esclarecido se o transporte activo de cálcio nos eritrócitos é electrogénico ou electroneutro.

A $(Ca^{2+}-Mg^{2+})$ -ATPase mostra dependência bifásica para o ATP. Para baixas concentrações, o ATP é utilizado como substrato; liga-se a centros de elevada afinidade ($K_m = 1-3 \mu M$), fosforila a enzima e fornece a energia necessária para o transporte de cálcio através da membrana. Para elevadas concentrações, o ATP actua como regulador da actividade da enzima. Este efeito traduz-se por um aumento da actividade da enzima e é promovido mediante ligação do ATP a centros de baixa afinidade ($K_m \geq 100 \mu M$). Estudos recentes de Villalobo e col (1986) sugeriram que os centros de elevada e baixa afinidade para o ATP podem estar localizados em estados conformacionais diferentes (E_1 e E_2) da enzima, o que poderá explicar a dependência da cinética bifásica do ATP.

Tem sido intensamente investigada a associação entre o transporte activo de cálcio (Ca^{2+} transportado) e a actividade da $(\text{Ca}^{2+}\text{-Mg}^{2+})\text{-ATPase}$ eritrocitária (ATP hidrolisado), assim como a determinação do quociente molar entre o Ca^{2+} transportado e o ATP hidrolisado. Os resultados obtidos têm sido bastante controversos: alguns investigadores obtêm um quociente $\text{Ca}^{2+}/\text{ATP}$ de 2:1; outros de 1:1 e ainda outros dizem que esse quociente é dependente da concentração de cálcio.

A $(\text{Ca}^{2+}\text{-Mg}^{2+})\text{-ATPase}$ é activada pelo complexo $\text{Ca}^{2+}\text{-calmodulina}$, ou na sua ausência, por fosfolípidos acídicos, ácidos gordos poli-insaturados de cadeia longa, polifosfoinosítois e por proteólise controlada na presença de tripsina ou quimotripsina (Fig. 3).

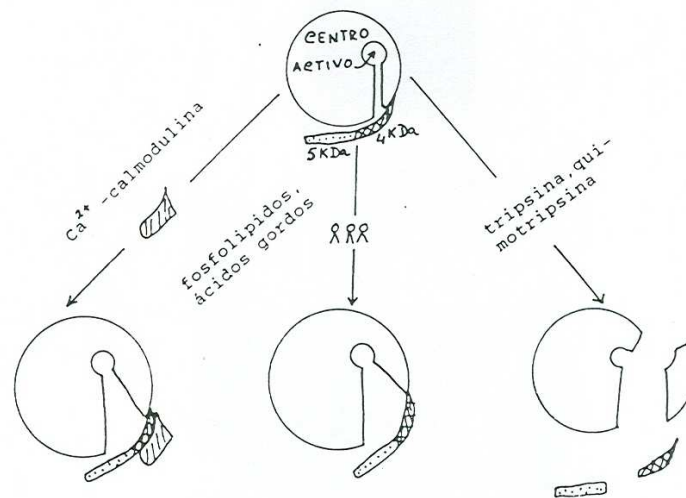
A estimulação da actividade da enzima (induzida quer pela calmodulina, fosfolípidos acídicos ou por proteólise controlada) é traduzida pelo aumento da afinidade da enzima (o valor de K_m diminuído 20 μM para 0,5 μM) e do aumento da velocidade máxima da enzima, mas os mecanismos de estimulação são diferentes.

Em relação à calmodulina ainda não é bem conhecido o mecanismo, ou seja, não se sabe se a estimulação da actividade da enzima é induzida por efeito directo nos centros de ligação com elevada afinidade para o Ca^{2+} e/ou por efeito directo no mecanismo de reacção da enzima. O modelo mais recente da interacção da $(\text{Ca}^{2+}\text{-Mg}^{2+})\text{-ATPase}$ – calmodulina propõe que o acesso ao centro activo da enzima é bloqueado pelo centro que interage com a calmodulina; a ligação da calmodulina a este centro induz-lhe uma alteração conformacional que irá facilitar o acesso ao centro activo da enzima (Fig. 3).

Além da calmodulina, têm sido propostas outras proteínas activadoras e inibidoras como participantes na regulação da actividade da $(\text{Ca}^{2+}\text{-Mg}^{2+})\text{-ATPase}$ eritrocitária. O mecanismo pelo qual os fosfolípidos acídicos estimulam a actividade da enzima ainda não é bem conhecido, tem sido sugerido que induzem uma alteração conformacional na molécula da ATPase, que facilita o acesso ao centro activo da enzima (Fig. 3). Apesar da estimulação da $(\text{Ca}^{2+}\text{-Mg}^{2+})\text{-ATPase}$ pela calmodulina e pelos fosfolípidos acídicos ser traduzido de modo idêntico, a sua acção não o é. O aumento da afinidade da enzima para o Ca^{2+} induzida pelos fosfolípidos é superior ao induzido pela calmodulina; a activação pela calmodulina está fortemente dependente da concentração de Ca^{2+} livre e tem o seu efeito máximo para concentrações de Ca^{2+} (que variam de 0,5-1,2 μM), enquanto a activação da enzima pelos fosfolípidos acídicos não requer Ca^{2+} e tem o seu efeito máximo para concentrações de Ca^{2+} livre da ordem dos 0,1 μM . Além disto, a activação da enzima pelo Ca^{2+} exhibe cooperatividade positiva na presença da calmodulina, enquanto que na

presença de fosfolípidos acídicos a activação da enzima pelo Ca^{2+} não exhibe cooperatividade. Por último, o centro regulador da molécula de ATPase, responsável pela activação da enzima pela calmodulina, é independente e distinto do centro regulador responsável pela activação da enzima pelos fosfolípidos acídicos.

ATPase não estimulada (baixa afinidade para o Ca^{2+})



ATPase estimulada (elevada afinidade para o Ca^{2+})

FIGURA 3

Representação esquemática do mecanismo de activação da $(\text{Ca}^{2+}\text{-Mg}^{2+})\text{-ATPase}$ eritrocitária pela calmodulina, fosfolípidos acídicos e proteólise controlada (adaptado de Carafoli, 1984).

O mecanismo de estimulação da enzima, no caso da proteólise controlada, é diferente; a activação é promovida pela clivagem de fragmentos da molécula da enzima que bloqueiam o centro activo da enzima (Fig. 3).

Estudos recentes de proteólise controlada da $(\text{Ca}^{2+}\text{-Mg}^{2+})\text{-ATPase}$ purificada mostram que a molécula pode ser clivada num grande número de fragmentos transitórios, de peso molecular compreendidos entre 90 e 28 KDa, cuja sequência pode ser observada na Fig. 4.

Estudos realizados com cada um dos fragmentos transitórios obtidos mostraram que os fragmentos com:

- 90, 85, 81 e 76 KDa contêm actividade ATPásica, formam um intermediário fosforilado acil-fosfato e transportam Ca^{2+} activamente quando reconstituídos em lipossomas.
- 48 KDa poderão formar um intermediário fosforilado quando incubado com Ca^{2+} e ATP mas desconhece-se se transporta Ca^{2+} .
- 90 KDa têm propriedades praticamente indistinguíveis da ATPase intacta, isto é, ligam calmodulina e respondem a esta com aumento da actividade ATPásica e de transporte de Ca^{2+} .
- 85 KDa ligam calmodulina mas não respondem à mesma, enquanto os que possuem 81 e 76 KDa não ligam calmodulina. O fragmento de 76 Kda contém o centro activo da molécula.

A proteólise na presença de diferentes efectores tem permitido localizar o domínio da enzima que interactua com a calmodulina na sequência periférica de 9 KDa. Tal sequência consiste num subdomínio de 4 KDa, que contém o centro de ligação da calmodulina a outro, com 5 KDa, que não liga calmodulina mas que é essencial para o seu efeito de estimulação (Fig. 3).

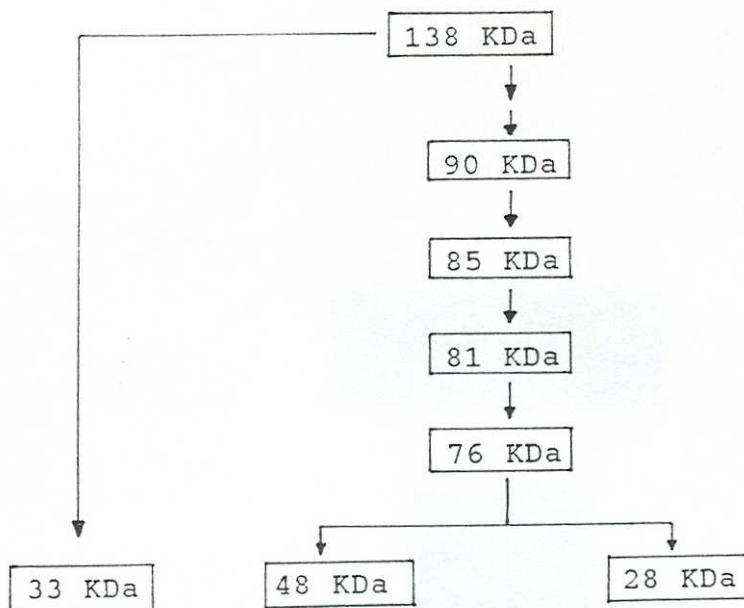


FIGURA 4

Proteólise de $(\text{Ca}^{2+}\text{-Mg}^{2+})\text{-ATPase}$ purificada da membrana eritrocitária por acção da tripsina (modelo proposto por Carofoli e Longoni, 1987).

O tratamento com a tripsina remove imediatamente um polipéptido de 33 KDa. Este liga marcadores hidrofóbicos melhor do que cada um dos outros fragmentos da molécula e contém, presumivelmente, o(s) segmento(s) mais hidrofóbico(s) daquela. Dado que este fragmento não está envolvido na reacção de transporte de Ca^{2+} através da membrana, é possível que a sua função seja a de “ancorar” a molécula da ATPase à membrana, sem contribuir propriamente para o canal de Ca^{2+} . Este canal deverá ser formado por hélices transmembranares. Integrando esta informação, Carafoli e Longoni (1987) propuseram um modelo para a topografia funcional da $(\text{Ca}^{2+}-\text{Mg}^{2+})$ -ATPase eritrocitária (Fig. 5).

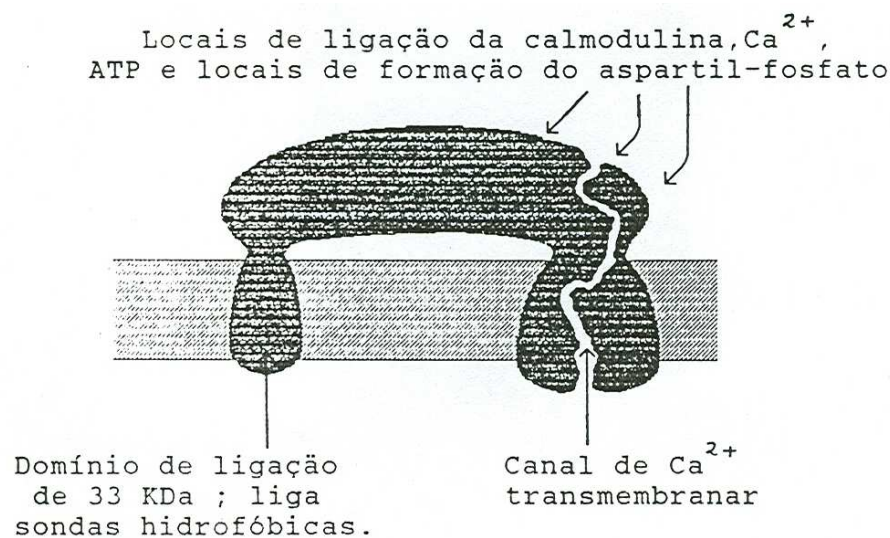


FIGURA 5

Modelo da topografia funcional da $(\text{Ca}^{2+}-\text{Mg}^{2+})$ -ATPase eritrocitária (modelo proposto por Carafoli e Longoni, 1987).

A $(\text{Ca}^{2+}-\text{Mg}^{2+})$ -ATPase representa apenas uma fracção mínima da proteína total da membrana (cerca de 0,1%). A purificação da ATPase tem sido difícil, dado a sua labilidade, a sua baixa concentração na membrana e ainda pelo facto da ATPase ter peso molecular e propriedades de solubilização idênticas à da banda 3, um dos componentes mais abundantes da membrana eritrocitária. A enzima pode ser solubilizada por detergentes tais como o Triton X-100 e o desoxicolato.

A interacção entre a ATPase e a calmodulina tem permitido o isolamento da enzima por cromatografia de afinidade. Esse processo envolve eluição da coluna, Sepharose 4B activada por calmodulina, com EGTA ou EDTA na presença de detergentes (o mais conveniente parece ser o Triton X-100) e de fosfolípidos (para a manter num estado activo).

A enzima é muito instável, tendo um período de semi-vida de cerca de 1-2 dias a 0°C. Contudo, a adição de Ca^{2+} e calmodulina numa concentração final de 50 $\mu\text{g/ml}$ de calmodulina aumenta o tempo de semi-vida para cerca de uma semana. As preparações obtidas caracterizam-se por elevada percentagem de impurezas, mas têm permitido a reconstituição da actividade da ATPase e o transporte de Ca^{2+} em sistemas lipossómicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Allen BG, Katz S, Roufogalis BD – Effects of Ca^{2+} , Mg^{2+} and calmodulin on the formation and decomposition of the phosphorylated intermediate of the erythrocyte Ca^{2+} -stimulated ATPase. *Biochem J* 1987; 244:617.
- Carafoli E – Calmodulin-sensitive calcium-pumping ATPases of plasma membranes: isolation, reconstitution and regulation. *Fed Proc* 1984; 43:3005.
- Carafoli E – Intracellular calcium homeostasis. *Ann Rev Biochem* 1987; 56:395.
- Carafoli E, Longoni S – The plasma membrane in the control of the signalling function of calcium. In: *Cell Calcium and the Control of Membrane Transport*, vol. 42, LJ Mandel, DC Eaton (eds), The Rockefeller University Press, New York 1987, pp 21.
- Cavieres JD – Fast reversal of the initial reaction steps of the plasma membrane ($\text{Ca}^{2+}+\text{Mg}^{2+}$)-ATPase. *Biochem Biophys Acta* 1987; 899:83.
- Downes P, Michell RH – Human erythrocyte membranes exhibit a cooperative calmodulin-dependent $\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}$ of high calcium sensitivity. *Nature* 1981; 290:270.
- Enyedi A, Flura M, Sarkadi B, Gardos G, Carafoli E – The maximal velocity and the calcium affinity of the red cell calcium pump may be regulated independently. *J Biol Chem* 1987; 262(13):6425.
- Inesi G – Mechanism of calcium transport. *Ann Rev Physiol* 198; 47:573.
- Niggli V, Penniston JT, Carafoli E – Purification of the ($\text{Ca}^{2+}+\text{Mg}^{2+}$)-ATPase from human erythrocyte membranes using a calmodulin affinity column. *J Biol Chem* 1979; 254(20):9955.
- Niggli V, Adunyah ES, Penniston JT, Carafoli E – Purified ($\text{Ca}^{2+}+\text{Mg}^{2+}$)-ATPase of the erythrocyte membrane. Reconstitution and effect of calmodulin and phospholipids. *J Biol Chem* 1981; 256(1):395.
- Pedersen PL, Carafoli E – Ion motive ATPases. I. Ubiquity, properties, and significance to cell function. *TIBS* 1987; 12:146.
- Schatzmann HJ – ATP-dependent Ca^{2+} extrusion from human red cells. *Experientia* 1966; 22:364.
- Stieger J, Lutterbacher S – Some properties of the purified ($\text{Ca}^{2+}+\text{Mg}^{2+}$)-ATPase from human red cell membranes. *Biochem Biophys Acta* 1981; 641:270.
- Villalobo A, Brown L, Roufogalis BD – Kinetic properties of the purified Ca^{2+} -translocating ATPase from human erythrocyte plasma membrane. *Biochem Biophys Acta* 1986; 854:9.

- Zurini M, Krebs J, Penniston JT, carafoli E – Controlled proteolysis of the purified Ca^{2+} -ATPase of the erythrocyte membrane. A correlation between the structure and the function of the enzyme. J Biol Chem 1984; 259(1):618.

ALTERAÇÕES NO 2,3-DPG (2,3-DIFOSFOGLICERATO) EM SANGUE ARMAZENADO COM IMPLICAÇÕES NA DEFORMABILIDADE ERITROCITÁRIA¹

M. Manuela Nunes²

Tem sido amplamente demonstrada a existência de interações moleculares entre a hemoglobina (Hb) e os constituintes da membrana do glóbulo vermelho (G.V.).

A Hb, ao interferir nas estruturas proteicas da membrana por meio de ligações de fraca afinidade desempenha em condições fisiológicas funções reguladoras na dinâmica daquelas estruturas.

Foi posta em evidência (Fung, 1981), por meio de ressonância magnética electrónica, a interacção Hb-membrana que se estabelece a pH fisiológico. Esta interacção depende de concentrações de hemoglobina entre 0-12 mg/ml; à concentração de 4 mg/dl corresponde uma semi-saturação dos locais de ligação, entre pH 7,4 e 8. O equilíbrio de dissociação é da ordem 10^{-4} M, mas diminui significativamente com a baixa do pH, significando que a interacção aumenta quando o pH diminui.

Em 1982, Elsinger e Cols demonstraram a associação da hemoglobina com a membrana eritrocitária intacta, bem como, sítios de interacção entre a hemoglobina e uma proteína de membrana, a banda 3.

A mobilidade da molécula de hemoglobina está fortemente diminuída por ligação às proteínas da membrana. Mas não é influenciada por extracção do citoesqueleto. Como consequência desta interacção, a fixação da hemoglobina pode modificar as características físicas da membrana e interferir com a deformabilidade globular.

¹ Apresentação em sessão científica interna de 20/Junho/1988

² Assistente estagiária do Instituto de Bioquímica, FML

Palavras-chave: 2,3-DPG, citoesqueleto, deformabilidade, hemoglobina

Embora a hemoglobina não pareça ligada ao citoesqueleto, em condições fisiológicas apresenta uma associação dímero-dímero com a espectrina, podendo deste modo contribuir para o equilíbrio do citoesqueleto.

A espectrina e a hemoglobina fixam ambas o 2,3-DPG; a fracção da Hb mais próxima da espectrina entra em competição com esta para fixar o 2,3-DPG. Logo que a fracção da Hb está sob a forma de oxihemoglobina, o 2,3-DPG fixa-se à espectrina mas, após a libertação de O₂, a desoxihemoglobina retira o 2,3-DPG ligado à espectrina por um processo de translocação entre as duas proteínas. Se bem que esta translocação não interfira na afinidade da hemoglobina para o oxigénio, o 2,3-DPG, assim como outros polifosfatos, pode modular interacções moleculares das proteínas do citoesqueleto.

Nos eritrócitos humanos, tem sido demonstrada a importância do citoesqueleto no controlo e distribuição lateral das glicoproteínas. Do mesmo modo, a mobilidade lateral das glicoproteínas no eritrócito é inibida por componentes do citoesqueleto.

A mobilidade lateral de algumas proteínas integrais da membrana está aumentada em “ghosts” de eritrócitos com níveis elevados de 2,3-DPG e ATP.

A adição de polifosfatos (tais como ATP, 2,3-DPG, GTP e inositol-hexafosfato) a células com depleção destes compostos, provoca o aumento do coeficiente de difusão e da mobilidade das glicoproteínas. O aumento da mobilidade das proteínas integrais pode ser provocado por diminuição na estabilidade do citoesqueleto.

O 2,3-DPG, ao interferir com o citoesqueleto, pode afectar significativamente a funcionalidade mecânica da membrana.

Parâmetros que definem e caracterizam o comportamento mecânico da membrana foram avaliados em G.V. intactos e em “ghosts”, para se poder inferir dos efeitos da concentração do 2,3-DPG. Porém, os efeitos da concentração de 2,3-DPG nos eritrócitos intactos não são semelhantes aos encontrados para os “ghosts”, pelo que não é possível extrapolar resultados de um sistema membrana para o outro.

Alterações da deformabilidade da membrana em G.V. intactos, a baixa concentração salina, sugerem o efeito cooperativo de concentrações elevadas de 2,3-DPG, sob baixa força iónica, nas propriedades da membrana.

Não é perfeitamente conhecido o mecanismo pelo qual a concentração de 2,3-DPG regula interações entre a membrana e elementos do citoesqueleto.

Durante o armazenamento do sangue a 4°C há diminuição da concentração de ATP e baixa na concentração de 2,3-DPG, pondo em risco a integridade metabólica e funcional do G.V. A depleção do 2,3-DPG e do ATP induzem alterações muito significativas nos G.V., tais como redução da deformabilidade, aumento da fragilidade osmótica e alterações morfológicas (com formação de esferocitos e esquimocitos).

A captação dos G.V. pelo sistema retículo-endotelial passa pela perda de deformabilidade globular.

No sangue armazenado em ACD (ácido-citrato-dextros) ou em CPD (citrato-fosfato-dextose), os níveis de 2,3-DPG decrescem mais rapidamente do que o ATP. A diminuição da concentração de 2,3-DPG pode ser prevenida se ao meio de armazenamento for adicionada inosina. Este nucleósido, sem carga eléctrica, pode atravessar a membrana dos G.V. e converter-se em 2,3-DPG, deste modo impedindo alterações nas propriedades mecânicas intrínsecas das membranas globulares.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Sheetz MP, Casaly J – 2,3-Diphosphoglycerate and ATP dissociate erythrocyte membrane skeletons. *J Biol Chem* 1980; 255:9955.
- Schindler M, Koppel DE, Sheetz MP – Modulation of membrane protein lateral mobility by polyphosphates and polyamines. *Proc Natl Acad Sci* 1980; 77:1457.
- Waugh RE – Effects of 2,3-diphosphoglycerate on the mechanical properties of erythrocyte membrane. *Blood* 1986; 68(1):231.
- Chien S – red cell deformability and its relevance to blood flow. *Ann Rev Physiol* 1987; 49:177.
- Shaklai N, Benitez L, Ranney HM – Binding of 2,3-diphosphoglycerate by spectrin and its effect on oxygen affinity of hemoglobin. *Am J Physiol* 1978; 234(1):C-36.
- Boivin P – Les interactions entre l'hémoglobine et la membrane erythrocytaire. *Nouv Rev Fr Hematol* 1983; 25:75.
- Bunn HF, Ransil BJ, Chao A – The interaction between erythrocyte organic phosphates, magnesium ion and hemoglobin. *J Biol Chem* 1971; 246(17):5273.

- Dawson RB et al – Control of red cell 2,3-DPG levels “in vitro” and a proposal for “in vivo” control in response to hypoxia and metabolic demand. In: Cellular and Molecular Aspects of Aging: The Red Cell as a Model, Alan R Liss, Inc, New York, 1985, pp 349.
- Rose LB – Enzymes controlling 2,3-diphosphoglycerate in human erythrocytes. Fed Proc 1970; 29(3):1105.
- Meiselman HJ, Evans EA, Hochnuth RM – Membrane mechanical properties of ATP-depleted human erythrocytes. Blood 1978; 52(3):499.
- Dawson RB, Edinger MC, Ellis TJ – Hemoglobin function in stored blood. J Lab Clin Med 1971; 77(1):46.
- Haradin AR, Weed RI, Reed CF – Changes in physical properties of stored erythrocytes. Transfusion 1969; 9(5):229.
- Card RT, Mohandas N, Perkins HA, Shohet SB – Deformability of stored red blood cells. Transfusion 1982; 22(2):96.
- La Celle PL – Alteration of deformability of the erythrocyte membrane in stored blood. Transfusion 1969; 9(5):238.

CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUÇÃO (HPLC)¹

Teresa Quintão²

O princípio do processo de separação dos componentes de uma amostra por cromatografia foi utilizado já no início do século XX, para separação de clorofilas, por Tswett. Desde então, inúmeros progressos têm sido feitos neste domínio.

Numerosas substâncias foram já separadas por esta técnica: nucleótidos, nucleósidos e bases nucleotídicas; proteínas, péptidos e aminoácidos, lípidos; hidratos de carbono; prostaglandinas e leucotrienos; esteróides; aminas biogénicas; porfirinas; ácidos biliares; vitaminas; antibióticos e iões.

A técnica de cromatografia líquida de alta resolução (high performance liquid chromatography – HPLC) pode ser aplicada com diversos métodos de cromatografia, como sejam:

- (a) A filtração em gel, que permite a separação por pesos moleculares: moléculas de maior peso molecular migram mais rapidamente, enquanto moléculas mais pequenas, que são mais retidas nos poros da fase estacionárias, são as últimas a ser eluídas.
- (b) A cromatografia de troca iónica, separando as moléculas pela sua carga eléctrica, pode ser realizada com trocadores aniónicos ou catiónicos, consoante a substância que se pretende analisar.
- (c) A cromatofocagem, em que existe um gradiente de pH ao longo da coluna, permite a separação baseada nos diferentes pontos isoeléctricos das substâncias.
- (d) A cromatografia de afinidade, que sendo específica, depende da actividade biológica das moléculas que se pretende separar.
- (e) A cromatografia de fase reversa, baseada na hidrofobicidade característica das moléculas, é o método mais utilizado em HPLC. Caracteriza-se por a fase estacionária ser menos polar do que a fase móvel.

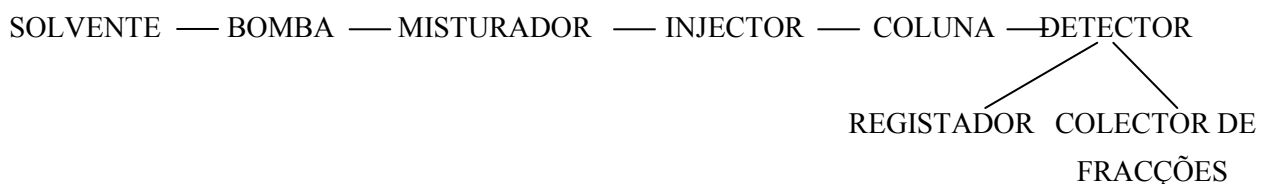
¹ Apresentação em sessão científica interna de 28/Novembro/1988

² Assistente convidada do Instituto de Bioquímica, FML

Palavras-chave: cromatografia líquida de alta resolução

Comparada com outros métodos de cromatografia líquida, a HPLC caracteriza-se por possuir colunas mais pequenas (diâmetro interno entre 2 e 8 mm e comprimento entre 10 e 30 cm), em que as partículas sólidas constituintes da coluna são também mais pequenas (diâmetro médio <50µm) e esféricas; alta pressão no interior do sistema (10-400 atm), aumentando assim a velocidade da fase móvel e contribuindo para a manutenção de um fluxo constante; e uma velocidade linear do fluxo (0.1-5 cm/seg). Consegue-se assim uma melhor separação dos constituintes da amostra estudada.

A cromatografia por HPLC pode utilizar um sistema isocrático, em que a composição do solvente é constante, ou um sistema de gradientes em que a composição do solvente é variável ao longo do tempo. O sistema pode ser representado esquematicamente do seguinte modo:



O solvente, livre de impurezas, terá de ser necessariamente submetido a rigorosa filtração e degaseificação.

A coluna deverá ser seleccionada consoante o fim a que se destina. Pode ser colocada à temperatura mais conveniente por meio de um forno adequado. Uma coluna bem cuidada poderá ser utilizada durante mais tempo. É importante utilizar-se uma pré-coluna, proceder à limpeza eficaz da coluna, respeitar-se os intervalos de pH em que ela é estável, armazená-la em condições adequadas e utilizar solventes livres de impurezas.

O detector a utilizar será também escolhido de entre as variadas possibilidades:

- (a) O espectrofotómetro de ultravioleta (de comprimento de onda fixo ou variável) que se baseia na presença de um cromóforo, tem uma sensibilidade da ordem do nanograma; são exemplos de aplicações e separação de nucleótidos ou de vitaminas.
- (b) O refractómetro diferencial, cujo princípio é a mudança de direcção de um feixe de luz quando atravessa diferentes matrizes; tem uma sensibilidade de µg e aplica-se por exemplo à separação de açúcares e ácidos gordos.
- (c) O espectrofluorímetro é utilizado para substâncias fluorescentes, é o mais sensível dos detectores e utiliza-se para aminoácidos, alcalóides, catecolaminas.

- (d) O detector electroquímico possui um eléctrodo que oxida ou reduz as moléculas da amostra em estudo, dependendo a sua sensibilidade da possibilidade dessa oxidação ou redução ocorrer. Aplica-se por exemplo, para separar a adrenalina.
- (e) O detector de radioactividade por analisar substâncias marcadas.

Cada amostra a submeter à cromatografia possui características próprias, o que implica em diferentes escolhas dos componentes do HPLC. Para cada estudo a fazer será necessário otimizar a técnica de maneira a obter os melhores resultados possíveis. Existem fórmulas matemáticas que permitem avaliar os resultados que são obtidos.

A técnica de HPLC, quando utilizada correctamente, permite obter boa sensibilidade, boa reprodutibilidade, separações rápidas e necessidade de pequenos volumes de amostra.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Engelhardt H – “High Performance Liquid Chromatography”, Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg/New York, 1979.
- Fallow A, booth RFG, Bell LD – “Applications of HPLC in Biochemistry”, Burdon RH, Knippenberg PH van (general editors), Elsevier, Amsterdam/New York/Oxford, 1987.
- Lim CK – In: “HPLC of Small Molecules – a Pratical Approach”, Lim CK (editor), IRL Press, Oxford/Washington DC, 1986; pg 1-12.

FACTORES BIOQUÍMICOS DA MIGRAÇÃO NEOPLÁSICA¹

Mário Carreira²

A principal característica das neoplasias malignas é a sua capacidade invasiva e de colonização à distância. É desta característica que advém o curso invariavelmente fatal da doença cancerosa.

A partir do tumor primitivo as células malignas são capazes de invadir os tecidos circundantes, degradar o tecido intersticial, penetrar nas respectivas circulações e, noutra local, repetir o processo invasivo de modo inverso e originar colónias em tecidos mais ou menos distantes.

O processo metastático envolve várias etapas; trataremos aqui da capacidade que as células tumorais possuem de degradar o tecido conjuntivo por meio de enzimas proteolíticas de origem tumoral ou das células normais do tecido hospedeiro.

MATRIZ EXTRACELULAR

A matriz extracelular pode ser dividida em dois constituintes “major”: o tecido conjuntivo intersticial e as membranas basais.

As membranas basais são uma estrutura conjuntiva acelular enquanto o tecido intersticial, além dos elementos fibrilares (fibras de colagénio, glicoproteínas e proteoglicanos), é constituído por células como os fibroblastos, condrocitos, osteoblastos, macrófagos, entre outros tipos.

¹ Apresentação em sessão científica interna de 12/Dezembro/1988

² Investigador voluntário do Instituto de Bioquímica, FML

Palavras-chave: catepsinas, colagenases, membrana basal, neoplasia, proteases, proteoglicanases, tecido conjuntivo intersticial

MEMBRANAS BASAIS (MB)

As MB separam as células dos órgãos, epitélios e endotélios do tecido intersticial; fornecem suporte para o crescimento das células e são responsáveis pela manutenção da arquitectura dos tecidos. São constituídas por uma rede de glicoproteínas entrecruzadas.

Os seus principais constituintes são o colagénio tipo IV, laminina, heparan-sulfato, condroitino-sulfato e a entactina.

O colagénio tipo IV é característico das MB, de que constitui 60%. A sua estrutura consiste numa tripla hélice, composta por dois tipos de cadeias geneticamente distintas, 1 (IV) 2 2 (IV). As várias fibras de colagénio ligam-se umas às outras constituindo uma rede tridimensional a que os outros componentes das MB estão ligados.

A laminina é o segundo componente mais importante das MB. É constituída por três cadeias (A, B1 e B2) ligadas por pontes bissulfito; tem alta afinidade para o colagénio tipo IV, proteoglicanos e estactina, participa na ligação das células à MB e “in vitro” promove a aderência celular.

A laminina tem dois braços, um curto com alta afinidade para o colagénio tipo IV, e um longo que se liga aos proteoglicanos das MB. As células malignas poderão usar a laminina para aderirem ao colagénio tipo IV. Confirmando esta hipótese foram identificadas em culturas de células de carcinoma da mama e de outros tumores.

Dois tipos de proteoglicanos estão presentes nas MB: o heparan-sulfato e a condroitino-sulfato.

O heparan liga-se à fibronectina, laminina, colagénio tipo IV e à superfície das células; eventualmente, poderá impedir a formação de microtrombos quando a MB é exposta ao sangue.

TECIDO CONJUNTIVO INTERSTICIAL

O tecido conjuntivo intersticial é uma complexa matriz composta por células misturadas com fibras de colagénio, glicoproteínas, proteoglicanos e ácido hialurónico.

O tecido conjuntivo intersticial tem funções de suporte e mecânicas, e apresenta-se sob diversos tipos, tais como o osso, tendões, cartilagens, ligamentos, fascias, etc. Os vários tipos são diferenciados pelos seus componentes celulares e químicos.

O colagénio compõe em 90% o tecido intersticial e é constituído por três tipos de fibras, os tipos I, II e III. O tipo I é o predominante, e está co-distribuído como o tipo III por todos os tecidos conjuntivos intersticiais com excepção da cartilagem, onde o tipo II está particularmente presente. Além destes tipos também foram encontrados em pequenas quantidades os tipos V a X. Cada um dos três tipos principais é constituído por três hélices.

As fibronectinas estão presentes na superfície das células, no espaço pericelular, nas MB, matriz intercelular e no plasma. Às fibronectinas têm sido atribuídas funções na aderência celular, na ligação à matriz extracelular e na ligação a receptores celulares de superfície. São macromoléculas constituintes da substância amorfa do tecido conjuntivo. Contêm uma cadeia polipeptídica denominada “core”, e um grande número de glicosaminohlicanos a ela ligados.

PROTEASES DEGRADADORAS DA MATRIZ

Têm-se encontrado maior actividade proteolítica nos tecidos tumorais malignos que nos tecidos normais. Em alguns casos há relação directa entre o potencial metastático dos tumores e a sua capacidade de produzir proteases.

As proteases envolvidas no processo metastático poderão provir das células tumorais e/ou das células normais do tecido hospedeiro.

ACTIVADORES DO PLASMINOGÉNIO

São um grupo de enzimas serínicas que convertem o plasminogénio em plasmina. Esta é uma protease inespecífica, cujo substracto preferencial é a fibrina.

Existem dois tipos de activadores do plasminogénio, um tipo tecidual (t-PA) e um tipo “urokinase-like” (u-PA).

Em geral os tecidos tumorais têm mais actividade PA do que os seus correspondentes normais.

Em alguns estudos conseguiu-se prevenir a metastização com anticorpos anti-PA; contudo, ainda não foi estabelecida correlação directa entre a transformação maligna e a produção de PA.

CATEPSINAS

São um grupo de proteínas ácidas sulfidrílicas lisossomais.

O aumento da actividade da catepsina tem sido encontrado em melanomas de rato, em líquidos ascíticos neoplásicos de várias origens, assim como em tumores da mama.

Apesar de haver uma relação positivamente significativa entre a actividade da catepsina B e o potencial metastático de alguns tumores, ainda não está esclarecido o seu papel “in vivo”.

“In vitro” a enzima é capaz de degradar o colagénio tipo I, a laminina e os proteoglicanos.

COLAGENASES

Existem dois tipos principais de colagenases: as intersticiais e as tipo IV.

As primeiras hidrolisam o colagénio dos tipos I, II e III, que são muito resistentes à acção de outros tipos de proteases.

Estas enzimas são metaloproteínas que requerem o Ca^{2+} e Zn^{2+} como cofactores.

As colagenases são segregadas como procolagenases, activadas por acção de proteínas como a tripsina, a quimiotripsina, a plasmina, a catepsina B, a calicreína e as proteases mastocitárias.

As colagenases cortam as moléculas de colagénio a $\frac{1}{4}$ de distância da porção carboxílica terminal, produzindo dois fragmentos com $\frac{3}{4}$ e $\frac{1}{4}$ do comprimento inicial.

Os fragmentos desnaturam-se espontaneamente à temperatura fisiológica, sendo subsequentemente destruídas por proteases “inespecíficas”.

O colagénio tipo IV das MB é degradado por um colagenase específica, presente quer em células

tumorais quer em fibroblastos humanos proliferantes. Há correlação significativa entre a actividade das células tumorais em cultura e o seu potencial metastático. Similarmente às colagenases intersticiais, também parece ser segregada como pró-enzima, activada pelo PA/plasmina.

PROTEOGLICANASES

A destruição dos proteoglicanos necessita de dois tipos de enzimas: as glicosidases, que clivam as cadeias laterais de glicosaminoglicanos, e as proteases que degradam a estrutura proteica central.

O aumento da actividade de glicosidases tem sido observado em culturas “in vitro” de células neoplásicas, assim como foi demonstrado que células epiteliais (transformadas quando colocadas sobre uma matriz subendotelial) solubilizam os glicosaminoglicanos por produção de endoglicosidase. Também a taxa de libertação de fragmentos de heparan-sulfato a partir da matriz é maior nas células de superior potencial metastático.

CONTROLO DA ACTIVIDADE PROTEÁSICA

“In vivo” mantém-se um delicado equilíbrio entre a degradação da matriz extracelular e a sua manutenção, devido a controlo estreito entre a activação e a inibição das proteases.

Nos tumores malignos esse equilíbrio é interrompido no sentido do catabolismo, encontrando-se frequentemente correlação entre a actividade proteásica e a capacidade de metastização.

A regulação das proteases pode ser controlada intracelularmente pela limitação da biossíntese e secreção enzimáticas e, extracelularmente, pela activação das proenzimas ou pela inactivação das enzimas.

A secreção das proteases pode ser modulada negativamente pelos glicocorticoides; (como sucede com a u-PA, catepsina B, colagenases intersticiais, entre outras), com potencial acção terapêutica.

Outras hormonas como os esteroides sexuais podem activar a PA “in vitro”, mas também podem inibir a secreção da colagenase tipo IV.

Produtos provenientes da matriz (como a laminina), ao ligarem-se a receptores das células tumorais, podem incentivar a secreção da colagenase tipo IV.

Tem sido encontrada uma relação entre os factores de crescimento e a produção de proteases. Existem numerosos inibidores das proteases quer na matriz quer nos líquidos corporais. Entre eles contam-se vários inibidores plasmáticos das PAS (p. ex., antitrombina III, α -1-protease inibidor e α -2-macroglobulina) que inibem a u-PA.

Existem vários inibidores das colagenases quer no plasma quer na matriz; a α -2-macroglobulina é o inibidor mais importante destas colagenases.

Em muitos casos não só as células tumorais produzem enzimas proteásicas mas também as células normais do tecido hospedeiro, como os fibroblastos e os macrófagos, são capazes de o fazer por estimulação das células malignas.

Por outro lado os macrófagos do hospedeiro poderão induzir a produção de proteases nas células tumorais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Tryggvason K, Höyhtyã M, Salo T – Proteolytic degradation of extracellular matrix in tumor invasion. *Biochem Biophys Acta* 1987; 907:191-217.
- Recklies AD – Biochemical aspects of cellular migration and invasion. *Biorheology* 1987; 23:93-103.
- Nethery A, O'Grady RL – Identification of a metalloproteinase co-purifying with rat tumour collagenase and the characteristics of fragments of both enzymes. *Biochem Biophys Acta* 1989; 994:149-160.
- Feldman M, Eisenbach L – What makes a tumor cell metastatic? *Sc Amer* November 1988; 40-47.
- Juliano RL – Membrane receptors for extracellular matrix macromolecules: relationship to cell adhesion and tumor metastasis. *Biochem Biophys Acta* 1987; 261-278.

IMPORTÂNCIA DOS GRUPOS SULFIDRÍLICOS DA MEMBRANA ERITROCITÁRIA NA HEMÓLISE¹

Filomena Alves²

O GLÓBULO VERMELHO (G.V.) circulante “maduro”, apresenta um padrão relativamente simples de metabolismo, sem capacidade de síntese de proteínas e/ou da fosforilação oxidativa.

Cerca de 10% da glicose consumida pelos G.V. são metabolizadas através da via das pentoses-fosfato; esta protege tanto a hemoglobina quanto a membrana das agressões oxidativas exógenas, incluindo as de certos medicamentos.

Cerca de 90% da glicose é metabolizada pela via glicolítica ou de Enben-Meyerhof.

O G.V. normal é bem dotado de todos os mecanismos par proteger-se dos “stress” oxidativo. Quando o G.V. é exposto a toxinas ou a medicação oxidantes, metabolização da glicose através da derivação das fosfopentoses aumenta várias vezes, ocorrendo regeneração do glutatião reduzido, que protege os grupos sulfidrílicos da hemoglobina e da membrana da oxidação.

Os indivíduos portadores de um defeito herdado da via das fosfo-pentoses (p.ex., déficit de glicose-6-fosfato (DG6P)), são incapazes de manter um nível adequado de glutatião reduzido no interior do G.V. com consequência os grupos sulfidrílicos da membrana e da hemoglobina são oxidados e a hemoglobina tende a precipitar no interior do G.V. formando corpos de Heinz; os GV nestas condições são facilmente sequestrados pelo sistema fagocítico-mononuclear.

A DG6P catalisa a oxidação da glicose-6-P em 6-fosfogliconato com redução NADP^+ e NADPH . O glutatião reduzido é necessário para a integridade da membrana do G.V., levando as células deficientes a maior susceptibilidade à hemólise aquando da exposição a drogas oxidantes. Similarmente a modificação do G.V. com agentes que reagem com os grupos sulfidrílicos, origina numerosas mudanças nas propriedades das células; p.ex., a N-etilmaleimida (NEM) ou com o

¹ Apresentação em sessão científica interna de 19/Dezembro/1988.

² Investigadora voluntária do Instituto de Bioquímica, FML

Palavras-chave: eritrócito, glutatião, grupos sulfidrílicos, hemólise, membrana, via das fosfopentoses

paracloromercuribenzoato (PCMB) originam diminuição da deformabilidade, alterações esferoidal dos G.V., aumento do fluxo catiónico, perda de lípidos da membrana.

Também o efeito oxidante da diamida origina (“in vitro”) diminuição da deformabilidade, transformação esferoidal e sequestração esplénica.

Além do mais, os G.V. mais velhos mostram características semelhantes aos da esferocitose hereditária: diminuição da deformabilidade, aumento da viscosidade interna, aumento da concentração da hemoglobina globular média, sequestração esplénica e reconhecimento pelos macrófagos.

Há evidência de alterações oxidativas nas membranas dos G.V. envelhecidos, tal como ocorre na esferócitose hereditária, no défice da DG6P e por acção de drogas oxidantes. São exemplos de substâncias que causam hemólise na deficiência da DG6P os antimaláricos, as sulfonamidas, nitrofurantoina, analgésicos entre outros.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Beutler E – Red cell enzyme defects as non diseases and diseases. Blood 1979; 54:1.
- Cooper RA, Bum HF – “Hemolytic Anemias”, McGraw-Hill Book Company, New York 1987, pp 1506.

MECANISMOS REGULADORES DA COMUNICAÇÃO ENDOTÉLIO-NEURÓNIO NO CÉREBRO¹

João Paulo Guimarães²

A dopamina e a serotonina são exemplos de neurotransmissores intervenientes na regulação neurogénica do fluxo sanguíneo cerebral.

O fluxo sanguíneo cerebral global (FSCG), isto é, a quantidade de sangue que irriga o cérebro por unidade de tempo, encontra-se regulado de tal forma que se mantém constante numa grande variedade de situações. De facto, quer o indivíduo em que se faz a medição esteja a dormir ou submetido a actividade intelectual intensa, não se encontram grandes desvios do valor de FSCG obtido, cerca de 54 ml/100g/min (1). Daí que se tenha considerado durante muito tempo a regulação do fluxo sanguíneo cerebral como um processo automático, dependente de factores como a pressão arterial, a pressão intracraniana, a pressão venosa, a viscosidade sanguínea e o grau de constrição ou dilatação das arteríolas cerebrais, tendo-se considerado que este último seria controlado por mecanismos de autorregulação do tónus arteriolar em função da pressão de perfusão e por estímulos metabólicos, como a PCO₂ (com efeito mediado em grande parte por variações de pH), a PO₂ e metabolitos vasoactivos, como por exemplo a adenosina. Embora se soubesse existirem vasos inervados por fibras noradrenérgicas e colinérgicas, sempre se considerou que os reflexos vasomotores seriam de reduzida ou nula importância na regulação do fluxo cerebral no Homem (2).

Em contraste com a situação de equilíbrio descrita acima, em que se obtêm valores constantes de FSCG, verificou-se mais tarde, com o evoluir da tecnologia, que a distribuição do sangue pelos vários territórios cerebrais era muito variável: consoante um indivíduo se encontrasse em repouso ou em determinada tarefa seriam mais profundidas certas zonas (e outras menos) em função do grau de actividade dos neurónios das áreas cerebrais respectivas. É o chamado acoplamento da circulação à actividade neuronal local, em que o fluxo cerebral regional (FSCR)

¹ Apresentação em sessão científica interna de 13/Fevereiro/1989

² Assistente convidado do Instituto de Bioquímica, FML

Palavras-chave: endotélio, neurónios, neurotransmissores, perfusão sanguínea cerebral, regulação neurogénica

varia constantemente, o que *a priori* não põe em causa o “dogma” da autorregulação, visto que segundo a lei de Roy e Sherrington os produtos do metabolismo cerebral conduziram a uma alteração do calibre dos vasos, com aumento da perfusão (3). Esta visão corresponde ao clássico mecanismo de “feedback” negativo. Simples e eficaz (Fig. 1). Este processo parecia ser mesmo muito eficaz, ao ponto de Silver, em 1978, ter determinado que apenas 1 seg. depois da excitação neuronal, já é detectável aumento de perfusão e que esse aumento parece abranger apenas uma área de 150 μm em torno do foco de actividade (3).

Com o avanço dos métodos de medição do fluxo e da actividade metabólica local, em particular com as novas técnicas de autorradiografia e “PET scanning” (Proton Emission Tomography), e utilizando isótopos com diferentes propriedades cinéticas (^{14}C -iodoantipirina, ^{18}C -2-desoxiglicose), foi demonstrado em várias situações um aumento exagerado do fluxo sanguíneo, desproporcional à actividade metabólica (Fig. 2). Este facto paradoxal verifica-se, por exemplo, em estados de hipertermia e no estado de mal epilético. Também foi possível verificar em voluntários normais que o aumento do fluxo local é muito superior ao que seria de esperar em função do aumento do metabolismo oxidativo das zonas estimuladas (4).



FIGURA 1

Hipótese de autorregulação, sugerida inicialmente por Roy e Sherrington, e que durante décadas foi aceite como a que melhor explicava a regulação do fluxo cerebral.

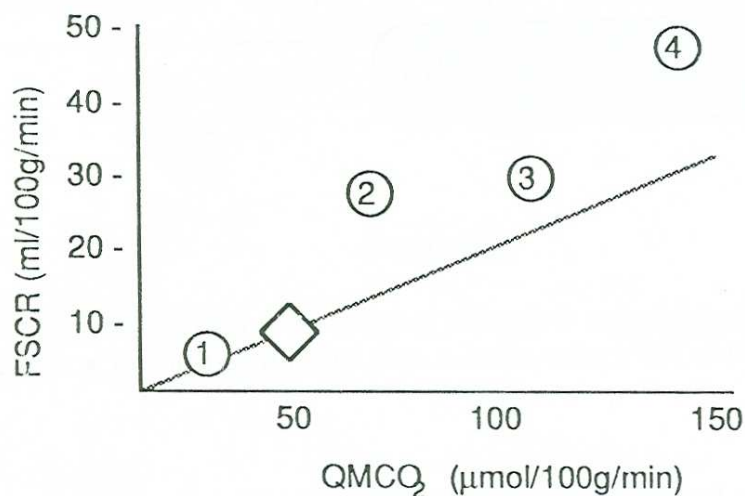


FIGURA 2

Relação entre a utilização regional de oxigênio (QMCO₂) e o fluxo sanguíneo regional (FSCR) em ratos anestesiados com N₂O (Estado controlo: ◇). Verifica-se que em estados de hipermetabolismo o aumento do fluxo é desproporcional relativamente ao aumento do consumo de oxigênio. Adaptado de (6).

Do ponto de vista funcional este comportamento paradoxal levanta a questão de como explicar que o fluxo aumente tanto, em relação ao aumento da actividade metabólica, se se considera que é esta última que funciona como estímulo desencadeante do aumento do fluxo. Terá que existir um outro mecanismo adicional que condicione os aumentos de perfusão verificados.

Até há pouco tempo os dados de experiências em que se detectavam aumentos focais do metabolismo foram associados aos respectivos aumentos demonstráveis no fluxo sanguíneo local. Implícita ou explicitamente partiu-se do princípio que um dos factores (a actividade metabólica) era determinante do outro (o fluxo), já que o inverso parece absurdo. Esta conclusão não é, contudo, uma necessidade lógica: a associação de dois factores não implica necessariamente que um deles seja causa de outro. Pode acontecer que ambos os fenómenos sejam influenciados por um terceiro factor, e é neste ponto que surge o conceito de inervação: e se o estímulo neuronal que leva ao aumento da actividade de um determinado grupo de neurónios originar simultaneamente a vasodilatação das arteríolas que irrigam essa zona? Isso significaria que neurónios centrais inervariam elementos não nervosos (neste caso vasos sanguíneos), o que por definição constituiria um sistema nervoso autónomo dentro do próprio cérebro (5).

Um tal sistema teria certas vantagens dos sistemas neuronais: grande velocidade e capacidade de antecipar necessidades em função da integração de informações provenientes de outras partes do sistema nervoso.

Um outro aspecto importante é o de um tal sistema poder não apenas controlar o calibre dos vasos (e portanto actuar sobre o fluxo), mas também ter uma acção de modulação sobre a barreira hemo-encefálica, nomeadamente aumentando localmente a permeabilidade e/ou selectividade desta, por meio de estimulação das células endoteliais (5).

Para suporte da hipótese acima têm surgido argumentos anatómicos, funcionais e farmacológicos. Do ponto de vista anatómico há a considerar a inervação de artérias, arteríolas e veias, quer a nível meníngeo, quer da vascularização intra-cerebral com fibras provenientes de gânglios de pares cranianos (7), desde há muito descritas e estudadas, particularmente no caso do gânglio eseno-palatino, sem excluir a possibilidade de inervação dos vasos também por neurónios intracerebrais (3, 5). De facto, estudos histoquímicos têm demonstrado a presença de fibras de origem central, em particular noradrenérgicas, na proximidade do microvasos cerebrais, tanto em microscopia óptica como electrónica. Por outro lado, têm sido encontrados receptores para neurotransmissores nos vasos (adrenérgicos α_1 , β_2 dopaminérgicos, para a adenosina, VIP, GABA, etc), o que permite considerar a hipótese de contactos de tipo sináptico dos neurónios com as estruturas vasculares.

Relativamente aos aspectos funcionais e farmacológicos que suportam a teoria da regulação neurogénica do fluxo cerebral, a literatura existente é vasta. Essencialmente baseada em experimentação animal (embora existam trabalhos publicados com estudos em humanos), consiste principalmente em aferir a acção vasodilatadora ou vasoconstritora de determinado neurotransmissor, ou seus agonistas e/ou antagonistas farmacológicos em regiões específicas da circulação cerebral, havendo por vezes discórdância entre resultados obtidos por diferentes autores. Na Tabela 1 estão indicadas acções e localizações de alguns neurotransmissores, segundo Lou (3). Outro tipo de experimentação consiste na estimulação eléctrica de áreas do cérebro, verificando as alterações do fluxo que esta estimulação produz, não apenas localmente, como principalmente à distância, ou os seus efeitos sobre o fluxo global. É o caso, por exemplo, da estimulação eléctrica do *locus caeruleus* no macaco, que provoca não apenas alterações no fluxo cerebral, como também variações da permeabilidade dos capilares cerebrais para a água. Curiosamente, a estimulação química com carbamil-colina tem idênticos efeitos e é abolida por injeção intraventricular de fentolamina, donde se conclui que este efeito resulta da estimulação dos neurónios noradrenérgicos do *locus caeruleus* (5).

Mais recentemente têm surgido trabalhos sobre mecanismos de transdução e acção dos 2^{os} mensageiros nestes processos (8), e outros versando uma possível intervenção dos astrocitos nestes mecanismos de regulação (9).

TABELA 1

Alguns neurotransmissores provavelmente implicados na regulação da circulação cerebral e suas acções. Traduzido de (3).

Neurotransmissor	Origem	Localização	Acção
Dopamina	<i>Substância nigra</i>	A, M	Dilatação
Noradrenalina	<i>Locus caeruleus</i>	A, M	Controversa
	Gânglios simpáticos	A, V	Constricção (α) Dilatação (β)
Serotonina	Núcleos da rafe mediana	A, M	Constricção (grandes vasos) Dilatação (Microcirculação)
Acetilcolina	Córtex	A	Dilatação
	Gânglio esfeno-palatino	A, V	
	Nervo facial	A, V	
NPY	Gânglios simpáticos	A, V	Constricção
VIP	Córtex	A, V	Dilatação
Substância P	Gânglio do Gasser	A, M, V	Dilatação
CGRP	Gânglio de Gasser	A, V	Dilatação

A= Artérias; V= Veias; M= microvasos; NPY= neuropéptido Y; CGRP= calcitonin gene-related peptide; VIP= vasoactive intestinal peptide.

A aplicação dos conhecimentos obtidos com estes estudos é excitante. Embora ainda em fase inicial, começam já a surgir dados com perspectivas de eventuais, implicações terapêuticas. Para além da Neurologia, progressos neste campo poderão ter repercussões sobre áreas clínicas como a Neurocirurgia, nomeadamente no que diz respeito à fisiopatologia do edema cerebral (10) ou do vasospasmo post-hemorragia subaracnoideia; da Psiquiatria (11), como acontece na doença de Alzheimer; ou inclusive a nível da Obstetrícia, no caso da hipóxia neonatal (12).

RESUMO

Têm surgido ultimamente dados que apontam para a existência de um sistema de regulação neurogénica do fluxo através das diferentes regiões do cérebro, ao contrário das concepções anteriormente aceites, que privilegiam mecanismos de autorregulação. Em suporte da regulação

neurogénica do fluxo cerebral existem argumentos anatómicos, farmacológicos e funcionais, havendo estudos implicando vários neurotransmissores neste processo, como sejam a dopamina, serotonina, péptido intestinal vasoactivo (VIP) e outros.

ABSTRACT

There is now evidence that a neurogenic system controlling blood flow through different parts of the brain exists, in contrast to formerly accepted concepts emphasizing auto regulatory mechanisms. A number of anatomic, pharmacological and functional arguments support this hypothesis, and in this regulatory process several neurotransmitters have been implicated, including dopamine, serotonin, VIP, and others.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - Ganong WF – Circulation through special regions. In: “Review of Medical Physiology”, 11th ed, Lange Medical Publications, 1983, pp 488-505.
- 2 - Sokoloff L – Relationship among local functional activity energy metabolism and blood flow in the central nervous system. Fed Proc 1981; 40:2311-2316.
- 3 - Lou HC, Edvinsson L – The concept of coupling blood flow to brain function: revision required? Ann Neurol 1987; 22:289-297.
- 4 - Fox PT, Raichle ME – Focal physiological uncoupling of cerebral blood flow and oxidative metabolism during somatosensory stimulation in human subjects. Proc Natl Acad Sci USA 1986; 83:1140-1144.
- 5 - Hartman BK – Central noradrenergic innervation of cerebral microvessels: implications for an autonomic nervous system within the brain. In: “NATO ARW Regulatory Mechanisms of Neuron to Vessel Communication in the Brain”, Abstracts Book, Salò, Italy, 1988, pp 17-20.
- 6 - Nilsson B, Rehncrona S, Siesjö BK – Coupling of cerebral metabolism and blood flow in epileptic seizures, hypoxia and hyperglycemia. In: “Cerebral Vascular Smooth Muscle and its Control”, Ciba Foundation Symposium, Elliot K, O’Connor M (eds), Elsevier, New York, 1978, pp 199-214.
- 7 - Hara H, Jansen I, Ekman R, Hamel E, Mackenzie ET, Uddmann R, Edvinsson L – Acetylcholine and vasoactive intestinal peptide in cerebral blood vessels: effect of extirpation of the sphenopalatine ganglion. J Cereb Blood Flow Metab 1989; 9:204-211.
- 8 - Olah Z, Novak R, Lengyel I, Dux E, Joo F – Kinetics of protein phosphorylation in microvessels isolated from rat brain: modulation by second messengers. J. Neurochem 1988; 51:49-56.

- 9 - Joo F – Physiological and pathological events mediated by capillary neurotransmitter receptors. In: “NATO ARW Regulatory Mechanisms of Neuron to Vessel Communication in the Brain”, Abstracts Book, Salò, Italy, 1988, pp 25-27.
- 10 - Doczi T, Joo F, Szerdahelyi P, Bodosi M – Regulation of brain water and electrolyte contents: the opposite actions of central vasopressin and atrial natriuretic factor. *Acta Neurochim* 1988, 43:186-188.
- 11 - Gustavson L, Edvinsson L, Dahlgren N, Hagberg B, Risberg J, Rosen I, Ferno H – Intravenous physostigmine treatment of Alzheimer’s disease evaluated by psychometric testing, regional cerebral blood flow measurement, and EEG. *Psychopharmacology* 1987; 93:31-35.
- 12 - Lou HC, Twees WA, Davis JM – Preferential blood flow increase to the brain stem in moderate neonatal hypoxia; reversal by naloxone. *Eur. J. Pediatr* 1985; 144:225-227.

ACÇÃO DOS DETERGENTES NA MEMBRANA ERITROCITÁRIA¹

*Yolanda Pinto*²

As membranas biológicas são essencialmente estruturas de natureza lipoproteica. O modelo aceite para explicar a estrutura da membrana baseia-se no mosaico fluido proposto por Singer e Nicolson (1972). As proteínas de membrana, de acordo com este modelo, podem ser consideradas integrais (intrínsecas) se estiverem embebidas na matriz lipídica ou atravessarem a membrana, ou periféricas (extrínsecas) se estiverem em contacto com o citoplasma ou o meio intercelular.

Os componentes da membrana podem ser isolados por acção de solventes orgânicos, detergentes ou por métodos envolvendo agentes quelantes, iões caotrópicos, alterações de força iónica e de pH. Os primeiros solubilizam os lípidos e também extraem as proteínas mas o seu uso é limitado dado ocorrer agregação irreversível e desnaturação de várias proteínas de membrana; os segundos (detergentes sintéticos, sais biliares e saponinas) e os últimos solubilizam, respectivamente, as proteínas intrínsecas e as extrínsecas.

Em termos físico-químicos, define-se solubilização como preparação de solução isotrópica termodinamicamente estável duma substância normalmente insolúvel num dado solvente pela introdução dum(s) componente(s) adicional anfífilico. Esta definição é igualmente aplicável ao estudo da solubilização e reconstituição de membranas biológicas (componentes lipídicos e proteicos insolúveis no seu meio aquoso). Tal processo envolve transformação de estruturas lamelares em micelas mistas.

Os detergentes são substâncias idênticas aos lípidos; contêm regiões hidrofóbicas ("cauda") e hidrofílicas ("cabeça") distintas, e competem com os lípidos na bicamada. Estes podem ser classificados em iónicos e não-iónicos (Quadro I). A diferença mais notável na estrutura dos detergentes situa-se na região polar; nos não iónicos (usualmente uma cadeia polioxietileno não carregada) esta é frequentemente maior do que nos iónicos.

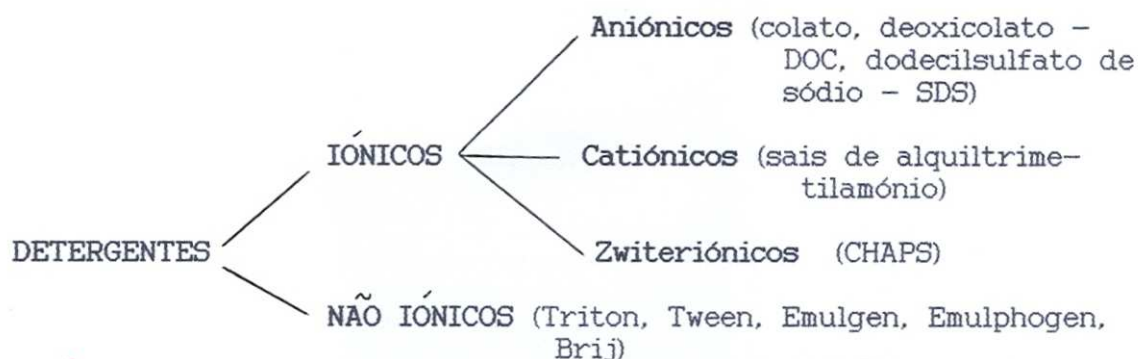
¹ Apresentação em sessão científica interna de 20/Março/1989

² Assistente estagiária do Instituto de Bioquímica, FML

Palavras-chave: detergentes membranares, eritrócito, membrana

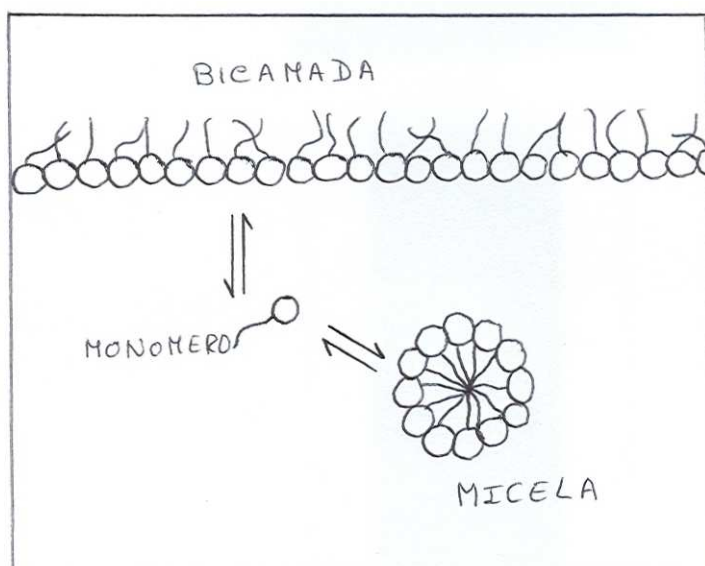
QUADRO I

Classificação e alguns exemplos de detergentes



Os detergentes são anfífilos solúveis e acima de uma dada concentração micelar crítica (CMC) e uma temperatura micelar crítica (CMT) formam micelas de vários tamanhos e formas.

As micelas são estruturas dinâmicas que rapidamente se dissociam e reassociam (Fig. 1). O estudo da cinética deste processo, quer por NMR quer por “stopped-flow”, indica a existência de duas fases, uma rápida que ocorre em μs (correspondendo à libertação de uma única molécula de detergente e subsequente reincorporação) e um processo lento que ocorre em ms, correspondente à dissociação lenta de toda a micela em monómeros e posterior reassociação.

**FIGURA 1**

Representação esquemática do equilíbrio entre formas monoméricas, monocamadas e micelares do detergente (Helenius e Simons, 1975).

Quando se adiciona detergente a uma membrana biológica, esta fragmenta-se; para elevadas razões de detergente/lípido começam a formar-se micelas mistas de detergente-lípido-proteína (Figura 2). O processo de solubilização é frequentemente acompanhado por diminuição marcada na turbidez da solução e pode ser detectada por decréscimo da transmissão da luz através da solução. Contudo, mesmo proteínas completamente solubilizadas podem não originar soluções opticamente claras, dado a existência de micelas contendo lípidos e proteínas.

Cada detergente solubiliza os componentes da membrana eritrocitária por mecanismos diferentes. Tanto o SDS como o DOC, apresentam um perfil sigmóide aquando da representação da percentagem de solubilização da membrana "versus" concentração final de detergente. Os mecanismos de solubilização do SDS, DOC e Triton X-100 diferem substancialmente.

O mecanismo de solubilização pelo SDS parece ser a ligação uniforme do detergente a todos os componentes, com libertação destes a partir de agregados SDS-membrana. O início da solubilização para os lípidos coincide com o CMC do SDS (1-2mM). Quase todos os lípidos estão extraídos para uma concentração de 10 mM de SDS. A partir de 2 mM, as proteínas são separadas dos fosfolípidos e estes são solubilizados, primeiramente por incorporação nas micelas SDS-lípido na gama de concentração 2 - 10 mM. Assim, este detergente extrai lípidos e proteínas separadamente. Matson e Goheen (1986) mostraram que o SDS solubiliza mais as proteínas da membrana eritrocitária do que qualquer um dos outros detergentes.

O DOC solubiliza proteínas e fosfolípidos menos selectivamente. Ambos são solubilizados aproximadamente à mesma velocidade, sendo o colesterol apenas solubilizado quando 60% dos fosfolípidos e proteínas já tenham sido extraídos.

A solubilização com Triton X-100 das proteínas e lípidos inicialmente ocorre em paralelo; mas as proteínas são libertadas mais rapidamente (para concentrações inferiores a 1 mM ele extrai preferencialmente proteínas). Para uma concentração de cerca de 1 mM, a solubilização proteica cessa e os lípidos são completamente solubilizados.

É de salientar que estes três detergentes inicialmente solubilizam proteínas mais rapidamente que os fosfolípidos, e estes mais rapidamente que o colesterol. Para elevadas concentrações de detergente os fosfolípidos e o colesterol são solubilizados, atingindo eventualmente níveis de 95 a 100%. As proteínas tendem a atingir um valor máximo de solubilização para concentrações baixas de detergente.

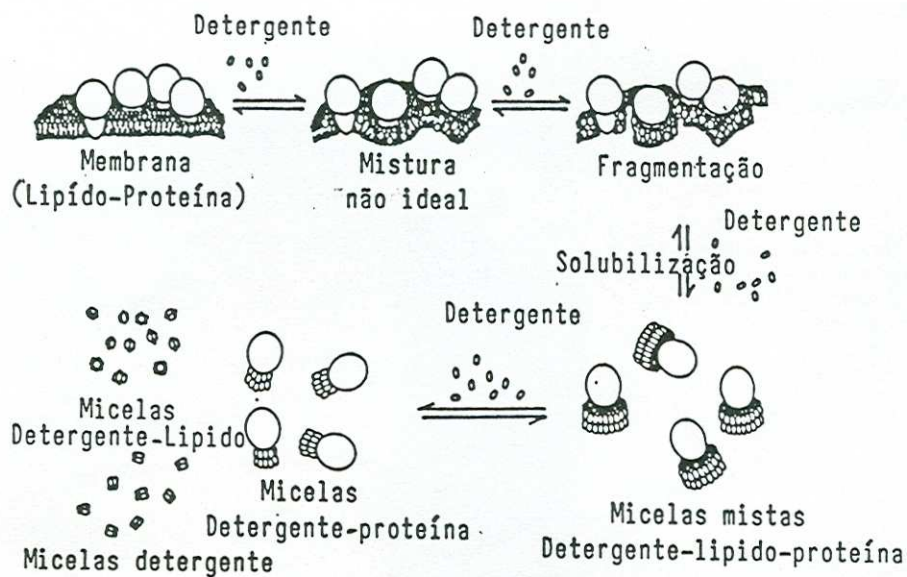


FIGURA 2

Representação esquemática da interação dos detergentes com membranas biológicas (Jones e col, 1987).

Trägner e Csordas (1987) efectuaram estudos de interacção da série dos detergentes Triton com a membrana eritrocitária. Observaram que a interacção ocorria dum modo bifásico, isto é, para baixas concentrações (0,0001-0,01%;v/v) estabilizam eritrócitos contra hemólise hipo-osmótica e tornam-se hemolisantes para elevadas concentrações. Este comportamento bifásico foi demonstrado com Triton X-114, Triton X-100 e Triton X-102.

O Triton X-45 (difere dos restantes apenas numa cadeia curta do resíduo polioxietileno) não exhibe tal comportamento, tornando-se protector contra a ruptura osmótica acima de concentrações saturantes.

Têm sido efectuados vários estudos, usando como modelos liposomas, para demonstrar que nem todos os componentes da membrana são igualmente solubilizados pelo Triton.

O sucesso da solubilização é determinado frequentemente pela escolha de um detergente adequado. A selecção de um dado detergente baseia-se mais em factores empíricos e precedentes do que em princípios científicos. Em geral, o detergente deve solubilizar mas não desnaturar as proteínas, encontrar-se na forma pura e de preferência não ser de elevado custo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alonso A, Urbaneja MA, Goñi FM, Carmona FG, Cánovas FG, Gómez-Fernández JC - Kinetic studies on the interaction of phosphatidylcholine liposomes with Triton X-100. *Biochim Biophys Acta* 1987; 902: 237-246.
- Bangham JA, Lea EJA - The interaction of detergents with bilayer lipid membranes. *Biochim Biophys Acta* 1978; 511:388-396.
- Goñi FM, Urbaneja MA, Arrondo JLR, Alonso A, Durrani AA, Chapman D - The interaction of phosphatidylcholine bilayers with Triton X-100. *Eur J Biochem* 1986; 160:659-665.
- Grant DAW, Hjertén S - Some observations on the choice of detergent for solubilisation of the human erythrocyte membrane. *Biochem J* 1977; 164:465-468.
- Helenius A, Simons K - Solubilization of membranes by detergents. *Biochim Biophys Acta* 1975; 415:29-79.
- Jones OT, Earnest JP, McNamee MG - Solubilization and reconstitution of membrane proteins. In *Biological Membranes - A practical approach*, J.B.C. Findlay e W.H. Evans (eds), IRL Press, 1987 pp 139-177.
- Kirkpatrick FH, Gordesky SE, Marinetti GV - Differential solubilization of proteins, phospholipids, and cholesterol of erythrocyte membranes by detergents. *Biochim Biophys Acta* 1974; 345: 154-161.
- Lichtenberg D, Robson RJ, Dennis EA - Solubilization of phospholipids by detergents, structural and kinetic aspects. *Biochim Biophys Acta* 1983; 737:285-304.
- Matson RS, Goheen SC - The use of high- performance size exclusion chromatography to determine the extent of detergent solubilization of human erythrocyte ghosts. *J Chromatogr* 1986; 59:285-295.
- Miller DM - Total solubilization of erythrocyte membranes by nonionic detergents. *Biochem Biophys Res Commun* 1970; 40:716-722.
- Philippot J - Study of human red blood cell membrane using sodium deoxycholate I. Mechanism of the solubilization. *Biochim Biophys Acta* 1971; 225:201-213.
- Singer SJ, Nicolson GL - The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 1972; 175:720-731.
- Trägner D, Csordas A - Biphasic interaction of Triton detergents with the erythrocyte membrane. *Biochem J* 1987; 244:605-609.
- Urbaneja MA, Nieva JL, Goñi FM, Alonso A - The influence of membrane composition on the solubilising effects of Triton X-100. *Biochim Biophys Acta* 1987; 904:337-345.
- Urbaneja MA, Goñi FM, Alonso A - Structural changes induced by Triton X -100 on sonicated phosphatidylcholine liposomes. *Eur J Biochem* 1988; 173:585-588.
- Welling GW, Van Der Zee R, Welling- Wester S-Column liquid chromatography of integral membrane proteins. *J. Chromatogr* 1987; 418:223-243.

INTERACÇÕES GLOBULARES NA AGREGAÇÃO ERITROCITÁRIA¹

*Luís Cardoso*²

A agregação eritrocitária é um fenómeno com marcada importância na circulação “in vivo”, sendo em parte responsável pelo comportamento não-newtoniano do sangue total.

Numerosos actores influenciam a agregação eritrocitária, podendo ser agrupados em três grandes grupos: propriedades e concentração de proteínas plasmáticas (que determinam a agregação eritrocitária, propriedades eritrocitárias (hematócrito, deformabilidade eritrocitária, carga eléctrica de superfície, forma), e condições físicas em que se desenrola a interacção entre eritrocitos, particularmente a tensão de cisalhamento.

Os glóbulos vermelhos, devido à constituição química da sua membrana, apresentam uma tendência natural de repulsão. A agregação eritrocitária decorre do estabelecimento de pontes entre eritrócitos, por moléculas proteicas ou outros constituintes macromoleculares. A capacidade de macromoléculas induzirem agregação eritrocitária está dependente da carga eléctrica, tipo e força da interacção estabelecida (forças de Van der Waals, pontes de hidrogénio e interacções electrostáticas). O comprimento da molécula, ao permitir o distanciamento das superfícies adjacentes da membrana eritrocitária e diminuição da força de repulsão electrostática, justifica que habitualmente as moléculas de maior peso molecular possuam maior capacidade agregante.

Para um mesmo peso molecular, a estrutura globular está associada a menor agregação relativamente à estrutura alongada, por menor comprimento da molécula e menor diminuição da força de repulsão electrostática (abstraindo a influencia da carga eléctrica da molécula e tipo de interacção com a membrana eritrocitária (Fig. 1).

¹ Apresentação em sessão científica interna de 17/Abril/1989

² Assistente estagiário do Instituto de Bioquímica, FML

Palavras-chave: agregação eritrocitária, membrana, proteínas plasmáticas

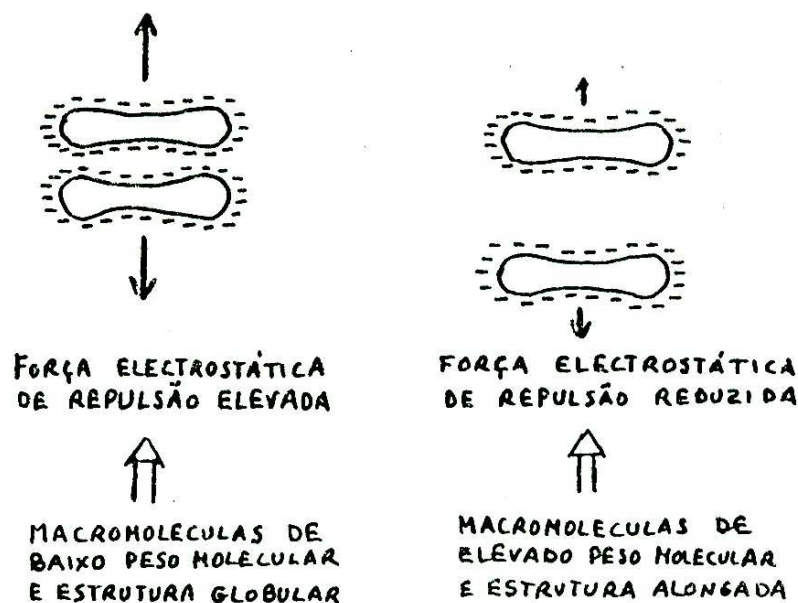


FIGURA 1

A agregação eritrocitária é contrariada por forças de repulsão inter-globulares, resultantes de carga eléctrica negativa à superfície.

A albumina é adsorvida na superfície eritrocitária contudo as suas dimensões ($38\text{A} \times 38\text{A} \times 150\text{A}$) são demasiado pequenas para permitirem o estabelecimento de pontes entre eritrócitos (à distância de 150A entre eritrócitos adjacentes a força de repulsão seria bastante elevada). A interacção da albumina com a superfície eritrocitária é fraca; tendo um ponto isoeléctrico de 4,7 comporta-se como um poli anião ao pH sanguíneo.

A imunoglobulina G e o fibrinogénio com o comprimento, respectivamente, de 200A e 475A , e pontos isoeléctricos, respectivamente, de 6.6 e 5.5, estabelecem facilmente pontes entre eritrócitos.

Na agregação induzida por polissacáridos (Dextranos) e polímeros de ácido glutâmico, os últimos revelaram-se mais efectivos na formação de agregados o que, do ponto de vista da carga eléctrica, pode parecer paradoxal. A diferença poderá ser explicada pela estrutura estequiométrica daquelas moléculas, apresentando os dextranos fibras longas, flexíveis e ramificadas, enquanto os ácidos poliglutâmicos apresentam cadeias longas não-helicodais devido à repulsão electrostática entre os grupos alfa-carboxilo ionizados. Estas características podem mostrar-se relevantes na determinação do número, locais e forças de ligação (provavelmente por forças de Van der Waals e/ou pontes de hidrogénio).

Na agregação induzida por polímeros há inibição da agregação pela adição de moléculas análogas de menor peso molecular; os mecanismos implicados naquele efeito poderão envolver a competição para os mesmos locais de ligação por moléculas com menor capacidade agregante e diminuição da força iónica, com aumento do efeito da exclusão de volume (ver adiante). Os dois últimos mecanismos são apenas válidos para moléculas neutras, não estando provavelmente implicados nos polímeros de ácido glutâmico.

Os polímeros de dextrano de baixo peso molecular não inibem a agregação induzida por polímeros de ácido glutâmico de elevado peso molecular; verifica-se fenómeno idêntico para os polímeros de ácido glutâmico de baixo peso molecular, relativamente aos dextransos de elevado peso molecular. Tal facto sugere diferenças nos locais e forma de ligação daquelas substâncias. Paralelamente, a inibição ou aumento, pela albumina, da agregação induzida respectivamente pela imunoglobulina G e fibrinogénio, poderá representar mecanismos de interacção análogos.

A carga negativa da superfície eritrocitária resulta da presença de ácido siálico ligado a glicoproteínas da membrana eritrocitária. Essa carga negativa está na origem da repulsão electrostática entre eritrócitos. O ácido siálico é referido como importante determinante da vida média eritrocitária, tendo sido observado a sequestração pelo sistema retículo-endotelial de células envelhecidas ou com menor conteúdo em ácido siálico.

O aumento da agregação eritrocitária e, conseqüentemente, da viscosidade sanguínea foi demonstrado em eritrócitos com conteúdo em ácido siálico diminuído. Contudo, a repulsão electrostática resultante da presença de ácido siálico na membrana eritrocitária parece ter menor peso na agregação eritrocitária do que a presença de macromoléculas plasmáticas agregantes como o fibrinogénio.

Em eritrócitos intactos, a agregação induzida por dextrano aumenta até um valor máximo de concentração de dextrano, a partir do qual ocorre uma diminuição da agregação. Este fenómeno, denominado por Chien, efeito de exclusão de volume resultaria de um aumento na repulsão electrostática. Este comportamento não era apresentado por eritrócitos tratados com neuraminidase, sem ácido siálico e conseqüentemente sem repulsão electrostática. Foi sugerido que as moléculas de dextrano induziram, por efeitos estéricos, a disposição dos resíduos glicídicos alinhados perpendicularmente à membrana. Assim, as cargas negativas correspondendo ao ácido siálico afastar-se-iam tanto mais da membrana quanto maior a concentração e peso molecular do dextrano adsorvido. Este fenómeno não ocorre com o fibrinogénio.

A membrana eritrocitária armazena uma parte da energia envolvida na agregação eritrocitária, a qual pode constituir, no estado estacionário, uma fracção substancial. Essa energia é armazenada sob a forma de energia de deformação, correspondendo a uma força contrária à força de agregação resultante da ligação de macromoléculas à superfície eritrocitária.

As forças resultantes da adsorção de macromoléculas à superfície eritrocitária são, em estados não-patológicos, relativamente fracas e facilmente ultrapassáveis por tensões de cisalhamento da ordem de grandeza das que ocorrem nos territórios arterial e capilar. Naqueles territórios os eritrócitos circulam desagregados e alongados no sentido do fluxo, justificando os baixos valores de viscosidade verificados naqueles territórios. No sector venoso pós-capilar, a baixa tensão de cisalhamento origina a formação de agregados e aumento da viscosidade sanguínea.

A agregação eritrocitária poderá também originar a separação de fases no sangue circulante, com a formação de um núcleo celular revestido por uma camada de plasma, facilitando: deste modo o fluxo sanguíneo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bocci V – The role of sialic acid in determining the life-span of circulating cells and glycoproteins. *Experientia* 1976; 32:135-140.
- Chien S, Sung LA – Physicochemical basis and clinical implications of red cell aggregation. *Clin Hemorheology* 1987; 7:71-91.
- Maeda N, Imaizumi K, Sekiya M, Shiga T – Rheological characteristics of desialylated erythrocytes in relation to fibrinogen induced aggregation. *Biochim Biophys Acta* 1984; 776:151-158.
- Maeda N, Shiga T – Inhibition and acceleration of erythrocyte aggregation induced by small macromolecules. *Biochim Biophys Acta* 1985; 843:128-136.
- Maeda N, Shiga T – Opposite effect of albumin on the erythrocyte aggregation induced by immunoglobulin G and fibrinogen. *Biochim Biophys Acta* 1986; 855:127-135.
- Mills P, Snabre P – L'agregation erythrocytaire. *Sem INSERM* 1986; 143:157-166.

TRANSPORTE DE ÁGUA TRANSMEMBRANA ERITROCITÁRIA¹

Manuela Nunes²

Os movimentos de água transmembrana eritrocitária são importantes para a manutenção do volume e estado de hidratação globular, quando modificados por alterações da concentração iónica intra e extra eritrocitária (1). Estudos realizados por diferentes grupos de trabalho, têm permitido clarificar o mecanismo de transporte da água através de membranas biológicas e caracterizar as estruturas directamente envolvidas neste processo.

Permeabilidade à água das diferentes membranas biológicas e de sistemas de bicamada lipídica pode ser considerada sob dois aspectos: permeabilidade difusional (Pd) e permeabilidade osmótica ou de filtração (Pf) (2).

A permeabilidade difusional (Pd) refere-se à passagem de água, através de uma membrana semipermeável, entre dois meios com a mesma concentração em relação a um mesmo soluto.

A permeabilidade osmótica (Pf) estabelece-se entre dois compartimentos, com soluções aquosas de concentrações diferentes, separados por uma membrana impermeável ao soluto. Neste caso o fluxo de água entre os dois compartimentos será directamente proporcional à diferença de pressão osmótica atribuída ao gradiente de concentração do soluto.

O fluxo de água por unidade de membrana é proporcional ao gradiente de concentração dos solutos e é dado por um coeficiente de proporcionalidade. Este coeficiente depende da composição da membrana, da sua permeabilidade à água e da impermeabilidade que oferece a um determinado soluto.

A razão Pf/Pd depende do mecanismo pelo qual a água é transportada através da membrana; esta razão permite-nos avaliar a permeabilidade à água de uma determinada membrana biológica.

¹ Apresentação em sessão científica interna de 8/Março/1989

² Assistente estagiária do Instituto de Bioquímica, FML

Palavras-chave: água, eritrocito, transporte transmembrana

Estudos realizados em sistemas de bicamada lipídica mostraram para estes casos uma razão P_f/P_d igual a 1 (3).

Para a membrana dos eritrócitos humanos o coeficiente de permeabilidade osmótica (P_f) é superior ao coeficiente de permeabilidade difusional logo, a razão $P_f/P_d \gg 1$ (3, 4) Estes factos são consistentes com a presença de “passagens” hidrofílicas, “poros”, associadas a proteínas integrais da membrana eritrocitária, que estão implicadas no fluxo de água e de pequenas moléculas não electrolíticas. Os poros aquosos apresentam uma estrutura em “canal” (5), deste modo alguns autores referem indiscriminadamente uma e outra nomenclatura.

Solomon e col demonstraram a semelhança de comportamento e de propriedades existente entre canais aquosos induzidos por ionóforos (nistatina e anfotericina B) em sistemas de bicamada lipídica e os poros aquosos das membranas dos eritrócitos (4).

A membrana dos glóbulos vermelhos sendo constituída por uma bicamada lipídica e proteínas formadoras de canais, apresenta uma permeabilidade total (P) composta pela permeabilidade osmótica e pela difusional. Deste modo podemos considerar $P = P_{\text{poros}} + q$, sendo P_{poros} a permeabilidade devida aos poros e q a permeabilidade da bicamada lipídica (2).

A dimensão dos canais aquosos (4.2 - 4.6 Å) foi determinada pela razão entre o coeficiente de permeabilidade osmótico (P_f) e o coeficiente de permeabilidade difusional (P_d) (4).

Reforçando a ideia da presença de canais proteicos nos eritrócitos, facilitando o transporte de água, estudos de NMR (5, 6) permitiram constatar que a energia de activação necessária ao transporte de água neste caso é muito menor do que a energia de activação necessária à permeabilização da água em sistemas de bicamada lipídica.

No sentido de esclarecer o mecanismo e os complexos proteicos envolvidos no transporte de água transeritrocitário foram realizadas experiências com reagentes sulfidrílicos. Macey e Farmer demonstraram que o p-cloromercurobenzeno (pCMBS), reagente sulfidrílico, quando adicionado a amostras de eritrócitos, inibe a permeabilidade osmótica da água em cerca de 90% e a permeabilidade difusional em cerca de 50%, reduzindo a razão P_f/P_d para 1; deste modo a permeabilidade à água diminui dez vezes e a energia de activação aumenta de 11 para 12 Kcal/mol (7, 8) Macey e Farmer concluíram que estes reagentes mercuriais “fechavam” os canais de água. Experiências com outros reagentes sulfidrílicos, nomeadamente o ácido 5,5-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB) permitiram chegar às mesmas conclusões.

Separando as proteínas de membrana, de eritrócitos tratados com DTNB, por electroforese de gel de poliacrilamida, verificou-se que este composto migra conjuntamente com a maior proteína de membrana o que permite concluir que os canais aquosos estão associados à banda 3 (4).

A banda 3 é uma proteína integral da membrana eritrocitária de 95 Kd, que representa 25% das proteínas de membrana e contém pelo menos 5 resíduos de cisteína.

O número de poros necessários transporte de água foi calculado em 1.3×10^6 o que está de acordo com número de dímeros de banda 3 (5.5×10^5) e ainda com o número de tetrameros (2.8×10^5) (4).

A observação de Toon (9) de que o transporte de água é inibido em cerca de 30% a elevado pH pela ligação à membrana eritrocitária do DIDS (disulfonato-4,4-diisotiociano-2,2-setilbeno, sonda específica para a banda 3 e inibidor do transporte aniônico, está de acordo com a presença de canais aquosos na banda 3.

O efeito dos factores temperatura e pH no fluxo de água trans-eritrocitário, sugerem repercussões na conformação das proteínas, envolvidas no processo, ocasionadas por modificação das interacções lípido/proteína (10).

Para além dos mecanismos moleculares associados a modificações estruturais, há a considerar a dependência destes da relação entre a energia de activação e a temperatura.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - Calas PM – Volume regulation by Amphiuma red blood cells. *J Gen Physiol* 1980; 76:683-708.
- 2 - Macey R, Moura T – In water channels in: protons and water structure and translocation. *Methods in Enzymology* 1986; 27:598-609.
- 3 - Cass A – Water permeability of thin lipid membranes. *J Gen Physiol* 1967; 50:1765-1784.
- 4 - Solomon AK and al – The aqueous pore in the red cell membrane: Band 3 as a channel for anions, cations, nonelectrolytes, and water. *Ann N Y Acad Sci* 1983; 414: 97-124.
- 5 - Conlon T, Outhred R – Water diffusion permeability of erythrocytes using an NMR technique. *Biochem Biophys Acta* 1972; 288:354-361.
- 6 - Vieira L, Sha'afi R, Solomon AK – The state of water in human and dog red blood cell membranes. *J Gen Physiol* 1970; 55:451-466.
- 7 - Macey RI – Transport of water and urea in red blood cells. *Amer J Physiol* 1984; 246:C195-C203.

- 8 - Moura TF, Macey RI, Chien DY and al – Thermodynamics of all-or-none water channel closure in red cells. *J Memb Biol* 1984; 81:105-111.
- 9 - Toon MR, Solomon AK –Modulation of water and urea transport in human red cells: effects of pH and phloretin. *J Membr Biol* 1987; 99:157-164.
- 10 - Morariu VV, and all – Efects of temperature and pH on the water exchange though erythrocyte membranes: nuclear magnetic resonance studies. *J Membr Biol.* 1981; 62:1-5.

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

Submission

1. Actas de Bioquímica is primarily concerned with the publication of complete transcripts of the lectures, conferences and other studies presented in Advanced Post-Graduate Courses or in Scientific Symposia organized, partly or entirely by Institute of Biochemistry, Faculty of Medicine, University of Lisbon. Original or review articles and other scientific contributions in the field of Basic and Pathological Biochemistry may also be included.
2. Only contributions prepared and submitted as optic version (PDF), will be accepted.
3. Contributions to this publication are printed free of charge. The accepted manuscript should not be republished in the same or similar form without the written consent of the publisher.
4. The submission for publication has to be approved by all the authors.
5. All submitted manuscripts are subjected to editorial review and approval. The decision to publish is dependent on the scientific merit of the contributions.
6. Texts must be written in Portuguese, English or French. An additional English version of the abstract is required, in the case of papers written in languages other than English. In case of contributions from a meeting, the texts must be written in the language previously agreed.
7. All scientific contributions, including manuscript submission and further correspondence should be addressed by e. mail to the editor (jsilva@fm.ul.pt)

Some recommendations for the preparation of the manuscript

- a) **Typing material.** Special care should be taken to ensure that symbols, superscripts or subscripts are legible and do not overlap adjacent lines. All formulae and equations should be precisely and carefully arranged.
- b) **Typing area.** All tables and illustrations must be placed in position in the text, including the appropriate legends.
- c) **Major Headings.** All manuscripts, with the exception of reviews, should be arranged in the following sections: Abstract, Introduction, Material and Methods, Results, Discussion, Acknowledgements and References. The major headings should be centered on the width of the typing-page, typed in capitals and underlined. Other subsidiary headings may be included to increase clarity, but should be in lower case letters and begin at the left hand margin.

-
- d) **Title.** The title should be in capital letters, centered on the width of page 1. Author name(s) should be indicated by writing the first name (or initials) followed by the family name. In the next line(s), the name(s) and mailing address(es) of the institution(s) where the work was done should be mentioned.
- e) **Key words.** One or more key words (up to 5) must be provided by the authors *for* subject indexing. These key words should be placed as a footnote at the bottom of page I, and separated from the main text (although within the typing area) by 3 spaces and a short line immediately above. (e.g. key-words: membrane, lipids).
- f) **Abstract.** An abstract of no more than 150 words should state the objectives, the results and main conclusions of the presented work.
- g) **Main text.** The main text includes the above mentioned (in original articles) Introduction, Material and Methods, Results, Discussion and Acknowledgements sections. Proceed with the other major headings as in the Introduction section.
- h) **Tables.** The word "Table" (in capitals and followed by a Roman number) should be centered on the page. Each table should have a brief title to make its general meaning comprehensive without extensive reference to the text; explanatory remarks may be included in footnotes. The legend should be centered.
- i) **Illustrations.** All drawings, photos or graphs should be referred to as figures, numbered with Arabic numerals and cited in the text in consecutive order. Figures should be professionally drawn or photographed and submitted in the form of sharp, clear, glossy black and white prints. Negatives, photocopies, original ink drawings, roentgenograms or other original material will not be accepted. Figures and legends should preferably not exceed 2/3 of a page. The word "Figure" (in capitals) with the figure number should be on line with the legend. The whole text of the legends should consist of a single paragraph.
- j) **References.** The authors are responsible for the correctness of their references. Consecutive numbering in parentheses, eg, "(1,2)", should be used to indicate the references in the text. References should not exceed 20-25 in number for original contributions. A higher number of references may be considered for review articles. All references should appear at the end of the manuscript as a numbered list, and each reference should include the names of all authors ("et al" is not sufficient) in capital letters (surnames typed first, followed by the initials), full title of the paper, title of the journal (underlined and with accepted abbreviation), and year of publication volume number, first and last page numbers. References to books should include the author's name in capitals, the word "In" (in the case of an article in a book), title (underlined and with first letter of main words capitalized), editor's name (if any), publisher's name, location and year of publication, an first and last page numbers (in the case of an article in a book). The expression "submitted for publication" will not be considered as

a reference and should be placed in parentheses in the appropriate place the text.

Note the following examples:

(Journal) KARPATKIN, S. and SISKIND, G.W. In vitro detection of platelet antibody in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura and systemic lupus erythematosus. Blood 1969; 33 795-812.

(Book) WHITHAM, R. Transport and Diffusion in Red Blood Cells. Edward Arnold Publisher Ltd, London, 1964.

(Article in a book) LESSIN, L.S. In Red Cell Shape. Bessis M., Weed R.I. and Leblond P.F. (eds), Springer Verlag, New York/ Heidelberg/ Berlim. 1973. pp 151-168.

- k) **Running title.** A running title of no more than 40 characters (including the spaces between words) and as close as possible to the topic of the communication, should be provided by the author(s).
- l) **Footnotes.** Avoid footnotes as much as possible. When essential, they should be typed single-spaced at the foot of the appropriate page and separated from the text and a short line immediately above.
- m) **Pagination.** Each page of the manuscript should be numbered.
- n) **Proofs.** Actas de Bioquímica is directly reproduced from the manuscripts, so there are no proofs that can be corrected. For obvious reasons no changes can be made on manuscripts after their acceptance.
- o) **Short communications.** Manuscripts may be considered for rapid processing as short communications. In this case the author(s) may combine some of the sections normally included in a full paper and should not exceed 4 single spaced typed pages (including one figure or one table, legends and references). Follow all other instructions for regular manuscripts.
- p) **Review Articles.** Actas de Bioquímica will publish reviews on subjects of particular interest in its field, either following a special invitation or a submission by the author, and in the latter case only after approval by an Editorial Board member. Further information can be obtained from the editor.