

6. Interações das fenotiazinas com os fragmentos de membranas Na^+ , K^+ - ATPase

Os detalhes dos mecanismos moleculares da ação dos anestésicos estão longe de ser completamente compreendidos. Segundo a regra de Meyer e Overton, segundo a qual a potência da droga se correlaciona fortemente com sua solubilidade no ambiente lipídico, assume-se que os lipídios de membranas são o alvo dos compostos anestésicos. Outros trabalhos têm sugerido que as drogas se ligam diretamente a proteínas, cuja conformação subsequentemente alterada determina a ação dos anestésicos (Ioffe et al., 2007).

Tem-se observado que a atividade de muitas proteínas periféricas e intrínsecas (integrais) de membranas depende da composição dos lipídios vizinhos e do estado físico geral em que se encontram os lipídios nas membranas. Por exemplo, a atividade da Na^+ , K^+ - ATPase tem sido diretamente relacionada com a fluidez da membrana. Durante as últimas décadas tem-se chegado geralmente a aceitar uma ação indireta das drogas sobre as proteínas via perturbações da bicamada de lipídios. As perturbações incluem separação de fase, mudança no parâmetro de ordem, curvatura, pressão lateral, etc. (Ioffe et al., 2007; Cantor, 1997; Urban, 2002; Eckenhoff, 1998).

Hendrich et al. (2003), através de cálculos teóricos dos coeficientes de partição octanol / água, acharam que a hidrofobicidade das fenotiazinas depende do grupo substituinte na posição 2 do anel heterocíclico, sendo que a hidrofobicidade cresce na seguinte ordem $\text{H}^- < \text{Cl}^- < \text{CF}_3^-$. De acordo com os cálculos dos coeficientes de partição os fenotiazínicos devem se intercalar entre os lipídios das bicamadas. Isso está de acordo com resultados experimentais de fluorescência, calorimetria, spins marcadores, NMR. Por exemplo, existe evidência de que a fenotiazina anfifílica, CPZ, encaixa-se na região lipídica causando assim mudanças na fluidez e permeabilidade da membrana (Hueck et al, 2000; Ioffe et al, 2007).

Neste trabalho estudamos os efeitos estruturais das fenotiazinas nas frações de membranas enriquecidas em Na^+ , K^+ - ATPase (membrana - Na^+ , K^+ - ATPase) utilizando para isso as sondas fluorescentes de membrana DPH e ANS, e a sonda fluorescente de proteína FITC.

6.1.

Resultados da interação de CPZ com membranas - Na^+ , K^+ - ATPase

Os espectros de excitação e emissão de fluorescência de DPH em etanol são mostrados na Fig. 6.1. O comprimento de onda de 352 nm corresponde ao máximo de emissão; esse comprimento de onda foi utilizado para excitar a fluorescência do DPH em todo o trabalho.

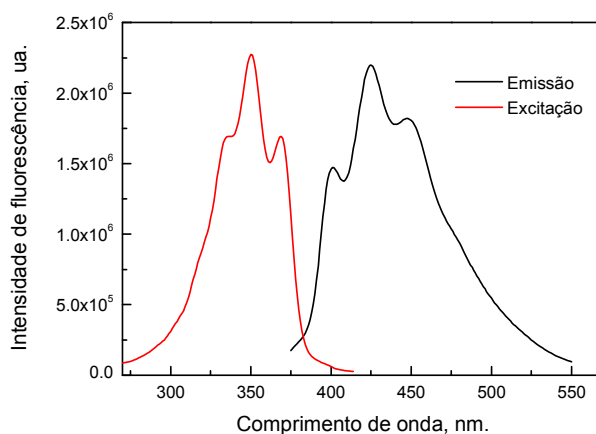


Figura 6.1. Espectros de emissão (excitação em 352 nm) e excitação (emissão 425 nm) de DPH (1,3 μM) em metanol (cubeta 3 ml).

Estudos anteriores mostraram que a fluorescência das moléculas de DPH em meio aquoso é suprimida facilmente pelas moléculas adjacentes de água. Mas quando o DPH é incubado com frações de membranas se observou um aumento de sua intensidade de fluorescência em função do tempo até chegar à saturação (tempo de difusão às regiões hidrofóbicas da membrana). Por isso, para realizar as medidas de fluorescência de DPH em membranas, espera-se um tempo de incubação de 3 horas.

6.1.1. Supressão da intensidade de fluorescência

A supressão de fluorescência pode ser dinâmica ou estática. Se a distância entre a sonda fluorescente e o supressor é constante, a supressão é estática. A supressão dinâmica (ou colisional) depende da difusão. Para analisar a supressão empregam-se curvas de Stern – Volmer, dependência de F_0/F (razão entre fluorescência na ausência e na presença do supressor), em função da concentração do supressor (CPZ, no caso).

O espectro de emissão de DPH em membrana - Na^+ , K^+ - ATPase (Fig. 6.2 A) sofre um decréscimo, sem deslocar-se, causado pelo tratamento com CPZ. Não foi observado recobrimento espectral entre o espectro de emissão da CPZ e o espectro de absorção de DPH, indicando que a supressão não é devida à transferência ressonante de energia. A Fig. 6.2 B mostra o gráfico de Stern-Volmer para supressão da fluorescência de DPH por CPZ à temperatura ambiente de 25°C. A reta representa o ajuste por mínimos quadrados usando a equação de Stern-Volmer, cuja constante aparente de supressão, K_{SV} , apresentou o valor de $3,10 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$.

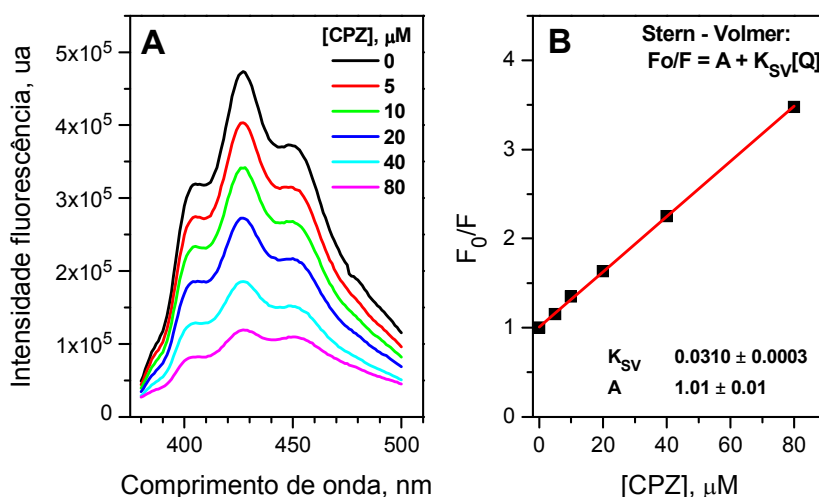


Figura 6.2. (A) Espectros de emissão da DPH em membrana - Na^+ , K^+ -ATPase a diferentes concentrações de CPZ. (B) Gráfico de Stern - Volmer para a supressão da fluorescência de DPH. A análise da supressão foi feita no pico de emissão em 426 nm (excitação em 352 nm). A concentração de DPH é de 2,4 μM .

O gráfico linear de Stern - Volmer nos indica que as moléculas de DPH são igualmente acessíveis ao supressor. A supressão de fluorescência de DPH por CPZ pode resultar da formação de complexo não fluorescente (supressão estática) ou/e por colisões diretas (supressão dinâmica). É possível distinguir entre os dois processos através da medida do tempo de vida na ausência e na presença do supressor, como será mostrado na seção 6.1.2.

Para interpretar a supressão observada é necessário levar em conta a concentração de CPZ na membrana e na fase aquosa, considerando o coeficiente de partição (Lakowicz, 2006). O coeficiente de partição é dado pela seguinte expressão:

$$P = \frac{[CPZ]_m}{[CPZ]_w} \quad 6.1$$

onde $[CPZ]_m$ é a concentração de CPZ na membrana e $[CPZ]_w$ a concentração de CPZ na água.

A concentração total de CPZ ($[CPZ]_T$) é dada por:

$$[CPZ]_T V_T = [CPZ]_m V_m + [CPZ]_w V_w \quad 6.2$$

onde V_m e V_w representam o volume das fases membrana e aquosa, respectivamente. Definindo a fração de volume da fase membrana como:

$$\alpha_m = \frac{V_m}{V_T} \quad 6.3$$

Obtém-se a concentração de CPZ na fase membrana a partir das equações 6.1, 6.2 e 6.3:

$$[CPZ]_m = \frac{P[CPZ]_T}{P\alpha_m + (1 - \alpha_m)} \quad 6.4$$

O volume da suspensão de membrana usada nesta experiência foi de 18,0 μ l, com concentração de 4 mg/ml, o que corresponde a um volume de membrana de $7,2 \times 10^{-2}$ μ l, se considerarmos que a densidade da membrana é aproximadamente igual à da água. O volume total de água foi 1,25 ml. Isto nos dá $\alpha_m = 5,8 \times 10^{-5}$. O valor do coeficiente de partição da CPZ em vesículas de DPPC (dipalmitoil fosfatidilcolina) é $8,0 \times 10^4$ segundo Parry et al. (2007). Conhecendo α_m e P, podemos obter a $[CPZ]_m$ para cada concentração total de CPZ, da equação 6.4, $[CPZ]_m = 1,4 \times 10^4 [CPZ]_T$. Isto indica que a CPZ fica bem mais concentrada dentro fase lipídica.

Para corrigir a equação de Stern-Volmer, a $[CPZ]_T$ é substituída pela concentração de CPZ na fase membranar $[CPZ]_m$, ficando esta equação como:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + \frac{K_{SV} \cdot P \cdot [CPZ]_T}{P \cdot \alpha_m + (1 - \alpha_m)} \quad 6.5$$

ou:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + 1,4 \times 10^4 \cdot K_{SV} \cdot [CPZ]_T \quad 6.6$$

Disto podemos ver que a constante aparente de Stern-Volmer é da ordem de $10^4 K_{SV}$. Então a K_{SV} corrigida por efeito do particionamento da CPZ entre a fase membranar e aquosa, ficaria com um valor bem menor, da ordem de M^{-1} .

6.1.2. Tempos de vida de fluorescência de DPH

Com a finalidade de determinar a natureza da supressão (estática ou dinâmica) de fluorescência da DPH por CPZ, realizamos medidas de decaimento de fluorescência em diferentes concentrações de CPZ (Fig. 6.3).

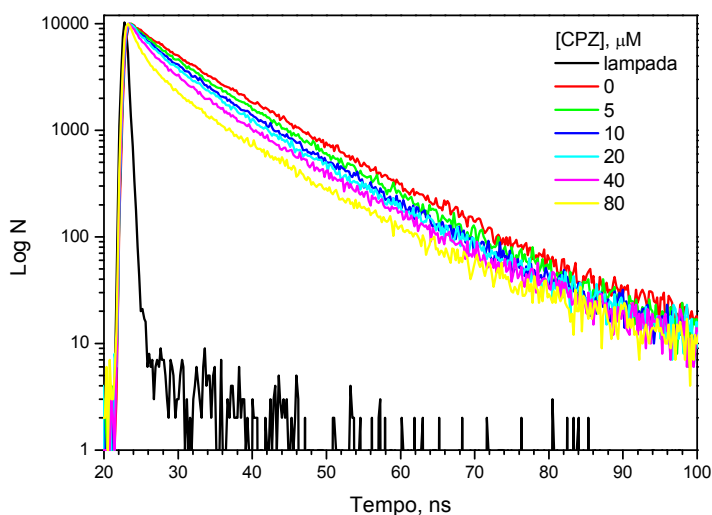


Figura 6.3. Curvas de decaimento da intensidade de fluorescência da DPH - membrana - Na⁺, K⁺ - ATPase a diferentes concentrações de CPZ. [DPH] = 2,4 μM, concentração de proteína na membrana 60 μ/ml. A curva preta é o perfil de emissão do LED de 372 nm. Emissão em 427 nm.

Na Fig. 6.3 observa-se que o decaimento da fluorescência de DPH é modificado pela CPZ. À primeira vista, em tempos mais longos, as curvas de

decaimento mantêm a mesma inclinação. Isto indica a existência de uma componente com tempo de vida quase igual em todas as concentrações de CPZ.

A análise dos decaimentos foi feita utilizando o modelo de múltiplas exponenciais. A fração de fótons associados a um determinado tempo de vida τ_i (determinada espécie) é representada por f_i . Para três exponenciais, os valores de χ^2 foram adequados ($0.8 < \chi^2 < 1.2$), mas observou-se que apenas dois tempos de vida tinham contribuições relevantes. O menor tempo de vida ($\tau \sim 0,5 - 0,8$ ns) correspondeu à menor fração de fótons ($\sim 1,8 - 14$ %) e pode ser uma contribuição das moléculas de CPZ na fase aquosa (CPZ em solução aquosa possui tempo de vida nessa mesma faixa de tempo). Os decaimentos foram então analisados com duas exponenciais, sem levar em conta o perfil da lâmpada de excitação, considerando tempos a partir dos quais a contribuição da lâmpada era menor do que dez fótons. Os resultados são mostrados na Tabela 6.1.

Tabela 6.1. Tempos de vida e amplitudes relativas obtidos dos ajustes bi-exponenciais dos decaimentos de fluorescência de DPH – membrana - Na⁺, K⁺ - ATPase com diferentes concentrações de CPZ. Tempo médio de decaimento,

$$\langle \tau \rangle = \sum_i f_i \tau_i$$

[CPZ] μM	$\tau_1(\text{ns})$	f_1 %	$\tau_2(\text{ns})$	f_2 %	$\langle \tau \rangle (\text{ns})$	χ^2
0	5,4	12	11,5	88	10,8	1,10
5	5,4	15	11,1	85	10,3	1,14
10	5,4	19	11,1	81	10,0	1,06
20	4,8	21	11,1	79	9,8	1,16
40	4,1	18	11,0	82	9,8	1,05
80	3,2	14	10,8	85	9,7	1,12

Konopasek et al. (1998) também encontraram decaimentos bi-exponenciais para DPH em bicamadas lipídicas em pH 7 (com tempos de vida ~ 8.5 e 2.3 ns) Eles associaram a componente com menor tempo de vida à população de DPH localizada na interface membrana-água e a de maior tempo de vida à população em região mais hidrofóbica. Isso estava de acordo com resultados de transferência de energia e resultados prévios de difração de nêutrons. Sugerimos então que as frações f_1 e f_2 da Tabela 6.1 estejam relacionadas a duas populações de moléculas de DPH localizadas em diferentes regiões da membrana: na interface lipídio-água

e no interior, respectivamente. É razoável esperar que a maior população de DPH (molécula hidrofóbica) procure regiões de menor polaridade, como o núcleo da membrana, o que está de acordo com a maior fração associada ao tempo de vida mais longo (Tabela 6.1). Observa-se que a adição de CPZ à solução não ocasiona mudanças significativas no tempo de vida da componente, f_2 , em comparação com a componente, f_1 , que foi a mais alterada.

Gratton et al. (1995), encontraram que o tempo de vida de DPH muda ao modificar-se o ambiente de membrana. Valores típicos de tempo de vida na fase gel da bicamada estão na faixa de 10 - 11 ns e no estado líquido cristalino, na faixa 6 - 9 ns. A Tabela 6.1, também mostra o tempo de vida médio para cada concentração de CPZ, que não muda de forma significativa, de 10,8 a 9,7 ns. O valor do tempo de vida, em ausência de CPZ está mais próximo do tempo de vida achado por Gratton et al. para a fase gel da bicamada lipídica, e está de acordo com Sutherland et al. (1988) para membranas - Na^+ , K^+ - ATPase de duas espécies, 8,5 e 9,8 ns.

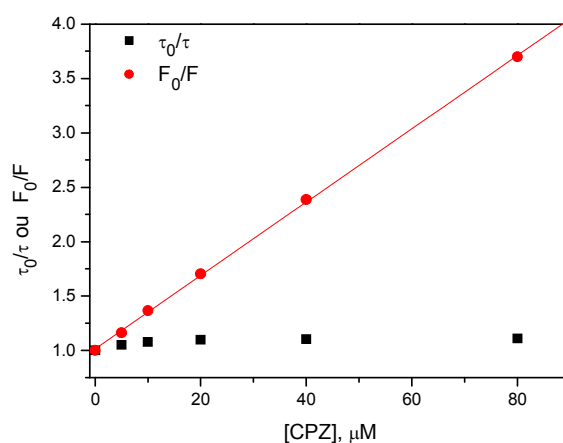


Figura 6.4. Decréscimo da intensidade fluorescência e o tempo médio de decaimento da DPH - membrana - Na^+ , K^+ - ATPase causado pela supressão da CPZ.

A Fig. 6.4 mostra gráficos de Stern-Volmer para a intensidade de fluorescência (F_0/F) e para o tempo de vida (τ_0/τ) de DPH em membrana tratada com CPZ. Numa supressão dinâmica, a intensidade de fluorescência e o tempo de vida diminuem na mesma proporção. Esta equivalência não foi observada em nossas medidas, como mostra a Fig. 6.4. Pode-se dizer que a CPZ suprime a fluorescência de DPH em membrana - Na^+ , K^+ -ATPase ($K_{SV} = 3,38 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$)

sem modificar significativamente o tempo de vida médio, indicando supressão estática.

Sabemos (Konopasek et al., 1998) que em solventes orgânicos os dois tempos de vida de DPH são maiores quanto menor for a constante dielétrica do solvente. Sabendo que o valor da constante dielétrica decai de $\epsilon = 70$ na superfície a $\epsilon = 5$ no núcleo da membrana pode-se dizer que a diminuição do tempo de vida de DPH superficial pode ser ocasionada pelo efeito estrutural que a CPZ faz na membrana, induzindo mais microambientes polares possivelmente perto da superfície. Isto aumentaria ainda mais a permissividade dielétrica relativa na região de membrana perto da superfície e aumentaria um pouco mais a população de moléculas perto da superfície em condições polares e com tempo de vida curto.

6.1.3. Anisotropia - fluorescência estacionária

DPH é uma molécula assimétrica que sofre rotação anisotrópica dentro de uma membrana e se encontra principalmente no núcleo da bicamada lipídica. A anisotropia de fluorescência no estado estacionário de DPH tem sido amplamente usada na literatura para avaliar a fluidez da membrana. O conceito de fluidez obtido mediante anisotropia estacionária de DPH é expresso em termos de ordem orientacional das cadeias lipídicas da membrana. Por exemplo, quanto maior o valor da anisotropia estacionária maior seria a ordem na membrana, associada a um menor movimento médio dos lipídios na bicamada como consequência do aumento na rigidez da membrana.

Na Fig. 6.5 A, mostra-se a anisotropia estacionária de DPH em membrana, em função do comprimento de onda. Observa-se que em menores comprimentos de onda (perto da luz de excitação) os valores de anisotropia são maiores, ocasionados principalmente pelo espalhamento devido aos fragmentos de membrana. De fato, amostras biológicas como as suspensões de membranas são frequentemente turvas, o que ocasiona espalhamento da luz incidente e dos fótons emitidos. A luz incidente espalhada pode vir a ser detectada como fluorescência. A luz espalhada vai ser altamente polarizada quando a luz incidente é polarizada, chegando a aumentar o valor da anisotropia. Em menor grau, a formação de agregados de CPZ em concentração alta possivelmente contribui ao espalhamento.

A Fig. 6.5 B, mostra a variação da anisotropia em função da concentração de CPZ (a análise foi feita em 426 nm, pico de DPH e pouca influência do espalhamento). O aumento de 26 % na anisotropia indica decréscimo na mobilidade dos lipídios (aumento na ordem da membrana), ou seja, aumento da rigidez na membrana. Ioffe et al. (2007), utilizando DPH para estudar o efeito da CPZ no estado estrutural de membranas lipídicas (lipossomas), encontraram também um aumento na anisotropia de DPH. Eles argumentaram que o resultado é um efeito de condensação da droga na parte hidrofóbica da bicamada lipídica. Uma possível explicação desse efeito é que os anéis da molécula de CPZ (parte tricíclica), localizados na parte hidrofóbica da membrana, fazem ficar mais rígidas as caudas das moléculas lipídicas. Isto causaria uma redução na mobilidade aumentando o empacotamento dos lipídios. Essa alteração na propriedade da membrana traz como consequência restrições na rotação de DPH dentro da membrana.

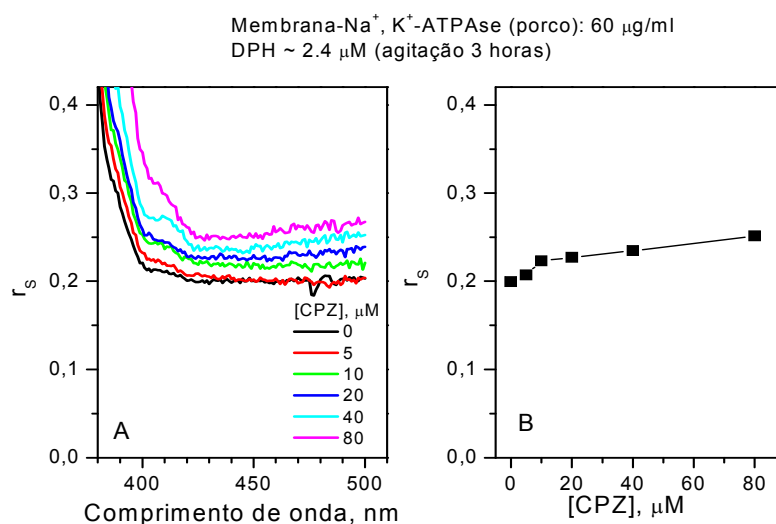


Figura 6.5. Anisotropia de Fluorescência estacionária da DPH - membrana - Na^+ , K^+ - ATPase ([DPH] = 2,4 μM) em função do comprimento de onda (A) e a diferentes concentrações de CPZ (B). O tampão utilizado foi Tris 10 mM a pH 7.4 (cubeta 1 ml) e a excitação é em 352 nm.

6.2. Interação de TFP com membranas - Na⁺, K⁺ - ATPase

6.2.1. Supressão da intensidade da fluorescência

A Fig. 6.7 mostra o gráfico de Stern–Volmer para a supressão de fluorescência de DPH em membrana – Na⁺,K⁺-ATPase por TFP. Da curva ajustada (curva vermelha) obteve-se para K_{SV} o valor de $3,8 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, constante de supressão aparente maior que a de CPZ. Parece que a TFP ingressa mais facilmente que a CPZ na região hidrofóbica da membrana.

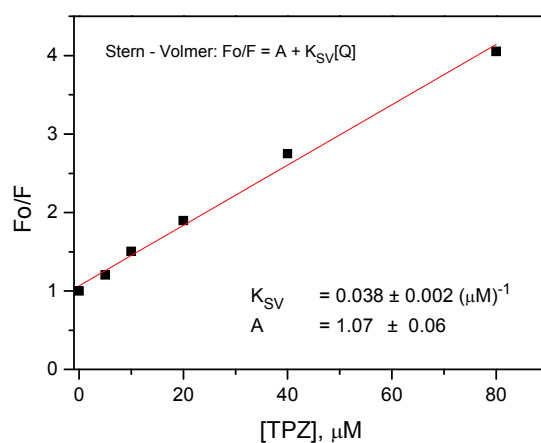


Figura 6.6. Supressão de fluorescência da DPH - membrana - Na⁺, K⁺-ATPase pela TFP. O análises de supressão foi feita no pico de emissão 424 nm e a excitação das amostras em 352 nm.

6.2.2. Decaimento de fluorescência

A Fig. 6.8 mostra o decaimento da fluorescência de DPH intercalada nos lipídios de membrana - Na⁺, K⁺ - ATPase para diferentes concentrações de TFP. Em tempos maiores, como aconteceu com CPZ, são observados decaimentos com a mesma inclinação, ou seja, com um mesmo tempo de vida. Vimos na seção anterior que TFP tem constante de supressão aparente maior que a CPZ. Esse efeito parece se refletir no decaimento da fluorescência de DPH, que foi mais alterado que com CPZ.

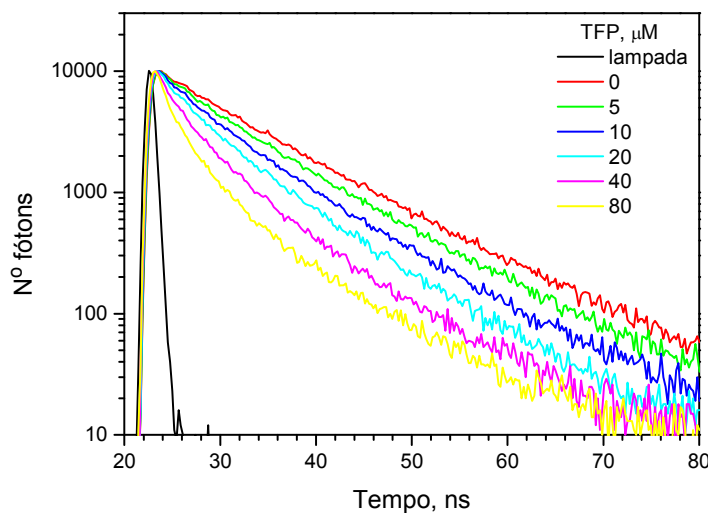


Figura 6.7. Curvas de decaimento da intensidade de fluorescência da DPH - membrana - Na⁺, K⁺-ATPase a diferentes concentrações de TFP. A curva preta é o perfil da lâmpada de diodo led de 372 nm. Concentração de proteína = 60 μg/ml. A emissão foi medida em 427 nm.

A Tabela 6.2 mostra o resultado de análises dos decaimentos da Fig. 6.7 usando o modelo de duas exponenciais, sem levar em conta o perfil da lâmpada de excitação, como com CPZ, considerando tempos a partir dos quais a contribuição da lâmpada era menor do que dez fótons. Vemos, dos resultados da Tabela 6.2, que os fragmentos de membrana utilizados na TFP têm características estruturais diferentes que as membranas utilizadas nos experimentos com CPZ, conforme mostram as diferentes contribuições de tempos de vida DPH. Aqui, a contribuição de moléculas de DPH localizadas perto da interface membrana – água (menor componente) praticamente dobrou em relação ao resultado da Tabela 6.1. No entanto, na presença de TFP, obteve-se o mesmo comportamento que com CPZ, com a maior componente, que tende a ser mais estável que a menor componente; no entanto, parece que a TFP altera mais o tempo de decaimento da menor componente.

A Tabela 6.2 também mostra o tempo de vida médio de DPH. Em média, o tempo de vida da DPH na bicamada lipídica é igual, dentro do erro, para os fragmentos de membrana usados no experimento com CPZ (10,8 ns) e com TFP (10,5 ns), embora as populações das duas componentes de DPH sejam diferentes na membrana. Isto nos diz que DPH tem um entorno lipídico médio nos fragmentos de membrana - Na⁺, K⁺ - ATPase com tempo de vida da ordem de

11 ns. Observamos também que esse tempo de vida decai mais com TFP do que com CPZ, tendendo logo à estabilidade.

Tabela 6.2. Tempos de vida e amplitudes relativas obtidos do ajuste bi-exponencial dos decaimentos de fluorescência de DPH – membrana - Na⁺, K⁺ - ATPase com diferentes concentrações de TFP. Tempo médio de decaimento, $\langle \tau \rangle = \sum_i f_i \tau_i$.

[TFP] μM	τ_1 (ns)	f ₁ %	τ_2 (ns)	f ₂ %	$\langle \tau \rangle$ (ns)	χ^2
0	7,6	38	12,1	62	10,5	1,22
5	6,4	32	11,2	68	9,7	1,14
10	4,9	27	9,8	73	8,5	0,92
20	4,5	35	9,5	65	7,7	1,13
40	3,8	38	9,4	62	7,3	1,13
80	3,2	35	10,0	65	7,6	1,10

A Fig. 6.8 mostra gráficos de Stern-Volmer para a intensidade de fluorescência (F_0/F) e para os tempos de vida (τ_0/τ) de DPH em membrana tratada com TFP. Assim como com CPZ, tampouco com TFP foi vista equivalência na razão de decrescimento.

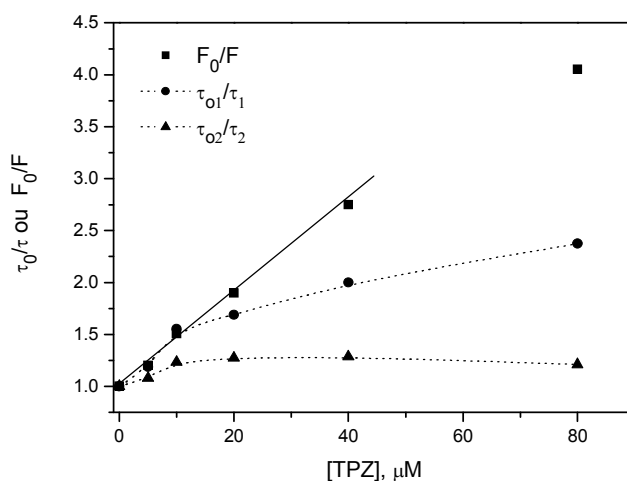


Figura 6.8. Decréscimo da intensidade fluorescência e do tempo médio de vida da DPH - membrana - Na⁺, K⁺ - ATPase causado por supressão por TFP.

A quase estabilidade do tempo de vida τ_2 da DPH, vista também com a CPZ, nos diz que a interação das fenotiazinas com DPH dentro das membranas - Na⁺, K⁺ - ATPase são principalmente produzidas por supressão estática. No entanto, esse tipo de supressão está associado principalmente à componente 2,

mais abundante. O tempo de vida da componente 1 é mais afetado, indicando possivelmente supressão tanto estática como dinâmica. Já que esta menor componente é representada por moléculas localizadas perto da superfície, é propícia a supressão colisional com as moléculas da fase aquosa.

Hendrich et al. (2003), estudando a supressão de fluorescência de N - fenil - 1 - naftilamina (NPN) e de DPH por fenotiazinas em lipossomas de fosfatidilserina, acharam que fenotiazinas com grupo CF_3 – na posição 2 suprimem mais do que as que possuem Cl – nessa posição. Observaram que este efeito é menos pronunciado em DPH. Esses resultados estão em concordância com o diferente grau de supressão entre TFP e CPZ encontrado em nosso trabalho, onde TFP suprimiu um pouco mais que CPZ (Figs. 6.2 e 6.7). Parece então que TFP (e, conseqüentemente, FPZ) tem maior lipofilicidade que CPZ, perturbando mais a estrutura da membrana.

A NPN é uma sonda fluorescente que se localiza perto da interface apolar-polar da bicamada lipídica e é por isso que tem sua fluorescência suprimida e deslocada para o vermelho pelas fenotiazinas, resultado este que indica também aumento na polaridade de seu microambiente (Hendrich et al., 2003). A mesma localização na membrana foi encontrada para a componente de DPH com menor tempo de vida (Van der Heide et al., 1996; Konopasek et al., 1998). Dos resultados de decaimento, a TFP altera mais do que a CPZ o tempo de vida da menor componente, causando maior perda de estrutura da bicamada e trazendo, como consequência, maior intercalação de moléculas polares da fase aquosa na membrana. Isto aumentaria a polaridade no microambiente superficial da membrana causando diminuição no tempo de vida da menor componente (Konopasek et al., 1998).

6.2.3.

Anisotropia - fluorescência estacionária

A Fig. 6.9 apresenta a anisotropia de DPH em membrana - Na^+ , K^+ - ATPase em função da concentração de TFP. A anisotropia de DPH em membranas lipídicas é um pouco aumentada com TFP, indicando diminuição no movimento médio dos lipídios da bicamada. A anisotropia de DPH foi pouco aumentada por TFP (no máximo 17 %, em menor grau que por CPZ, 26 %).

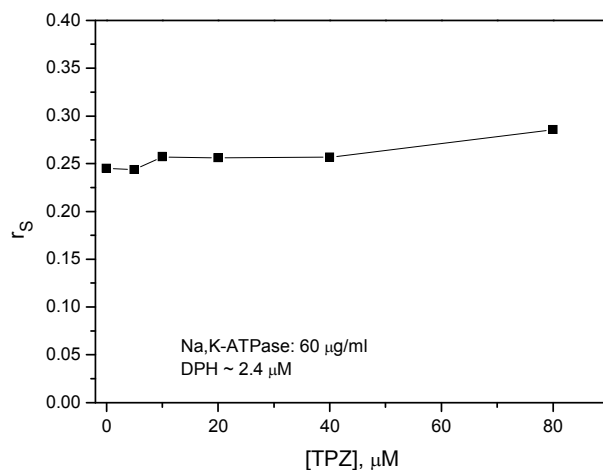


Figura 6.9. Anisotropia de fluorescência estacionária de DPH em membrana - Na⁺, K⁺ - ATPase (DPH, 2,4 μM) com diferentes concentrações de TFP. O tampão utilizado foi Tris 10 mM a pH 7.4 (cubeta 1 ml) e a excitação foi em 352 nm.

Wesolowska et al. (2004) encontraram também que derivados de fenotiazinas que possuem o grupo CF₃– na posição 2 aumentam a anisotropia de DPH no interior de lipossomas de fosfatidilserina (PS) e fosfatidilcolina (PC).

A alta afinidade de CPZ por fosfolipídios carregados negativamente faz com que a PS seja um receptor adicional para CPZ na superfície de membranas celulares. Tem-se mostrado também que CPZ se liga não só à superfície, mas também que se intercala no interior da membrana entre as cadeias lipídicas (Parry et al., 2007). TFP e FPZ parecem ter o mesmo mecanismo de interação com membranas que CPZ, já que possuem resultados similares para interação com DPH. Mas o maior grau de supressão de TFP (e FPZ) indica maior alcance às moléculas de DPH localizadas no núcleo da membrana. Estes resultados de TFP (e FPZ), em grau distinto à CPZ, parece envolver o substituinte na posição 2.

Os dois anéis benzênicos presentes nas fenotiazinas conferem suficiente solubilidade lipídica às drogas para penetrar na membrana. No entanto, o substituinte na posição 2 também contribui à lipoficidade da molécula. Grupos de trifluorometil contribuem mais à hidrofobicidade que o grupo –Cl. É também possível que a cadeia lateral das fenotiazinas se incline para o anel devido a interações de Van der Waals entre a cadeia lateral e o subsequente na posição 2. Estas interações são mais favoráveis para fenotiazinas de grupo –CF₃/piperazina (TFP) que para as de grupo Cl/alkilamino (CPZ) (Albini and Fasani, 1998;

Hendrich et al., 2003). Esta disposição geométrica da estrutura da TFP poderia desestruturar mais os lipídios na membrana.

Em pH fisiológico, CPZ e TFP podem estar em duas formas, protonada e não protonada, presentes em diferentes porcentagens. Isto afeta o coeficiente de partição das moléculas e a formação de agregados. Caetano e Tabak (2000) estudaram as características de ligação da CPZ e TFP em micelas de SDS (aniônicas) usando espectroscopia de absorção e fluorescência. O ambiente lipídico da membrana pode alterar o estado de protonação das moléculas. Além do mais, as moléculas neutras penetram mais na membrana do que as carregadas. Como o pK da CPZ é 9,3 e o da TFP é 7,0, em pH 7,0 há mais moléculas neutras de TFP do que de CPZ. Isso concorda com nossos resultados de supressão da fluorescência de DPH, que indicaram maior grau de supressão para TFP do que para CPZ.

Dos resultados de anisotropia estacionária, Caetano e Tabak (2000) também encontraram que CPZ e TFP tornam mais rígidas as micelas de SDS e que a CPZ se localiza em regiões mais polares que a TFP. Isso também concorda com nossos resultados de supressão. Parece que a CPZ, em pH 7,0, se localiza prioritariamente mais perto da interface lipídio-água que do núcleo da membrana. Sua forma protonada, em maior quantidade, favoreceria esta localização, já que a cadeia lateral carregada positivamente se posicionaria na vizinhança das cabeças polares dos fosfolipídios. Enquanto a TFP apresenta a forma predominante neutra, o que facilita o ingresso no núcleo da membrana.

6.3.

Decaimento de anisotropia de DPH – cinética e ordem dos lipídios

O decaimento da anisotropia de fluorescência em membranas lipídicas pode ser descrito como a soma de duas componentes, uma de decaimento rápido e um termo constante:

$$r(t) = (r_0 - r_\infty) \cdot \exp(-t / \tau_c) + r_\infty \quad 6.7$$

onde r_0 é a anisotropia inicial, τ_c é o tempo de correlação rotacional e r_∞ é o valor assintótico de $r(t)$ para um tempo muito longo (Jahnig et al., 1979).

Em membranas lipídicas com ou sem colesterol e em membranas celulares, o decréscimo de $r(t)$ para um valor r_∞ , diferente de zero, dá a entender que a

distribuição final de dipolos emissores deve ser anisotrópica. Assim r_∞ fornece informação sobre a ordem estrutural nas membranas. A sonda DPH dentro da membrana, ao orientar-se paralelamente às cadeias dos lipídios, detecta a ordem. Então, podemos identificar a ordem da sonda com a ordem dos lipídios. Para o caso do momento de dipolo de absorção e emissão localizados ao longo do eixo do fluoróforo, r_∞ pode ser escrito em função do quadrado do parâmetro de ordem da sonda fluorescente ou parâmetro de ordem dos lipídios. Então pelas medidas de decaimento de anisotropia de fluorescência de DPH nós podemos por meio r_∞ analisar o efeito estrutural das fenotiazinas em membranas.

Em meios anisotrópicos como a membrana lipídica, a anisotropia estacionária, r_S , pode ser escrita em função de τ_c , τ e r_∞ da seguinte maneira:

$$r_S = \frac{r_0 - r_\infty}{1 + \tau/\tau_c} + r_\infty \quad 6.8$$

Na equação 6.8 o primeiro termo representa a contribuição cinética e o segundo a estrutural. A equação de Perrin (Eq. 3.29) é obtida se a parte estrutural r_∞ é desprezível. Kawato et al. (1978), estudando as propriedades de fluorescência de DPH em certas membranas, encontraram uma relação entre r_S e r_∞ , assumindo como valor médio $\tau / \tau_c = 8$ para DPH na fase lipídica e $r_0 = 0,39$ (Lackowicz, 2006):

$$r_\infty = \frac{9}{8}r_S - \frac{1}{20} \quad 6.9$$

A equação 6.9 mostra que a ordem dos lipídios em membranas pode ser analisada com boa aproximação das medidas de anisotropia de fluorescência estacionária.

6.3.1.

Efeitos das fenotiazinas no decaimento de anisotropia de DPH

A Fig. 6.10 apresenta os dados experimentais (símbolos pretos) de decaimento da anisotropia de fluorescência de DPH em membrana - Na^+, K^+ - ATPase. A curva ajustada mostra claramente que a sonda sofre um movimento restrito nas membranas.

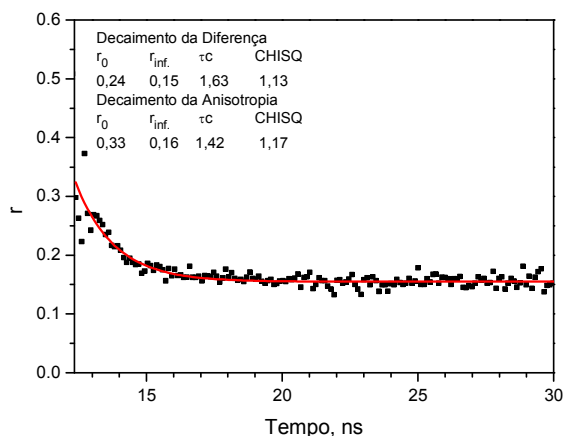


Figura 6.10. Curva decaimento da anisotropia de fluorescência de DPH em membrana - Na^+ , K^+ - ATPase. A curva representa o ajuste exponencial. Excitação em 372 nm e emissão em 427 nm (Tampão Tris 10 mM pH 7,4; 1,8 mg/ml proteína; [DPH] 80 μM ; cubeta de 1 mm de espessura).

Da curva ajustada na Fig. 6.10 obtém-se $r_\infty = 0,16$ e $\tau_c = 1,4$ ns. Estes parâmetros são muito parecidos com os encontrados por Koyama et al. (1990), que acharam para a anisotropia de DPH em fragmentos de membranas - Na^+ , K^+ - ATPase de rã os valores 0,14 e 1,5 ns para r_∞ e τ_c , respectivamente.

A seguir mostraremos os resultados de medidas de $r(t)$ na presença de fenotiazinas. Os efeitos cinéticos e estruturais são relacionados com os parâmetros τ_c e r_∞ , respectivamente. A Figura 6.11, mostra $r(t)$ de DPH em membranas - Na^+ , K^+ - ATPase tratadas com CPZ. Os valores de τ_c e r_∞ foram 1,0 ns e 0,20, respectivamente. A anisotropia limite, r_∞ , fica maior que a encontrada em ausência de CPZ, indicando aumento na ordem orientacional dos lipídios. Já o tempo de correlação rotacional τ_c teve seu valor diminuído, sugerindo maior mobilidade dos lipídios.

A Figura 6.12, mostra o decaimento de anisotropia de fluorescência de DPH paramembranas tratadas com TFP 20 μM . Os valores para τ_c e r_∞ foram 0,68 ns e 0,26, respectivamente. Os parâmetros são alterados na mesma forma que a CPZ, mas em maior grau.

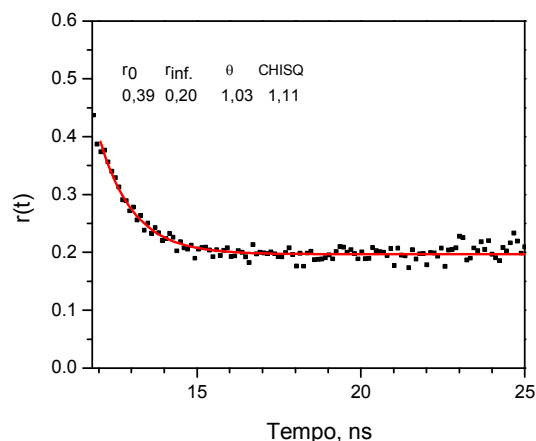


Figura 6.11. Anisotropia resolvida no tempo de DPH em membrana - Na⁺, K⁺ - ATPase (DPH, 2,4 μ M) tratada com CPZ 20 μ M. Tampão Tris 10 mM pH 7.4 (cubeta 1 ml). Excitação em 352 nm e emissão em 426 nm.

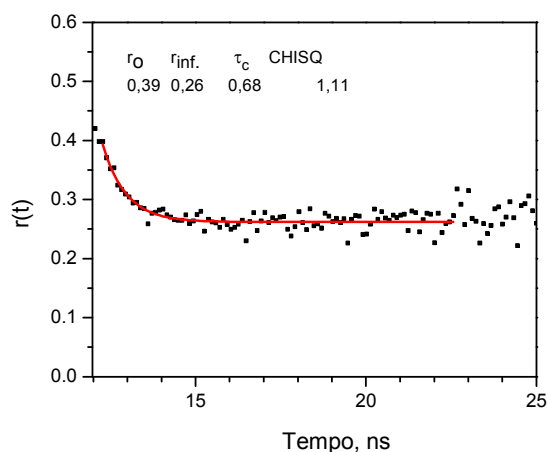


Figura 6.12. Anisotropia resolvida no tempo da DPH - membrana - Na⁺, K⁺ - ATPase (DPH, 2,4 mM) para 20 μ M de concentração de TFP. O tampão utilizado foi Tris 10 mM a pH 7.4 (cubeta 1 ml). Excitação em 352 nm e emissão em 426 nm.

Os efeitos das fenotiazinas na ordem dos lipídios da membrana, deduzidos a partir das medições de anisotropia estacionária, coincidiram com os resultados para a anisotropia limite, obtidos das medições resolvidas no tempo (Figs. 6.5 e 6.11; 6.9 e 6.12). Isto quer dizer que r_S serve para analisar com boa aproximação os efeitos estruturais das fenotiazinas (Jahnig et al., 1979).

Os parâmetros r_S e r_∞ aumentaram de valor em presença das fenotiazinas. Nas medidas de decaimento de anisotropia a TFP afetou mais a ordem dos lipídios do que a CPZ, já que aumentou mais o valor de r_∞ .

Em tempos da ordem 10^{-8} s, moléculas de lipídios podem também mover-se por difusão lateral em distâncias da ordem de angstroms. A anisotropia de fluorescência, que envolve processos dentro desse tempo curto, detecta parâmetros de ordem local devido a essa difusão lateral. Os parâmetros de ordem local representam a ordem orientacional relativa a um eixo médio local que em geral não coincide com a normal à membrana. O parâmetro de ordem medido pela anisotropia de fluorescência seria a média de todos esses parâmetros de ordem locais. Um aumento na ordem dos lipídios obtido pela anisotropia de fluorescência demanda um aumento na ordem dos lipídios ao redor dos eixos locais (Jahnig et al., 1979).

CPZ e TFP causam aumento no r_{∞} indicando um incremento na ordem dos lipídios. Por outro lado, observou-se diminuição no tempo de correlação rotacional. O decrescimento de τ_c indicaria diminuição da microviscosidade. O grau de diminuição de τ_c depende da forma como interagem as fenotiazinas com a bicamada lipídica. Da supressão de fluorescência de DPH e tempos de vida associados ao interior ou à superfície da membrana, a CPZ parece não afetar o núcleo da membrana, enquanto a TFP parece afetar tanto o núcleo quanto a superfície. O mecanismo exato de interação das fenotiazinas com os lipídios, ou com a estrutura lipídica, ainda é incerto. Na superfície tanto a CPZ como a TFP podem interagir por atração elétrica com grupos das cabeças polares dos lipídios, e seus anéis hidrofóbicos podem se intercalar entre os lipídios de tal forma que alterem o estado estrutural dos lipídios. Por outro lado, o grau de protonação das fenotiazinas CPZ e TFP dentro das membranas pode ser diferente para cada uma (Caetano e Tabak, 2000).

6.3.2.

Anisotropia de fluorescência de DPH em membranas de crustáceo normal e adaptado

As propriedades físicas dos lipídios em membranas biológicas são sensíveis às mudanças ambientais como consequência da adaptação das espécies. Foram utilizados membranas de crustáceo enriquecidas em Na^+ , K^+ - ATPase para investigar (em nível molecular) as propriedades dessas membranas, quando o crustáceo muda de um ambiente menos salino (normal de rio de água - doce) a outro mais salino e mais frio (adaptada em mar).

Anisotropia - fluorescência estacionária

A Fig. 6.13 mostra a anisotropia de fluorescência estacionária de DPH em membrana de crustáceo normal e adaptado, e de rim de porco.

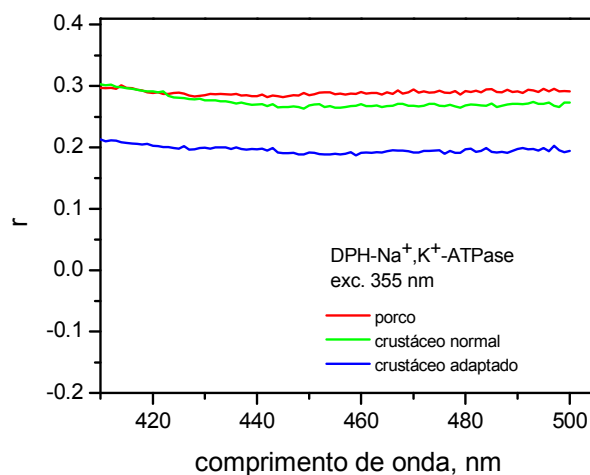


Figura 6.13. Anisotropia de fluorescência estacionária de DPH em membrana - Na^+ , K^+ -ATPase de crustáceo normal (verde) e adaptado (azul). Excitação em 355 nm. A análise foi feita utilizando a máxima emissão em 427 nm. A curva vermelha é de membrana de rim de porco.

Observa-se uma diferença significativa no valor da anisotropia para a espécie normal e adaptada do crustáceo. A anisotropia estacionária no crustáceo adaptado diminui 30 % em relação ao crustáceo normal. Este resultado indica que a bicamada lipídica do crustáceo normal tem menor mobilidade/mais ordem do que a de crustáceos adaptados. Parece que o crustáceo adaptado teve que aumentar a fluidez de sua membrana celular para se adaptar a um ambiente mais salino e frio.

Parece uma coincidência que as membranas de crustáceo normal e de rim de porco tenham o mesmo valor de anisotropia.

Medidas de anisotropia de fluorescência estacionária em membranas - Na^+ , K^+ - ATPase de hepatócitos de peixe dourado *Sparus auratus L.* aclimatados a 17° C (Hernandez et al., 2002) resultaram em aumento de ordem ou diminuição de fluidez dos componentes lipídicos quando se baixa a temperatura de aclimação em água até ~7° C. Esta compensação para preservar suas propriedades físicas, de fluidez, ordem ou outras, frente a distúrbios térmicos foi denominada adaptação homeoviscosa (Logue et al., 1995). Parece que o crustáceo para adaptar-se no mar teve que baixar a ordem/aumentar a mobilidade dos lipídios na membrana celular.