



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE FÍSICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÍSICA

Rodrigo Alves Moreira

**Interação da Miltefosina com os Componentes Lipídicos e
Proteicos das Membranas de Eritrócito e *Leishmania*
Estudada Por Ressonância Paramagnética Eletrônica**

GOIÂNIA
2014

Rodrigo Alves Moreira

Interação da Miltefosina com os Componentes Lipídicos e Proteicos das Membranas de Eritrócito e *Leishmania* Estudada Por Ressonância Paramagnética Eletrônica

Tese apresentada ao Instituto de Física da Universidade Federal de Goiás como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Física Experimental e Aplicada.

ORIENTADOR: *Prof. Dr. Antonio Alonso*

GOIÂNIA
2014

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
GPT/BC/UFG**

M835i Moreira, Rodrigo Alves.
Interação da miltefosina com os componentes lipídicos e proteicos das membranas de eritrócito e *leishmania* estudada por ressonância paramagnética eletrônica [manuscrito]/ Rodrigo Alves Moreira. - 2014.
135 f. : figs, tabs.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Alonso.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Goiás,
Instituto de Física, 2014.

Bibliografia.

Inclui lista de figuras, tabelas e abreviaturas.

1. Ressonância paramagnética eletrônica 2. *Leishmania*
3. Leishmaniose cutânea. I. Título.

CDU – 537.635:616.993.161

*A meus pais, Cloves Mendes Moreira e
Joana Alves Moreira.*

Agradecimentos

- A meus pais, por sempre terem apoiado minhas decisões e acreditado em minha força de vontade;
- Ao professor Dr. Antonio Alonso, pelo tempo dedicado à orientação, por todos os ensinamentos científicos e morais além da confiança despendida quando necessário;
- Aos amigos Sebastião Antônio Mendanha Neto e Kelly de Souza Fernandes, pela ajuda que foram fundamentais para a realização deste trabalho;
- Aos demais amigos do Grupo de Biofísica: Jorge Luis Vieira dos Anjos, Lais Alonso, Heverton Silva de Camargos e Adolfo Henrique de Moraes Silva pela ajuda durante a realização deste trabalho;
- A meus familiares, que mesmo com dificuldades em compreender o verdadeiro significado deste trabalho, sempre me incentivaram a seguir em frente;
- Aos professores do Instituto de Física da UFG, pela dedicação e atenção durante o curso de pós-graduação;
- Aos meus colegas do IF-UFG, pela amizade e apoio;
- Ao Prof. Dr. Fernando Pelegrini, por ceder gentilmente o laboratório de Ressonância Eletrônica;
- Ao Instituto Goiano de Oncologia e Hematologia (INGOH), por ceder as amostras de sangue que foram fundamentais para os testes preliminares deste trabalho;
- Ao Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP), por colaborarem nas pesquisas fornecendo as *Leishmanias* que sem as quais este trabalho seria inviabilizado;
- A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de Doutorado;
- Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Universidade Federal de Goiás (UFG), pelo suporte financeiro.

“Todo aquele que se dedica ao estudo da ciência chega a convencer-se de que nas leis do Universo se manifesta um espírito sumamente superior ao do homem, e perante o qual nós, com os nossos poderes limitados, devemos humilhar-nos.”

Albert Einstein

Resumo

A leishmaniose cutânea é uma doença tropical negligenciada que afeta milhões de pessoas em todo mundo, representando um grave problema de saúde pública. A miltefosina (MT) é um alquilfosfolípido aprovado inicialmente para tratamento de câncer metastático e também foi licenciada para o tratamento da leishmaniose visceral, embora seu mecanismo de ação a nível molecular permaneça pouco compreendido. A espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (RPE) do marcador de spin lipídico análogo do ácido esteárico (5-DSA) e do marcador de spin derivado do maleimido (6-MSL) ligado covalentemente às proteínas de membrana demonstraram que a MT provoca um grande aumento na dinâmica molecular das membranas de eritrócito (ghosts) e membranas resistentes à extração por detergente (DRMs) preparadas a partir de membranas de eritrócito. A técnica também demonstrou que em vesículas formadas com lipídios constituintes de rafts, 20 mol% de esfingomiéline pode ser substituído por 20 mol% de MT, sem qualquer alteração em termos de dinâmica molecular. Além disso, o efeito da MT em DRMs foi mais pronunciado do que em ghosts de eritrócito, consistente com a hipótese da MT ser um modulador de raft. Na concentração de MT presente no plasma sanguíneo durante o tratamento de leishmaniose (31-52 $\mu\text{g/mL}$), as nossas medidas realizadas diretamente no sangue total indicaram um nível de 2-5% de hemólise e também mostrou que a concentração de MT capaz de alterar a fluidez da membrana de eritrócito a nível detectável pela espectroscopia de RPE causou cerca de 46% de hemólise. Posteriormente, estudos de RPE realizados com os mesmos marcadores de spin na membrana de *Leishmania (L.) amazonensis* (forma promastigota) demonstraram alterações similares às encontradas nas membranas de eritrócito. Os efeitos citotóxicos sobre os parasitas também foram avaliados para investigar as relações entre os potenciais citotóxicos da MT e sua capacidade de alterar

a fluidez da membrana. Os dados de RPE demonstraram que a concentração mínima necessária de MT para causar alteração na membrana do parasito ocorreu próximo dos valores de concentração que inibe 50% do crescimento celular (IC_{50}), existindo, portanto, uma correlação entre as alterações na membrana e a citotoxicidade. Embora o marcador de spin lipídico também tenha detectado alterações na fluidez da membrana, os experimentos de RPE indicaram que a MT atua predominantemente no componente protéico da membrana. A lise celular também foi detectada através da análise dos sobrenadantes das amostras centrifugadas onde foram encontrados fragmentos de membranas marcadas e também proteínas citoplasmáticas. Usando um método para a rápida incorporação da MT na membrana, os efeitos de citotoxicidade foram medidos imediatamente após o tratamento e na mesma faixa de concentrações de MT que causam a inibição do crescimento celular. A citotoxicidade, estimada através da contagem microscópica das células vivas e mortas, indicou $\sim 70\%$ de morte celular na concentração de MT em que a espectroscopia de RPE detectou uma alteração significativa na dinâmica da membrana. Após o primeiro impacto no número de parasitas viáveis, o processo de morte e crescimento celular continuou durante as primeiras quatro horas de incubação. Os espectros de RPE de proteínas de membrana marcadas com o 6-MSL foram consistentes com conformações de proteína mais expandidas e expostas ao solvente, sugerindo uma ação típica dos detergentes. Nossa interpretação é que a MT pode formar estruturas semelhantes das micelas ao redor das cadeias polipeptídicas, expandindo as proteínas e que as proteínas com maior hidrofobicidade poderiam induzir a penetração de grupos hidrofílicos da MT no interior da membrana, causando sua ruptura e conseqüentemente a morte da célula.

Palavras-chave: Miltefosina; RPE; marcador de spin; membrana do eritrócito; Raft; *Leishmania*.

Abstract

Cutaneous leishmaniasis is a neglected tropical disease that infects millions of people worldwide, representing a serious public health problem. The miltefosine (MT) is an alkylphospholipid that has been approved for the treatment of breast cancer metastasis and visceral leishmaniasis, although the mechanism of action at the molecular level is poorly understood. Electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy of the lipid spin label analog of stearic acid (5-DSA) and the maleimide derivative spin label (6-MSL) covalently bound to membrane proteins showed that the MT causes a large increase in the molecular dynamics of erythrocyte membranes (ghosts) and detergent resistant membranes (DRMs) prepared from erythrocyte membranes. In the vesicles of lipid raft constituents, it was shown that 20 mol% sphingomyelin could be replaced by 20 mol% MT with no change in the molecular dynamics. Furthermore, the effect of MT on DRMs was more pronounced than in erythrocyte ghosts, supporting the hypothesis that MT is a lipid raft modulator. At the reported MT-plasma concentrations found during the treatment of leishmaniasis (31-52 $\mu\text{g/mL}$), our measurements in blood plasma indicated a hemolytic level of 2-5% and also showed that the MT concentration that changes the erythrocyte membrane fluidity to an extent that is detectable by EPR spectroscopy causes about 46% hemolysis. Subsequently, EPR studies performed with the same spin labels in the membrane of *Leishmania (L.) amazonensis* (promastigote) showed changes similar to those found in erythrocyte membranes. Cytotoxic effects on the parasites were also evaluated to investigate the relationships between the cytotoxic potential of MT and its ability to alter membrane fluidity. The EPR data showed that the minimum concentration of MT required to cause a change in the parasite membrane occurred near the values of MT concentration which inhibits 50 % of cell growth (IC_{50}); thus, there is a correlation between the cytotoxicity and changes in the membrane. Although these

membrane alterations can be detected using a spin-labeled lipid, our experimental results indicated that MT interacts predominantly with the protein component of the membrane. Cell lysis was also detected by analyzing the supernatants of centrifuged samples for the presence of spin-labeled membrane fragments and cytoplasmic proteins. Using a method for the rapid incorporation of MT into the membrane, these effects were measured immediately after treatment under the same range of MT concentrations that cause cell growth inhibition. Cytotoxicity, estimated via microscopic counting of living and dead cells, indicated ~70% cell death at the concentration of MT at which EPR spectroscopy detected a significant change in membrane dynamics. After this initial impact on the number of viable parasites, the processes of cell death and growth continued during the first 4 h of incubation. The EPR spectra of spin-labeled membrane-bound proteins were consistent with more expanded and solvent-exposed protein conformations, suggesting a detergent-like action. Thus, MT may form micelle-like structures around polypeptide chains, and proteins with a higher hydrophobicity may induce the penetration of hydrophilic groups of MT into the membrane, causing its rupture.

Keywords : Miltefosine; EPR; spin label; erythrocyte membrane; Rafts; *Leishmania*.

Lista de Figuras

1.1	Estrutura da molécula de miltefosina.	22
1.2	(A) mosquito-palha: gênero <i>Lutzomyia</i> transmissor da <i>Leishmania</i> . (B) protozoário do gênero <i>Leishmania</i> e causador da doença conhecida como leishmaniose.	24
1.3	Formas de leishmaniose cutânea: (a) localizada - lesão ulcerada franca, única, arredondada, com bordas elevadas e infiltradas e fundo granuloso. (b) disseminada - apresentando múltiplas lesões papulares, algumas com ulceração superficial. (c) difusa - lesões em placa infiltrada, com exulceração, tubérculos em face, orelha e membro superior. (d) mucocutânea - edema nasal com áreas de ulceração. (adaptada de [14]).	25
1.4	Evolução do quadro clínico da leishmaniose visceral (adaptado de Lindoso [15]).	26
1.5	Representação do ciclo biológico do gênero <i>Leishmania</i> (adaptada de [21]).	27
1.6	Fosfolipídios: possuem uma cabeça polar contendo um grupo fosfato e uma molécula polar ligada a ele e um ou dois ácidos graxos ligados, um dos quais contém uma ligação dupla <i>cis</i>	30
1.7	Todo esfingolipídio possui uma ceramida com sua base ligada a uma cadeia acila tipicamente saturada que varia entre 16 – 26 átomos de carbono. O grupo cabeça aqui denotado por R define o nome do esfingolipídio.	31

1.8	Colesterol: sua estrutura é constituída por uma região de 4 anéis de hidrocarbonetos ligados a um grupo hidroxila em uma ponta e a cauda de hidrocarbonetos na outra, sendo o grupo hidroxila a única parte hidrofílica da molécula, o que a torna insolúvel no sangue [40].	32
1.9	Agregados lipídicos anfipáticos em um meio aquoso. (a) Corte transversal de um lipossomo (b) Corte transversal da estrutura de uma micela (b) Corte transversal da estrutura de uma bicamada lipídica. (adaptada de [44])	33
1.10	Representação da fase ordenada $L_{\beta'}$, fase líquido-ordenado $P_{\beta'}$ e da fase fluida $L_{\alpha'}$ [47].	35
1.11	Representação esquemática da interação entre proteína e surfactante: (a) modelo “colar de pérolas”; (b) elipsóide prolato; (c) e (d) vista lateral e frontal, respectivamente, do modelo “hélice flexível” (adaptada de [51]).	38
1.12	Representação esquemática do modelo de membrana (mosaico fluido), formada por lipídios, colesterol e proteínas, separando o meio interno do meio externo da célula.	39
1.13	Representação esquemática dos lipídios formadores de membranas modelo de rafts.	41
1.14	Representação esquemática da estrutura de rafts lipídicos (Adaptada de [67]).	42
2.1	Diagrama de bloco simplificado de um espectrômetro de RPE de banda-X . Todos os componentes acima da linha pontilhada geralmente não ficam expostos, sendo construídos dentro de uma caixa retangular de onde sai uma guia de onda que liga a cavidade ressonante [72].	45
2.2	A componente S_z do momento angular de spin assume valor definido e igual a $-1/2 \hbar$ (no sentido negativo de z) e caso contrário $1/2 \hbar$ (no sentido positivo de z). A componente do momento angular de spin no plano perpendicular ao z não está definido, pois pode apontar em qualquer direção no plano xy . . .	48

2.3	Efeito de um campo de modulação de pequena amplitude e frequência de 100 kHz na saída do detector de corrente. O campo magnético estático \mathbf{B} é modulado entre os limites B_a e B_b , que gera uma variação na corrente do detector entre os limites i_a e i_b . O diagrama mostra o sinal de 100 kHz registrado e retificado em função de \mathbf{B} [73].	49
2.4	O spin do elétron: para campo zero ($B_0 = 0$) o spin dos estados α e β representados por setas para cima e para baixo têm a mesma energia zero. Na presença de um campo magnético estático ($B_0 \neq 0$) o spin do estado β tem menor e α maior energia. A separação de energia é proporcional à intensidade do campo magnético. Os níveis de energia são linearmente dependentes do fator g eletrônico.	52
2.5	Interação dipolo-dipolo entre o núcleo e o elétron: a figura representa a interação entre o momento magnético μ_e do elétron no estado quântico $m_S = -\frac{1}{2}$ e o momento magnético μ_N do núcleo indicado pelo estado quântico $I = \frac{1}{2}$. O ângulo θ é formado entre o vetor \vec{r} , que liga os dipolos, e o campo aplicado B_0	59
2.6	Forma química do radical nitróxido. R_1 e R_2 representam grupos químicos que variam de acordo com o marcador de spin.	63
2.7	Marcador de proteína, 6-MSL, e marcador lipídico 5-DSA (possui grupo nitróxido ligado ao 5°C carbono numa cadeia acila tipicamente saturada).	64
2.8	(a) Níveis de energia do elétron desemparelhado interagindo com o spin nuclear do nitrogênio do grupo nitróxido (estrutura hiperfina) numa região de campo magnético aplicado ao longo do eixo z . (b) primeira derivada do espectro de absorção.	65

2.9	Representação esquemática do oxigênio do radical nítróxido realizando ligação de hidrogênio, onde o hidrogênio polariza a ligação $N - O$ fazendo com que o elétron se localize mais próximo do núcleo do átomo de nitrogênio, aumentando assim a contribuição do acoplamento hiperfino isotrópico.	66
2.10	Orientação dos eixos principais dos tensores de segunda ordem \overleftrightarrow{g} e \overleftrightarrow{A} no radical nítróxido.	67
2.11	Espectro de RPE ilustrando a anisotropia do fator g e da constante de acoplamento hiperfino. (a) Campo magnético aplicado paralelo ao eixo z , (b) paralelo ao eixo y e (c) paralelo ao eixo x . (d) Espectro do marcador em solução (o radical gira rapidamente e a anisotropia do espectro desaparece, sendo observado apenas a média) e (e) espectro obtido de pó de cristal triturado a -70°C , onde aparecem contribuições de todas as orientações ao mesmo tempo.	68
2.12	Espectro de RPE do marcador de spin "5-doxyl stearic acid"(5-DSA) obtido em temperatura ambiente com a indicação do parâmetro espectral $2A_{\parallel}$	70
2.13	Espectro de RPE do marcador de spin "5-doxyl stearic acid"(5-DSA) para movimento rápido, com a indicação dos parâmetros espectrais usados na determinação do tempo de correlação rotacional.	72
2.14	Representação esquemática do marcador de spin 5-DSA com alguns eixos dos sistemas de coordenadas. O eixo z_d é o diretor local da membrana, z_r é o eixo de simetria da cadeia acila sendo paralelo ao diretor local, R_{\parallel} e R_{\perp} são os valores principais do tensor de difusão, θ é o ângulo de inclinação da cadeia acila relativo ao eixo, z_r está relacionado com o parâmetro de ordem e x_m , y_m e z_m são os eixos magnéticos do radical nítróxido [84].	74
4.1	Princípio da quantificação de proteína pelo método BCA.	83

4.2	Curva de calibração utilizada para determinar a concentração de proteínas nas amostras de ghosts e DRMs das membranas de eritrócitos.	84
5.1	Espectros de RPE do marcador 5-DSA em vesículas de várias composições de lipídios e seus correspondentes valores do parâmetro $2 A_{ }$. Como indica na figura o $2 A_{ }$ é a separação em unidades de campo magnético entre o primeiro pico e o último vale (indicados por linhas verticais) do espectro. Este parâmetro diminui com o aumento da fluidez da bicamada lipídica; seu erro experimental é de 0,5 G.	91
5.2	Espectros de RPE sobrepostos e os correspondentes valores do $2 A_{ }$ do marcador 5-DSA em vesículas compostas por SM-POPC-Chol-MT em diversas proporções molares. Os dados acima e abaixo do par de espectros sobrepostos referem-se a espectros representados por linhas vermelhas e pretas, respectivamente. As diferenças nos valores do $2 A_{ }$ para os espectros sobrepostos não excedem o erro experimental de 0,5 G.	92
5.3	Espectros de RPE do marcador de spin 5-DSA em amostras de ghosts e DRMs de eritrócito para amostras não tratadas e amostras tratadas com miltefosina. As linhas verticais melhoraram a visualização das mudanças no parâmetro $2 A_{ }$	93
5.4	Parâmetro espectral $2 A_{ }$ do marcador de spin 5-DSA em amostras de ghosts e DRMs de eritrócito em função da concentração de miltefosina. As médias e desvios padrão foram calculados a partir de três experimentos independentes.	94
5.5	Espectros de RPE do marcador de spin 6-MSL covalentemente ligado aos grupos sulfidrila dos ghosts e DRMs de eritrócito para amostras não tratadas (controle) e para amostras tratadas com diferentes concentrações de MT. A região do último pico (invertido) no espectro foi ampliada 10 vezes para facilitar a visualização da posição de campo magnético deste pico.	95

5.6	Parâmetro de RPE $2 A_{\parallel}$ do marcador de spin 6-MSL ligado às proteínas de ghosts e DRMs de eritrócito como uma função da concentração de MT. . . .	96
5.7	Efeitos da miltefosina em diferentes concentrações no plasma sanguíneo sobre o parâmetro de RPE $2 A_{\parallel}$ do marcador de spin 6-MSL nas membranas de eritrócito intacto (quadrados) e percentagem de hemólise (círculos). Os dois primeiros pontos experimentais indicados pelas setas são $30 \mu\text{g/mL}$ ($2,0 \pm 0,6\%$ de hemólise) e $52 \mu\text{g/mL}$ ($3,1 \pm 0,8\%$ de hemólise). Os dados experimentais são de dois experimentos independentes de RPE e três para a hemólise.	97
5.8	Espectros de RPE do marcador 5-DSA nas membranas plasmáticas de <i>Leishmania</i> , com ou sem tratamento com MT. Os espectros de melhor ajuste (linha vermelha) foram fornecidos pelo programa NLLS usando um modelo de duas componentes em todos os ajustes para obter a média do tempo de correlação rotacional, τ_c . Os valores dos parâmetros de RPE τ_c e $2 A_{\parallel}$ estão indicados. Estes dois parâmetros diminuem com o aumento da fluidez da membrana. Os erros experimentais obtidos para o τ_c e o $2 A_{\parallel}$ são $0,2 \text{ ns}$ e $0,5 \text{ G}$, respectivamente.	99
5.9	Espectros de RPE do marcador 6-MSL ligado covalentemente ao grupo sulfidril da membrana plasmáticas de <i>Leishmania</i> para amostras com ou sem tratamento com MT.	100
5.10	O parâmetro $2 A_{\parallel}$ para os marcadores de spin 5-DSA e 6-MSL em membranas de <i>Leishmania</i> como uma função da concentração de MT. As amostras tratadas com uma concentração de $0,44 \times 10^9 \text{ MT/célula}$ foram significativamente diferentes das amostras de controle $P < 0,05$ para ambos os marcadores de spin, e todas as outras amostras foram diferentes das do controle com $P < 0,01$	101

5.11	Ilustração esquemática do modelo molecular do marcador de spin 6-MSL ligado covalentemente ao grupo sulfidríla da proteína. O radical nítróxido pode formar ligações de hidrogênio com o grupo amida da cadeia principal da proteína, gerando a componente fortemente imobilizada (<i>S</i>), ou com as moléculas de água para gerar a componente fracamente imobilizada (<i>W</i>). Também há uma possível formação de ligação de hidrogênio entre a proteína e os dois átomos de oxigênio do anel maleimido, prendendo fortemente o marcador à dobra da cadeia polipeptídica.	102
5.12	Espectros de RPE experimental (linha preta) e de melhor ajuste (linha vermelha) do 6-MSL ligado aos grupos <i>SH</i> de proteínas de membrana de <i>Leishmania</i> em amostras não tratadas e tratadas com MT. Os espectros de melhor ajuste foram obtidos pelo programa NLLS usando um modelo com duas componentes em todos os ajustes. Os espectros das componentes <i>S</i> e <i>W</i> , que juntos formam o espectro simulado da amostra de controle (primeiro espectro) são indicados pela linha verde (<i>S</i>) e linha azul (<i>W</i>). Os valores de três parâmetros de RPE estão indicados: τ_c (tempo de correlação rotacional) e N_S (população da componente <i>S</i>), os quais foram gerados pelo programa de ajuste e o $2 A_{ }$ que é medido diretamente no espectro, como indicado pelas linhas verticais. As regiões correspondentes as primeiras e últimas linhas de ressonância do espectro foram amplificadas 10 vezes para melhorar a visualização das posições do campo magnético.	104
5.13	Os espectros de RPE do marcador de spin 6-MSL ligado covalentemente aos grupos sulfidrílas das membranas de <i>Leishmania</i> presentes no sobrenadante das amostras de <i>Leishmania</i> tratadas com MT. Com o aumento na concentração de MT, as amostras mostraram um aumento de fragmentos de membranas marcadas no sobrenadante.	105

5.14	Porcentagem de lise celular (círculos sólidos) e conteúdo de membrana marcada no sobrenadante (círculos abertos) em amostras de <i>Leishmania</i> tratadas com MT. As medições de lise foram baseadas no conteúdo de proteína no sobrenadante das amostras de <i>Leishmania</i>	106
5.15	Contagem de células nas amostras de <i>Leishmania</i> em função da concentração de MT utilizada no tratamento. Células vivas e mortas foram contadas através do método de exclusão do azul de tripan, 1 a 5 minutos após o tratamento das <i>L. amazonensis</i> promastigotas em PBS ou meio de cultura.	107
5.16	Números de células vivas e mortas em amostras de <i>Leishmania</i> não tratadas e tratadas com MT ($0,44 \times 10^9$ MT/célula) em meio de cultura para vários períodos de incubação a 26 °C.	108
5.17	Viabilidade das <i>Leishmanias</i> em função da concentração de MT pelo método de MTT.	109

Lista de Tabelas

2.1	Lista dos parâmetros de entrada usados no programa NLLS para a realização da simulação teórica dos espectros experimentais [83].	73
5.1	Atividade <i>in vitro</i> de MT contra promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	110

Lista de Abreviaturas

5 – *DSA* 5-doxil ácido esteárico

6 – *MSL* 4-maleimido-1-oxil-2,2,6,6-tetrametilpiperidina;

β_e Magneton de Bohr

\hbar Constante de Planck/ 2π

μ_e Momento magnético eletrônico

μ_N Momento magnético nuclear

ω Frequência angular de Larmor

\overleftrightarrow{A} Tensor de acoplamento hiperfino

τ_c Tempo de correlação rotacional

a_0 Constante de desdobramento hiperfino

BCA Bicinchoninic acid (ácido bicinconínico);

BSA Albumina de soro bovino;

Chol Colesterol

CMC Concentração Micelar Crítica

DPPC 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfolina

DRM Membrana resistente ao detergente

EDTA Ethylenediamine tetraacetic acid (ácido etilendiamino tetra-acético);

FCS Soro fetal bovino inativado pelo calor

IC₅₀ concentração inibidora de 50%;

k_B Constante de Boltzmann

L_{α'} Fase lipídica fluida

L_{β'} Fase lipídica ordenada

LC Leishmaniose Cutânea

LV Leishmaniose Visceral

MT Miltefosina

MTT 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide;

NLLS Nonlinear Least-Square;

OMS Organização Mundial de Saúde

P_{β'} Fase lipídica líquido-ordenado

PAGE Eletroforese em gel de poliacrilamida

PBS Phosphate buffered saline (Tampão fosfato salina);

POPC 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina

RPE Ressonância Paramagnética Eletrônica

S Momento angular do spin do elétron

SDS Dodecil sulfato de sódio

SM 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (esfingomielina)

T_1 Tempo de relaxação spin-rede

T_2 Tempo de relaxação spin-spin ou transversal

Sumário

Resumo	I
Abstract	III
Lista de Figuras	V
Lista de Tabelas	XII
Lista de Abreviaturas	XIII
1 Introdução	22
1.1 A Leishmaniose	23
1.2 Proliferação da Doença pelo Mundo	28
1.3 Mecanismo de Ação da MT	29
1.4 Composição e Estrutura da Membrana Plasmática	30
1.5 Comportamento Lipídico em Meio Aquoso	32
1.6 Comportamento da Fase Lipídica	34
1.7 Proteínas de Membranas	36
1.8 Interação Proteína-Detergente	36
1.9 Propriedades Estruturais da Membrana Plasmática	38
1.10 Composição Lipídica dos Rafts	40
2 Introdução à Técnica de RPE e Aplicações em Sistemas Biológicos	44
2.1 Breve Histórico	44

2.2	O Espectrômetro e a Técnica de RPE	45
2.3	Detecção do sinal de RPE sensível à fase	48
2.4	Spin do Elétron em um Campo Magnético (Efeito Zeeman)	50
2.5	Descrição Semi-Clássica da Ressonância Magnética	53
2.6	Distribuição da População dos Níveis de Energia	54
2.7	Processos de Relaxação Spin-Rede e Spin-Spin	56
2.8	Spin Nuclear e Interação Hiperfina	58
2.9	O Fator g	61
2.10	O Método de Marcador de Spin	62
2.11	Anisotropia Espectral e o Parâmetro $2A_{ }$	67
2.12	Simulação do Espectro de RPE	70
2.13	Tempo de Correlação Rotacional	71
3	Objetivos	78
3.1	Objetivos Gerais	78
3.2	Objetivos específicos	78
4	Materias e Métodos	80
4.1	Reagentes Químicos e Parasitos	80
4.2	Preparação e Marcação de Vesículas de Lipídios Constituintes de Rafts	81
4.3	Preparação das Membranas de Eritrócito	81
4.4	Purificação do DRM	82
4.5	Quantificação de Proteína em Ghosts e DRMs de Membranas de Eritrócito	83
4.6	Potencial Hemolítico da Miltefosina	84
4.7	Incorporação dos Marcadores nas Membranas e Tratamento com Miltefosina	85
4.8	Medições da Ruptura da Membrana de <i>Leishmania</i>	87

4.9	Ensaio de Atividade Antiproliferativa <i>in Vitro</i>	87
4.10	A Espectroscopia de RPE	88
4.11	Análise Estatística	89
5	Resultados	90
5.1	Efeito da Miltefosina em Vesículas Preparadas com Lipídios Formadores de Rafts	90
5.2	Efeito da miltefosina em ghosts e DRMs de Eritrócito	93
5.3	Efeito da Miltefosina em Membranas de Eritrócito Medido no Sangue Total	97
5.4	Efeito da Miltefosina em Membranas de <i>Leishmania</i>	98
5.5	Miltefosina Induz Lise em <i>Leishmania</i>	104
5.6	Medidas de Citotoxicidade da Miltefosina em <i>Leishmania</i>	106
6	Discussão	112
7	Conclusões	117
	Bibliografia	118
A	Publicação J. Pharm Sci.	134
B	Publicação Antimicrob. Agents Chemother.	135

Capítulo 1

Introdução

Os estudos sobre as membranas biológicas se tornaram muito importantes para a produção de novos fármacos e nos últimos anos as pesquisas sobre a ação de medicamentos na membrana celular têm chamado a atenção de muitos pesquisadores, pois se estima que mais de 70% dos fármacos disponíveis atuam por via de proteínas de membrana [1]. Apesar de vários fármacos apresentarem os efeitos esperados, alguns ainda não possuem os mecanismos de ação bem compreendidos, como é o caso, por exemplo, da miltefosina (MT).

A MT Figura 1.1 é um alquilfosfolipídio sintético que foi originalmente desenvolvido como um fármaco anticancerígeno, sendo aprovado como o primeiro medicamento oral para o tratamento da leishmaniose visceral.

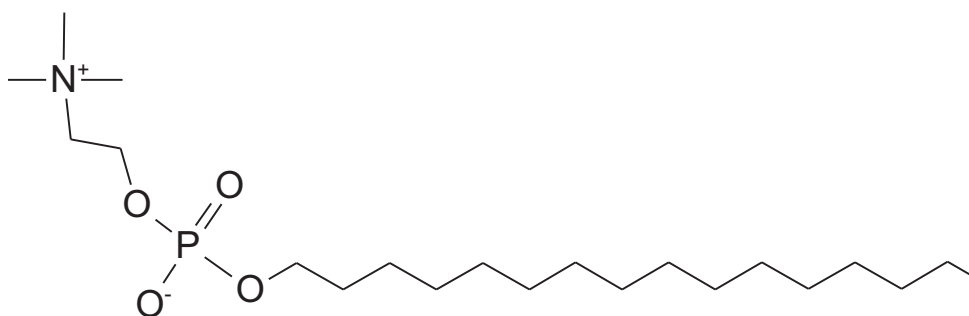


Figura 1.1: Estrutura da molécula de miltefosina.

Levando-se em conta a importância das leishmanioses em todo mundo e as dificuldades envolvidas em seus tratamentos, tais como resistência aos antimoniais, a MT surgiu como um medicamento promissor para o tratamento da leishmaniose visceral, sendo administrado por via oral e com menos efeitos colaterais. Este fármaco foi registrado na Índia em 2002 (como Impavido[®]), na Alemanha em 2004 e na Colômbia em 2005 [2, 3], tendo demonstrado altos índices de cura para o tratamento de leishmaniose visceral [4], cutânea [5–7] e mucosa [8].

Embora muitos estudos tenham sido realizados para identificar os mecanismos de ação da MT contra células tumorais [9] e parasitas [10], estes mecanismos ainda não estão bem compreendidos. No entanto, como a MT é uma molécula com alta afinidade por membrana, tem sido considerado que a membrana plasmática pode ser seu alvo primário [9, 11, 12]. Recentemente foi reportado por Dorlo e colaboradores [10], que mecanismos de ação da MT propostos contra *Leishmania* e células cancerosas humanas são muito semelhantes e geralmente atribuem a atividade da MT a apoptose desencadeada pela inibição da sinalização celular dependente de lipídio e da troca de fosfolipídio [9–12].

1.1 A Leishmaniose

A leishmaniose (tegumentar ou visceral) é uma doença causada por diferentes espécies de parasitos protozoários do gênero *Leishmania* (Figura 1.2 B) sendo transmitida ao hospedeiro vertebrado pela picada da fêmea de flebotomíneo (inseto vetor) do gênero *Lutzomyia*, conhecido popularmente, dependendo da localização geográfica, como mosquito palha (Figura 1.2 A). Considerada um grande problema de saúde pública, representa um complexo de doenças com importante espectro clínico e diversidade epidemiológica.

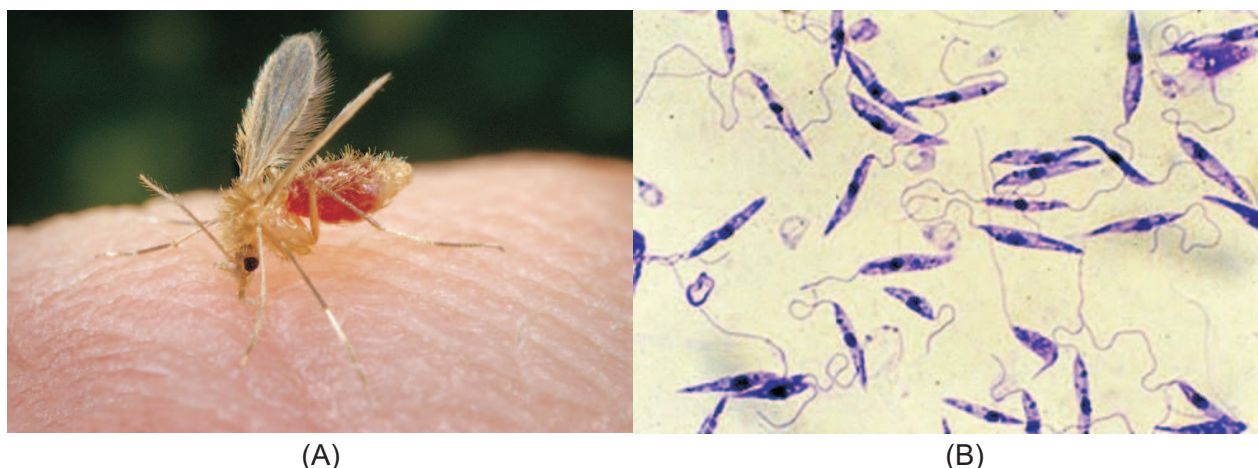


Figura 1.2: (A) mosquito-palha: gênero *Lutzomyia* transmissor da *Leishmania*. (B) protozoário do gênero *Leishmania* e causador da doença conhecida como leishmaniose.

Devido a multiplicidade de espécies de *Leishmania*, flebótomos vetores e reservatórios vertebrados em diferentes ambientes geográficos, a leishmaniose tegumentar pode apresentar formas clínicas diversificadas, como por exemplo, a forma cutânea (LC) localizada, que é a forma mais comum tratando-se de uma infecção na pele geralmente do tipo úlcera, sendo indolor com formato arredondado ou ovalado, medindo de alguns milímetros até alguns centímetros com base eritematosa infiltrada e de consistência firme, de bordas bem delimitadas e elevadas, com fundo avermelhado e com granulações grosseiras (figura 1.3 a). No entanto, a leishmaniose cutânea pode apresentar outros quadros clínicos.

A forma disseminada da leishmaniose cutânea (figura 1.3 b) é caracterizada pelo aparecimento de múltiplas lesões papulares e de aparência acneiforme que acometem vários segmentos corporais, envolvendo com frequência a face e o tronco, sendo relativamente rara e podendo ser observada em até 2% dos casos. A forma difusa da doença (figura 1.3 c) também constitui uma forma clínica rara, porém grave, que ocorre em pacientes com anergia e deficiência específica na resposta imune celular a antígenos de *Leishmania*, iniciando lentamente, com lesão única e má resposta ao tratamento e evoluindo com

formação de placas e múltiplas nodulações não ulceradas, recobrimdo grandes extensões cutâneas [13]. Dentre as formas de leishmaniose tegumentar, a mucocutânea (figura 1.3 d) é a mais grave, sendo clinicamente caracterizada por lesões desfigurantes localizadas nas mucosas das vias aéreas superiores.



(a)



(b)



(c)



(d)

Figura 1.3: Formas de leishmaniose cutânea: (a) localizada - lesão ulcerada franca, única, arredondada, com bordas elevadas e infiltradas e fundo granuloso. (b) disseminada - apresentando múltiplas lesões papulares, algumas com ulceração superficial. (c) difusa - lesões em placa infiltrada, com exulceração, tubérculos em face, orelha e membro superior. (d) mucocutânea - edema nasal com áreas de ulceração. (adaptada de [14]).

Acredita-se que a lesão mucosa metastática ocorra por disseminação hematogênica ou linfática. Geralmente surge após a cura clínica da LC, com início insidioso e pouca sintomatologia. Na maioria dos casos, a forma mucocutânea da doença resulta da forma cutânea de evolução crônica e curada sem tratamento ou com tratamento inadequado. Pacientes com lesões cutâneas múltiplas e extensas com mais de um ano de evolução, localizadas acima da cintura, são os grupos com maior risco de desenvolver metástases¹ para a mucosa [14].

A leishmaniose visceral (LV) é a forma crônica da doença mais grave, podendo ser fatal se não tratada. Os principais sintomas da leishmaniose visceral são: febres intermitentes com semanas de duração, fraqueza, perda de apetite, emagrecimento, anemia, palidez, aumento do baço e do fígado, comprometimento da medula óssea, problemas respiratórios, diarreia, sangramentos na boca e no intestino [16]. A evolução clínica da LV pode ser visto na figura (1.4).



Figura 1.4: Evolução do quadro clínico da leishmaniose visceral (adaptado de Lindoso [15]).

¹Metástase é a formação de uma nova lesão tumoral a partir de outra, mas sem continuidade entre elas de forma que as células neoplásicas se desprendem do tumor primário e caminhando entre as células vão para um local distante onde formam uma nova colônia neoplásica.

Além dos sinais clínicos apresentados, a doença pode ser diagnosticada por exames laboratoriais, tais como: testes sorológicos (Elisa e reação de imunofluorescência), e de punção da medula óssea para detectar a presença do parasita e de anticorpos. É fundamental que se faça um diagnóstico precoce para evitar complicações.

O ciclo de vida do parasito é bem complexo (figura esquemática 1.5), envolvendo várias formas de desenvolvimento para se adaptar as diversas condições ambientais encontradas dentro do inseto vetor e do hospedeiro vertebrado, podendo ser roedores, canídeos, marsupiais e humanos.

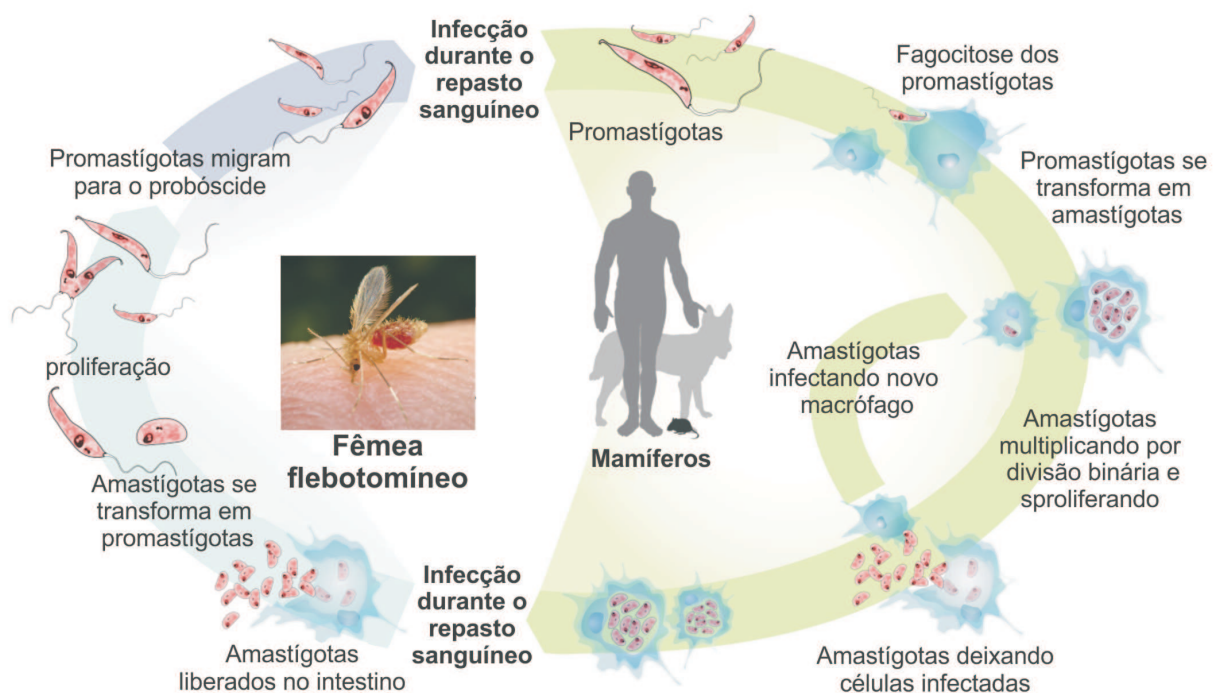


Figura 1.5: Representação do ciclo biológico do gênero *Leishmania* (adaptada de [21]).

Durante o repasto sanguíneo com hospedeiro contaminado, as fêmeas dos flebotomíneos adquirem as formas amastigotas (formas aflageladas) do parasito, que rapidamente se transformam em promastigotas (formas flageladas) no intestino dos vetores.

Essas formas dividem-se ativamente e, no novo repasto sanguíneo, são injetadas na pele do hospedeiro. A saliva do inseto auxilia na proliferação dos protozoários, pois apresenta neuropeptídios vasodilatadores que facilitam a alimentação dos vetores e, ao mesmo tempo, suprime a resposta imune dos hospedeiros [17, 18]. No entanto, os parasitos não conseguem penetrar ativamente nas células e ficam dependentes da ação fagocítica da mesma, principalmente através de interações entre receptores celulares do hospedeiro (CR1, CR3, manose-fucose) e moléculas de superfície do micro-organismo, principalmente os lipofosfoliglicanos (LPG) e a protease de superfície (GP63). Através destes receptores, os parasitos se ligam aos macrófagos, sendo fagocitados, porém, é retardada a ação do mecanismo microbicida dos macrófagos, permitindo a adaptação da *Leishmania* ao meio [19, 20].

1.2 Proliferação da Doença pelo Mundo

Esta doença é endêmica em 88 países e de acordo com as estimativas da Organização Mundial de Saúde (OMS) [22], 350 milhões de pessoas estão expostas ao risco e cerca de 12 milhões de pessoas no mundo estão infectadas, com 1,5 a 2 milhões de novos casos a cada ano. A forma de LV tem uma incidência estimada de 500.000 novos casos e 60.000 mortes a cada ano. Apesar dos 193 países da Organização Mundial da Saúde (OMS) terem assinado em 2007 um acordo para tentar controlar e conter os avanços da leishmaniose, ainda não se tem uma diminuição significativa dos casos, principalmente nos países mais pobres que é onde se concentra a maioria dos casos.

Mais de 90% dos casos mundiais de LV ocorrem em seis países: Índia, Bangladesh, Sudão, Sudão do Sul, Etiópia e Brasil. Em um grande estudo de fase 4 na Índia, com 1.132 pacientes adultos e pediátricos com LV tratados com MT, a taxa final de cura foi de 82% pela análise de intenção de tratamento e 95% pela análise por protocolo [4].

Efeitos adversos deste estudo ocorreram em aproximadamente 3% dos pacientes, e foram principalmente sintomas gastrointestinais (náuseas e vômitos), elevação da aspartato transaminase, alanina transaminase, ou os níveis de creatinina sérica (indica danos ao funcionamento de néfrons) [4]. No Brasil, em 2011, foram confirmados 3.894 casos de LV com 262 óbitos, sendo a região norte a mais afetada, correspondendo a mais de 47% dos casos [23].

1.3 Mecanismo de Ação da MT

Vários mecanismos de ação para MT contra células tumorais e de parasitas foram relatados e revistos recentemente por Dorlo e colaboradores [10], e tem sido proposto que os análogos da MT como o lisofosfolipídio [24–26] e a edelfosina [27–31] possuem uma afinidade por microdomínios de plataforma lipídica “lipid raft” e pode ser absorvido pelas células de uma forma dependente do raft.

Plataformas lipídicas (rafts) são conjuntos de esfingolipídios e colesterol que seriam associados às proteínas específicas, formando microdomínios localizados na membrana com algumas funções celulares como, por exemplo, o tráfego de lipídios intracelulares e sinalização celular [25]. Os rafts têm seu funcionamento sugerido como portas da membrana, essenciais para entrada celular de alquilfosfolipídios, tais como a edelfosina, perifosina, erucilfosfocolina e o composto D-21805, em células de linfoma para induzir apoptose [24]. Outros relatos propuseram que a capacidade da MT para promover uma morte celular semelhante a apoptose é crítica para a sua atividade leishmanicida [32–35]. No entanto, são apenas propostas sugeridas por estes pesquisadores e que ainda necessitam de mais estudos para se chegar numa resposta conclusiva do real mecanismo de ação deste fármaco.

Neste trabalho será feita uma investigação da ação da MT sobre *Leishmania*. Porém, antes de avaliar os efeitos da MT diretamente na membrana dos parasitos, foi realizado um estudo de sua interação com membranas do eritrócito e seus DRMs que são de mais fácil obtenção. Além disso, foram estudados os efeitos da MT em concentrações sanguíneas típicas do tratamento da leishmaniose sobre a hemólise e alteração de fluidez na membrana do eritrócito.

1.4 Composição e Estrutura da Membrana Plasmática

A membrana plasmática é composta por lipídios e proteínas de membrana [36], sendo que os lipídios correspondem a 50% de sua massa. A maioria dos lipídios pertence ao grupo dos fosfolipídios que são formados pela união de três grupos de moléculas menores: um álcool, geralmente o glicerol, duas moléculas de ácidos graxos e um grupo fosfato, que pode conter ou não uma segunda molécula de álcool. A forma esquemática da estrutura desta molécula esta apresentada na Figura 1.6.

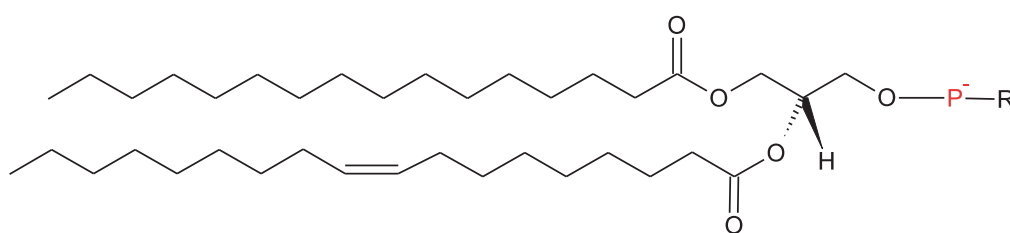


Figura 1.6: Fosfolipídios: possuem uma cabeça polar contendo um grupo fosfato e uma molécula polar ligada a ele e um ou dois ácidos graxos ligados, um dos quais contém uma ligação dupla *cis*.

Membranas de células eucarióticas como os eritrócitos, contêm também mais duas classes de lipídios: esteróis e esfingolipídios [37]. Os esfingolipídios que constituem a

segunda maior classe dos lipídios são formados por uma única molécula de ácido graxo de cadeia longa ligada a uma molécula de esfingosina ou um de seus derivados e uma cabeça polar. Quando o ácido graxo está ligado como uma amida ao grupo NH_2 da esfingosina o composto resultante é a ceramida que é o precursor estrutural de todos os esfingolipídios. Existem três classes de esfingolipídios dentre elas a esfingomielina que possui como grupo cabeça a fosfocolina. Embora os níveis precisos destes lipídios variem de acordo com o tipo de célula, a esfingomielina corresponde entre 10 – 20 $mol\%$ dos lipídios da membrana plasmática. A Figura 1.7 a seguir mostra a estrutura de um esfingolipídio.

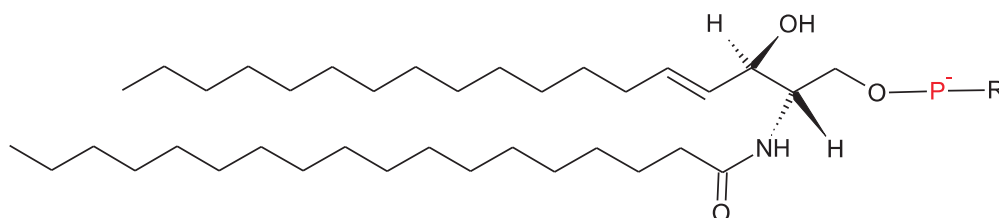


Figura 1.7: Todo esfingolipídio possui uma ceramida com sua base ligada a uma cadeia acila tipicamente saturada que varia entre 16 – 26 átomos de carbono. O grupo cabeça aqui denotado por R define o nome do esfingolipídio.

Os esteróis são baseados em uma estrutura rígida de quatro anéis, sendo o colesterol a principal forma encontrada nos vertebrados. O colesterol que normalmente corresponde de 30 – 40 $mol\%$ dos lipídios da membrana plasmática [38] é o lipídio que mais recebe atenção devido à forte correlação existente entre seus altos níveis no sangue e a incidência de doenças do sistema cardiovascular [39]. Sua presença na célula é de suma importância, pois diminui as propriedades de permeabilidade da dupla camada lipídica tornando a bicamada menos sujeita a deformações e, assim, reduz a permeabilidade da membrana. A estrutura do colesterol pode ser observada na Figura 1.8.

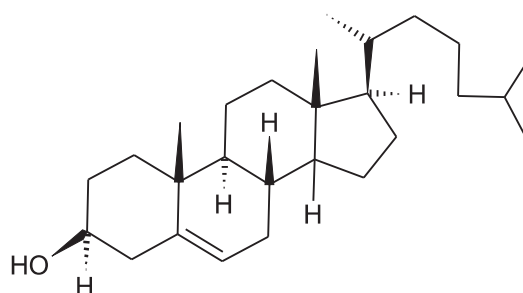


Figura 1.8: Colesterol: sua estrutura é constituída por uma região de 4 anéis de hidrocarbonetos ligados a um grupo hidroxila em uma ponta e a cauda de hidrocarbonetos na outra, sendo o grupo hidroxila a única parte hidrofílica da molécula, o que a torna insolúvel no sangue [40].

O colesterol também é considerado um composto essencial para a vida, pois está presente nos tecidos de todos os animais, sendo ele um reagente de partida para a biossíntese de vários hormônios, do ácido biliar e da vitamina D [41].

1.5 Comportamento Lipídico em Meio Aquoso

A solubilidade dos lipídios em água é muito baixa assim, as moléculas anfílicas, devido ao efeito hidrofóbico, formam agregados com uma estrutura bem definida em soluções aquosas. A concentração a partir da qual esses agregados começam a ser formados é conhecida como concentração micelar crítica (CMC). Uma vez atingida a CMC, todos os lipídios adicionados a solução participam na formação dos agregados ao invés de existirem como monômeros livres em solução [42]. Os lipídios possuem uma parte hidrofóbica e a outra hidrofílica e quando expostos em água os grupos da cabeça polar (extremidade hidrofílica) ficam na interface entre o meio aquoso e o lipídio, e as caudas hidrofóbicas interagem entre si, criando uma região interna hidrofóbica que exclui a água. Essas moléculas dependendo do formato podem formar estruturas tais como as micelas, bicamandas ou lipossomos.

As micelas são estruturas esféricas de lipídios que se agrupam de tal forma que suas regiões hidrofóbicas se agregam no interior, de onde a água é excluída, expondo então os grupos polares na superfície em contato com a água.

Outro tipo de agregação de lipídios em água é a bicamada, onde duas monocamadas de lipídios formam uma estrutura laminar bidimensional. Este tipo de estrutura lipídica constitui a base de todas as membranas biológicas que geralmente se forma quando a área ocupada pela cabeça polar no plano da membrana é aproximadamente a mesma dos ácidos graxos que constitui o lipídio. As bicamadas lipídicas constituem estruturas bastante estáveis, sendo mantidas juntas por interações hidrofóbicas entre as cadeias de hidrocarboneto dos ácidos graxos e interações iônicas entre os grupos carregados da cabeça e a água. À medida que esta estrutura laminar se estende, suas extremidades se dobram espontaneamente isolando o meio aquoso interno do meio externo formando assim, outro tipo de agregado lipídico denominado vesícula ou lipossomo que pode ter um diâmetro médio variando em torno de 20 a 5000 *nm* [43]. A Figura 1.9 mostra estes três tipos de agrupamentos lipídicos.

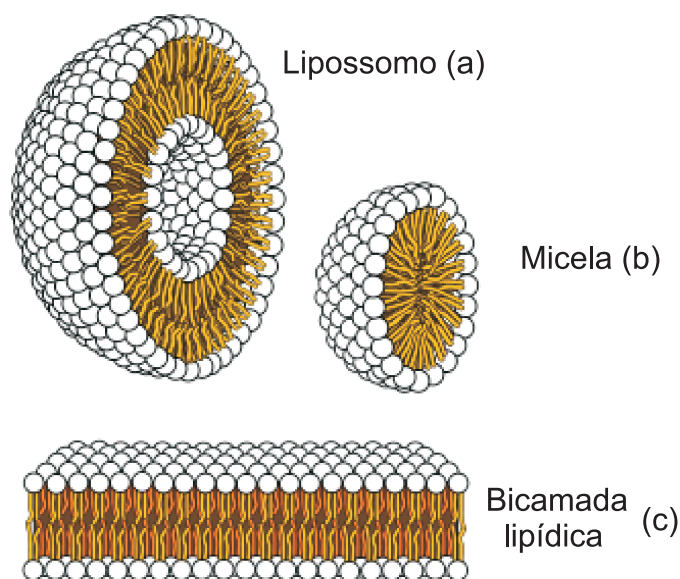


Figura 1.9: Agregados lipídicos anfipáticos em um meio aquoso. (a) Corte transversal de um lipossomo (b) Corte transversal da estrutura de uma micela (b) Corte transversal da estrutura de uma bicamada lipídica. (adaptada de [44])

Os lipossomas dependendo do formato, tamanho, e algumas características físico-químicas, possuem a capacidade de encapsular compostos hidrofílicos no seu interior aquoso e compostos hidrofóbicos nas bicamadas lipídicas, sendo possível a sua utilização como transportadores de fármacos [45].

1.6 Comportamento da Fase Lipídica

Embora sejam bem estáveis estas estruturas laminares, os fosfolipídios e esteróis que a compõe exibem algumas liberdades dinâmicas. Assim, para obtermos uma melhor compreensão das biomembranas, torna-se fundamental conhecermos sua estrutura detalhada e os princípios termodinâmicos que dão a estabilidade da bicamada lipídica. Quando a bicamada é bem hidratada e possui apenas um tipo de fosfolipídio ela sempre mostra uma transição de fase bem definida, de modo que as cadeias lipídicas passam de um estado ordenado (gel) para um estado fluido (líquido-cristalino).

Do ponto de vista físico, as bicamadas lipídicas podem ser descritas como cristais líquidos demonstrando um complexo comportamento de fase dependendo tanto da temperatura como da concentração de lipídio. A fase ordenada é chamada de $L_{\beta'}$ e a fase fluida de $L_{\alpha'}$. No entanto, quando se eleva a temperatura da bicamada para alguns fosfolipídios, existe uma fase de pré-transição ou líquido-ordenado $P_{\beta'}$, onde a bicamada fica ondulada, entre a fase gel e a fase fluida [46]. A fase ordenada ($L_{\beta'}$) surge em baixas temperaturas por moléculas lipídicas que formam estruturas laminares, sendo que nessa fase os lipídios se encontram empacotados (muito juntos) e as cadeias hidrocarbônicas se encontram ordenadas com conformações todas trans. A Figura 1.10 mostra as duas fases bem definidas e o estado de transição entre elas.

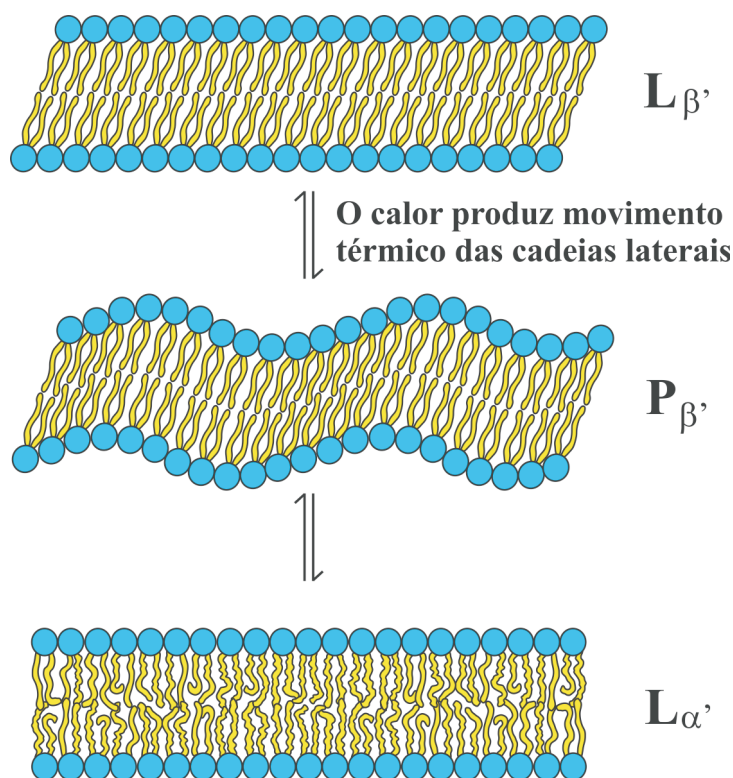


Figura 1.10: Representação da fase ordenada $L_{\beta'}$, fase líquido-ordenado $P_{\beta'}$ e da fase fluida $L_{\alpha'}$ [47].

Uma vez que as conformações das cadeias hidrocarbônicas estão todas trans, a área transversal das moléculas de fosfolípídios se torna mínima, ao passo que a espessura da bicamada se torna máxima, e ambos os movimentos internos e externos da molécula ficam fortemente restringidos. Já na fase fluida ($L_{\alpha'}$) existe uma maior agitação térmica no interior da bicamada de forma que a espessura da bicamada se torna menor do que na fase ordenada, sendo geralmente aceito que isto leva ao aparecimento de defeitos nas estruturas formadas pelas cadeias hidrocarbônicas.

Além dos lipídios, a membrana celular possui uma variedade de proteínas, tais como as proteínas integrais que são as principais componentes funcionais da membrana plasmática [48], as proteínas periféricas que estão aderidas nas extremidades das proteínas integrais ou ancoradas a um lipídio podendo atuar como transportadoras de substâncias para dentro ou para fora da célula, entre elas estão as glicoproteínas que são proteínas ligadas a carboidratos.

1.7 Proteínas de Membranas

As proteínas são macromoléculas orgânicas, constituídas por um ou mais polipeptídios que por sua vez são constituídos por aminoácidos sintetizados pelos organismos vivos através da condensação de um grande número de moléculas alfa-aminoácido, por meio de ligações peptídicas. Os aminoácidos por meio das ligações peptídicas formam estruturas globulares ou fibrosas de alto peso molecular e são consideradas as macromoléculas mais importantes das células e, para muitos organismos, constituem quase 50% de suas massas [49]. Do ponto de vista químico as proteínas são as estruturas de maior complexidade apresentando um grau de funcionalidade fantástico. No corpo humano, por exemplo, são produzidas cerca de 100.000 proteínas, com cada uma delas podendo possuir cerca de centenas de aminoácidos como é o caso da hemoglobina.

Todos os 20 tipos de aminoácidos existentes são dotados de um grupo amino, um carbono- α , um grupo carboxila e uma cadeia lateral, sendo esta a única diferença entre os aminoácidos. Os aminoácidos podem fazer ligações peptídicas entre si com diferentes combinações capazes de formar uma infinidade de proteínas, possuindo quatro níveis estruturais chamados: estrutura primária, secundária, terciária e quaternária.

1.8 Interação Proteína-Detergente

Os detergentes (surfactantes) são compostos orgânicos de características anfífilas, isto é, possui um grupo apolar de natureza alifática (hidrofóbica), e um grupo polar (hidrofílico) na mesma molécula. Além dos detergentes, os sabões e os próprios fosfolipídios que formam a estrutura básica das membranas biológicas são moléculas anfífilas. A parte hidrofóbica denominada de “cauda” é pouco solúvel em água, mas é solúvel em mui-

tos solventes apolares. Por outro lado os grupos hidrofílicos denominados de “cabeça” podem ser carregados, tais como os grupos fosfato, amino, sulfato, carboxil, ou neutros como os grupos hidroxila, carbonila e éster. Os detergentes quando diluídos em solução aquosa em baixas concentrações, agem como eletrólitos normais, mas em altas concentrações eles formam micelas com um grande número de moléculas como mostrado na Figura 1.9. A forma e tamanho dos agregados dependem da natureza do grupo polar “cabeça”, da natureza e comprimento do grupo apolar “cauda”, da concentração, temperatura e do próprio método de preparação.

Dentre as aplicações dos surfactantes podemos citar o uso do detergente dodecil sulfato de sódio (SDS) na eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). No entanto, os surfactantes se destacam também na solubilização de membranas, sistemas de entregas de drogas e aplicações em medicina [50]. Os compostos anfílicos podem ser classificados segundo a carga do grupo hidrofílico e o tamanho ou natureza do grupo hidrofóbico, sendo que em relação às cargas eles podem ser aniônicos, catiônicos, zwitteriônicos ou neutros.

Os detergentes quando interagem com proteínas em concentrações acima da CMC atuam como desnaturantes desenovelando-as e descaracterizando suas estruturas terciárias [51]. No entanto, em baixas concentrações podem se ligar às proteínas mantendo sua estrutura terciária intacta ou podem causar dissociação e/ou desnaturação. Os surfactantes aniônicos ao induzirem a desnaturação de proteínas, expõem os sítios hidrofóbicos localizados no interior destas, sendo que, quanto maior for a concentração do surfactante mais sítios são expostos e acredita-se que isso possa causar os desdobramentos das proteínas. A interação entre surfactante e proteína tem sido representada por 3 modelos mostrados na Figura 1.11.

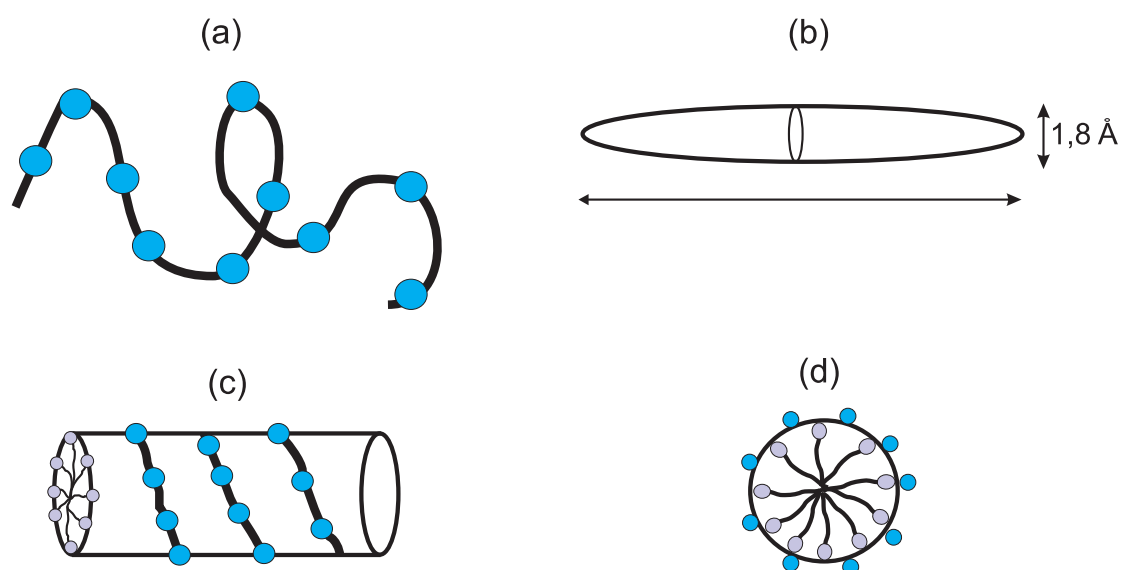


Figura 1.11: Representação esquemática da interação entre proteína e surfactante: (a) modelo "colar de pérolas"; (b) elipsóide prolato; (c) e (d) vista lateral e frontal, respectivamente, do modelo "hélice flexível" (adaptada de [51]).

O modelo "colar de pérolas" é caracterizado por estruturas micelares ligadas à cadeia polipeptídica da proteína, já no modelo elipsóide prolato, as moléculas de surfactantes se agregam formando uma estrutura elipsoidal com o semieixo menor de 18 Å e a cadeia polipeptídica enrolada em torno do agregado. O modelo "hélice flexível", descreve teoricamente o complexo micelar como um agregado de surfactantes formando um cilindro flexível envolvido pela cadeia polipeptídica em forma helicoidal [51].

1.9 Propriedades Estruturais da Membrana Plasmática

Desde os trabalhos pioneiros de Gorter e Grendel [52] e Danielli e Davson [53] sobre as bicamadas lipídicas das membranas biológicas, por vários anos foi aceito este modelo de proteínas incorporadas e livremente difundidas numa bicamada fluida de lipídios. Assim, a bicamada foi considerada como uma barreira uniforme e semipermeável

que serviu como uma matriz passiva para proteínas de membrana. Porém, muitas dúvidas sobre o modelo de mosaico fluido surgiram ao longo dos anos a respeito de diversas classes de lipídios encontradas em membranas biológicas. A Figura 1.12 mostra as características de uma membrana plasmática de acordo com o modelo mosaico fluido.

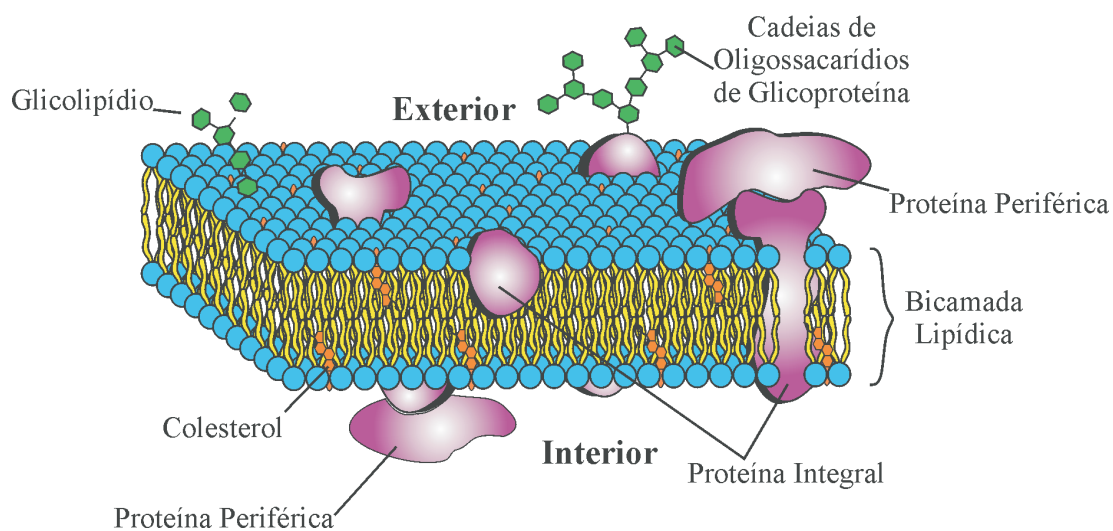


Figura 1.12: Representação esquemática do modelo de membrana (mosaico fluido), formada por lipídios, colesterol e proteínas, separando o meio interno do meio externo da célula.

Os experimentos têm mostrado que ao longo da via de secreção celular, há baixas concentrações de colesterol e esfingolípido no retículo endoplasmático, mas as concentrações destes lipídios aumentam a partir da face *cis*-Golgi² para a *trans*-Golgi³ e, em seguida, para a membrana plasmática [54–56]. Uma possível razão importante para as concentrações relativamente grandes de esfingomiéline e colesterol no *trans*-Golgi e na membrana plasmática são as formações laterais de microdomínios transitentes denominados “rafts” [57].

Nos últimos anos vem crescendo muito o interesse dos pesquisadores nestes modelos de rafts, pois suas características como a capacidade de sequestrar os lipídios

²Face *cis*: é um das quatro regiões funcionais do complexo de Golgi com formato convexo, recebendo vesículas transportadoras provenientes de outras organelas intracelulares.

³Face *trans*: é a face côncava, que libera vesículas para a membrana plasmática.

e proteínas específicas e excluir outros, tem relação direta com um grande número de processos celulares normais, tais como a transdução de sinal [58,59], a fusão da membrana [60], a organização do citoesqueleto [61], transições proteicas, eventos patológicos tais como a invasão celular do vírus da gripe, do Ébola, da imunodeficiência humana-HIV [62] e a formação das placas associadas com a doença de Alzheimer [63].

O raft constitui uma região de microdomínio dinâmico na fase $L_{\beta'}$, com uma capacidade de se deslocar livremente sobre a fase $L_{\alpha'}$ da membrana celular. Assim, estas plataformas lipídicas estão relacionadas com a imiscibilidade entre as fases $L_{\beta'}$ e $L_{\alpha'}$. O fator causador desta imiscibilidade ainda é incerto, no entanto, a formação desses domínios tem como objectivo a minimização da energia livre do sistema [64]. Um modelo aproximado deste tipo de microdomínios pode ser observado após a solubilização das membranas de eritrócitos com um detergente não iônico numa temperatura de 4°C. Neste trabalho foi usado o triton-X100 (TX-100) na membrana isolada do eritrócito (ghost), que resultou numa fração insolúvel ao detergente e rica em colesterol e esfingolípídios denominada DRM (membrana resistente ao detergente) [65].

1.10 Composição Lipídica dos Rafts

Os lípidos que fazem parte deste domínio de plataforma lipídica em membranas são os fosfolípídios, esfingolípídios e o colesterol. Modelos deste tipo de plataforma podem ser preparados a partir de concentrações variadas de *POPC* (1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina), *DPPC* (1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina), *SM* (esfingomielina) e *Chol* (Colesterol). Uma vez que o colesterol (Figura 1.8) apresenta grandes quantidades de ligações duplas em seus anéis, isso torna possível um melhor empacotamento com alguns lípidos saturados da bicamada, aumentando então a capacidade de formação de

domínios mais ordenados.

Algumas células eucariotas utilizam-se desta capacidade de empacotamento de certos lipídios para sintetizar peptídeos antimicrobianos, de modo a se defenderem contra (hóspedes indesejados) [62]. A Figura 1.13 apresenta de forma esquemática a estrutura dos lipídios *DPPC*, *POPC* e *SM*.

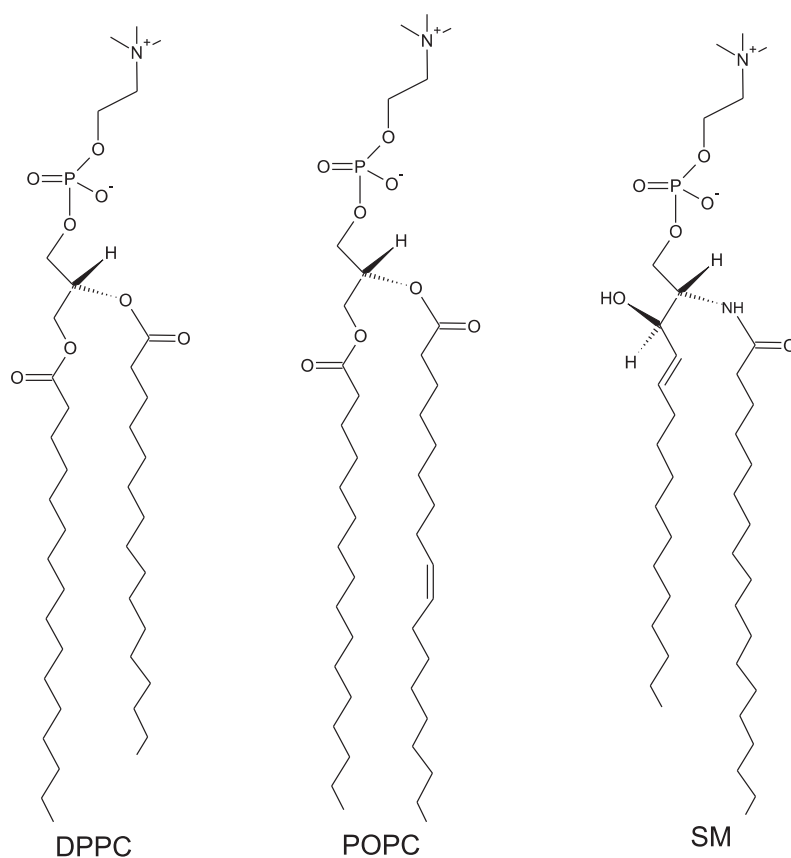


Figura 1.13: Representação esquemática dos lipídios formadores de membranas modelo de rafts.

Em misturas binárias contendo esfingomiéline e outros fosfolipídios, o colesterol possui um papel fundamental, pois ele anula preferencialmente a transição de fase da esfingomiéline, indicando uma possível interação preferencial com estas moléculas. Assim, o modo de ação destes antimicrobianos se baseia na associação com esteróis, causando alterações específicas na sua estrutura, sendo o colesterol promovedor da formação destes

domínios mais ordenados.

Sabe-se que estes peptídeos antimicrobianos possuem maior dificuldade em se intercalarem nestas membranas preferindo interagir com o esteroide majoritário das células invasoras que normalmente é o ergosterol. Sendo que esta associação peptídeo-esteroide é ainda mais dificultada em domínios de colesterol-esfingomielina [66]. A Figura 1.14 mostra esquematicamente a formação deste domínio de esteroide-esfingolípido que pode ser insolúvel em detergentes.

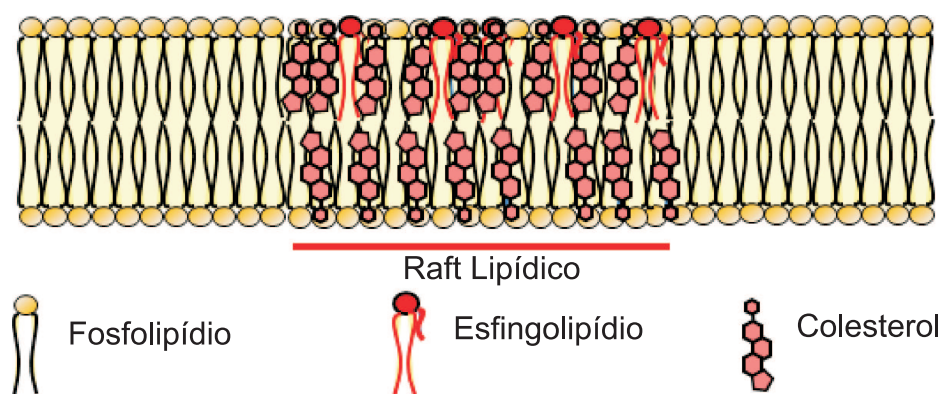


Figura 1.14: Representação esquemática da estrutura de rafts lipídicos (Adaptada de [67]).

Diversas técnicas têm sido empregadas nos estudos relacionados a dinâmica destes domínios lipídicos, dentre elas podemos destacar a espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (RPE) de vários marcadores de spin derivados de ácidos graxos, a qual foi recentemente usada para demonstrar que a MT não causa alteração em vesículas de DPPC em concentrações de até 25 mol%, quando preparadas por um rigoroso processo de extrusão [68].

No entanto, outros estudos mostraram que a MT provoca aumento drástico na fluidez das membranas lipídicas intercelulares de estrato córneo, a camada mais externa da pele, quando medido diretamente no tecido, mas apenas uma pequena diminuição de

fluidez foi observada em vesículas preparadas com lipídios comerciais, visando representar as três classes principais de lipídios do estrato córneo (ceramida de cérebro bovino, ácido beénico e colesterol na razão molar de 2:1:1) [68].

Neste trabalho foram investigados os efeitos da MT em membranas de *Leishmania* fazendo o uso da técnica de RPE, a fim de buscar uma interpretação conclusiva ao seu mecanismo de ação leishmanicida. No entanto, como a incorporação da MT e dos marcadores de spin nas membranas dos parasitos apresentaram algumas dificuldades técnicas no início, buscamos realizar testes preliminares para implementar a técnica de incorporação. A espectroscopia de RPE foi utilizada para verificar a interação da MT com membranas modelo e com os componentes lipídicos e proteicos da membrana de eritrócito humano que é de fácil preparação além de ser um sistema muito estudado.

Para examinar a relevância fisiológica dos resultados verificados por RPE, nós realizamos experimentos incorporando a MT e os marcadores de spin diretamente no sangue total, afim de comparar com as concentrações de MT presente no plasma durante o tratamento da leishmaniose visceral [69, 70] e leishmaniose cutânea [71], pois tem sido reportada como sendo de 31-52 $\mu\text{g/mL}$. Também foram realizados ensaios de citotoxicidade da MT em *Leishmania* em várias condições experimentais para melhor comparar com os dados de RPE.

Capítulo 2

Introdução à Técnica de RPE e Aplicações em Sistemas Biológicos

2.1 Breve Histórico

O primeiro experimento de ressonância paramagnética eletrônica (RPE) foi realizado há mais de 60 anos, em Kazan (Tartaristão), onde os físicos utilizaram amostras de $CuCl_2 \cdot 2H_2O$, um sinal de radiofrequência de 133 MHz e um campo magnético variável operando na faixa de poucos militesla fornecido por um solenóide. Décadas se passaram desde o primeiro experimento e a técnica tem progredido muito, e hoje pode ser empregada em vários ramos da ciência, tais como: física, química, biologia, ciências da terra, ciências de materiais etc. A RPE é uma técnica que se baseia na absorção de radiação eletromagnética, que geralmente se encontra na região de frequência de microondas, por uma amostra paramagnética¹ colocada na presença de um campo magnético. A absorção ocorre apenas para frequências definidas e combinações de campos magnéticos, dependendo das características da amostra, o que significa que a absorção é ressonante. Os espectrômetros de RPE modernos possuem uma sensibilidade de resolução muito boa e

¹O paramagnetismo consiste na tendência que os dipolos magnéticos atômicos têm de se alinharem paralelamente com um campo magnético externo.

por isso podem ser utilizados com variação de temperatura em amostras sólidas, soluções aquosas, pós e etc.

2.2 O Espectrômetro e a Técnica de RPE

Embora ao longo dos anos vários projetos de espectrômetros vêm sendo desenvolvidos, a maioria dos instrumentos de RPE utilizados em laboratório se baseia no diagrama de blocos simplificado como mostra a Figura 2.1.

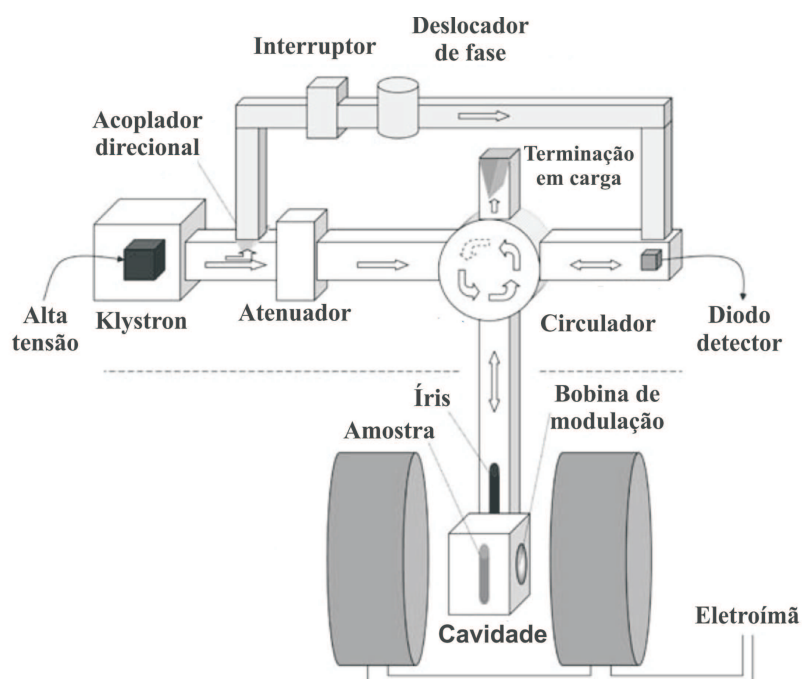


Figura 2.1: Diagrama de bloco simplificado de um espectrômetro de RPE de banda-X . Todos os componentes acima da linha pontilhada geralmente não ficam expostos, sendo construídos dentro de uma caixa retangular de onde sai uma guia de onda que liga a cavidade ressonante [72].

Como outras formas de espectroscopia, a RPE se baseia numa fonte de radiação, uma unidade de absorção onde coloca-se a amostra e um detector. Uma forma

de se obter o espectro de absorção seria fazer uma varredura na frequência de radiação que incide sobre a amostra e medir a quantidade de radiação que fica retida na amostra com a utilização de um detector. No entanto, é mais prático do ponto de vista experimental, fixar a frequência e realizar uma varredura no campo magnético externo.

Neste sistema as microondas plano-polarizadas são produzidas no klystron, e são transferidas através de uma guia de onda retangular e oca para o atenuador, que ajusta o nível de potência. Em seguida são encaminhadas para o circulador que funciona como um direcionador de “tráfego,” orientando as microondas para a cavidade, onde se coloca a amostra. Antes que a microonda chegue à cavidade, ela encontra um dispositivo denominado íris, que ajusta a quantidade de radiação refletida para fora da cavidade. Assim, a radiação refletida da cavidade retorna ao circulador para ser encaminhado ao diodo de detecção e qualquer microonda refletida do diodo é totalmente absorvida e convertida em calor.

Uma pequena quantidade da radiação produzida pelo Klystron é desviada antes do atenuador por uma guia de onda de referência que direciona a radiação diretamente para o diodo detector a fim de produzir uma corrente de trabalho constante. Esta guia apresenta uma porta que pode ser fechada, juntamente com um dispositivo para inverter a fase da microonda. Como o diodo produz uma corrente proporcional à potência de microonda refletida da cavidade, a microonda absorvida pela amostra é detectada observando um decréscimo da corrente no microamperímetro [72].

O eletroímã que está conectado a uma fonte de alimentação regulada e um sistema de refrigeração a água, também é uma parte muito importante, pois produz um intenso campo magnético estático essencial para o funcionamento do equipamento de RPE. Como foi observado na Figura 2.1, entre as bobinas do eletroímã existe um espaço onde fica a cavidade. Ela possui uma adaptação para ligar um sistema de resfriamento de nitrogênio líquido capaz de alterar a temperatura da amostra a fim de realizar medidas com variação térmica. Para que se tenha uma melhor absorção do sinal de RPE, a cavidade foi projetada

para que a radiação de microonda que chega tenha um valor máximo de campo magnético e mínimo de campo elétrico na região onde a amostra é inserida. O campo magnético da microonda também precisa ser perpendicular ao campo estático do eletroímã, para promover a transição dos spins.

A técnica de RPE permite ao pesquisador detectar e caracterizar moléculas com elétrons desemparelhados, sem causar alterações nas moléculas. Por isso, radicais livres e compostos biológicos contendo elementos de transição se tornaram os tipos de moléculas com elétrons desemparelhados mais investigados por RPE em pesquisas na área biológica. Os elétrons possuem uma característica intrínseca chamada de momento angular de spin cuja magnitude e direção no espaço são controladas pelas leis da mecânica quântica. O vetor momento angular de spin será indicado por \mathbf{S} e as componentes ao longo dos eixos x, y e z do espaço cartesiano por S_x, S_y e S_z , respectivamente. Os momentos angulares das partículas quânticas são da ordem de \hbar (constante de Planck h dividido por 2π). Momentos magnéticos são geralmente representados em unidades de \hbar e, nesta unidade de magnitude, o módulo de \mathbf{S} é

$$|\mathbf{S}| = \sqrt{S(S+1)}. \quad (2.1)$$

De acordo com a mecânica quântica, quando o espaço cartesiano x, y e z é escolhido, apenas uma componente do operador momento angular de spin do elétron (geralmente assumida como a componente z) possuem autovalores definidos quando atua nas autofunções $|\alpha\rangle$ e $|\beta\rangle$, respectivamente, como mostram as equações (2.2) e (2.3).

$$S_z|\alpha\rangle = 1/2\hbar|\alpha\rangle \quad (2.2)$$

$$S_z|\beta\rangle = -1/2\hbar|\beta\rangle \quad (2.3)$$

Desta forma, na presença de um campo magnético externo aplicado na direção z , o momento angular de spin não consegue se alinhar ao campo e o momento magnético experimenta a ação de um torque, o qual o induz a efetuar um movimento de precessão em torno do campo externo com uma frequência angular ω bem definida. Este movimento de rotação, análogo ao movimento de precessão de um pião na presença do campo gravitacional da Terra, é denominado precessão de Larmor. A Figura 2.2 mostra o vetor momento angular de spin eletrônico, cujo módulo é $S = \sqrt{3/4}\hbar$.

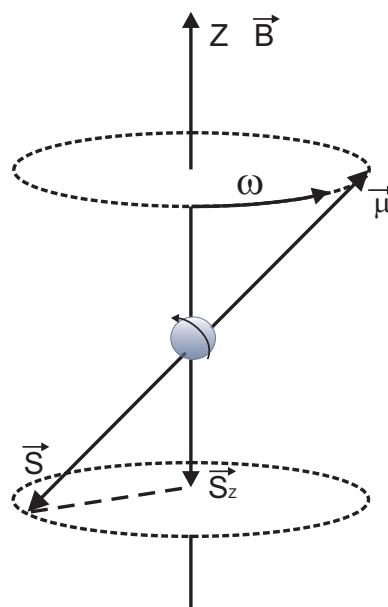


Figura 2.2: A componente S_z do momento angular de spin assume valor definido e igual a $-1/2 \hbar$ (no sentido negativo de z) e caso contrário $1/2 \hbar$ (no sentido positivo de z). A componente do momento angular de spin no plano perpendicular ao z não está definido, pois pode apontar em qualquer direção no plano xy .

2.3 Detecção do sinal de RPE sensível à fase

Da mesma forma que se detecta a radiação absorvida pela amostra, também são detectados ruídos em todas as frequências, levando a uma baixa relação sinal-ruído. A

solução para este problema é a introdução de um campo magnético modulado de pequena amplitude. A aplicação deste campo magnético oscilante gerado por duas pequenas bobinas de Helmholtz construídas nas paredes da cavidade (em geral com frequência de 100 kHz) faz parte de uma técnica conhecida como detecção sensível à fase.

A modulação do campo magnético e detecção sensível à fase permitem a amplificação do sinal de RPE, de certa forma somente filtrando o sinal modulado, já que ruídos não podem ser modulados. Uma ilustração desta técnica pode ser observada na Figura 2.3, que mostra a aplicação de um campo de modulação de 100 kHz e com uma pequena amplitude que modula o campo magnético estático \mathbf{B} entre os limites B_a e B_b , provocando no detector uma variação da corrente entre os extremos i_a e i_b .

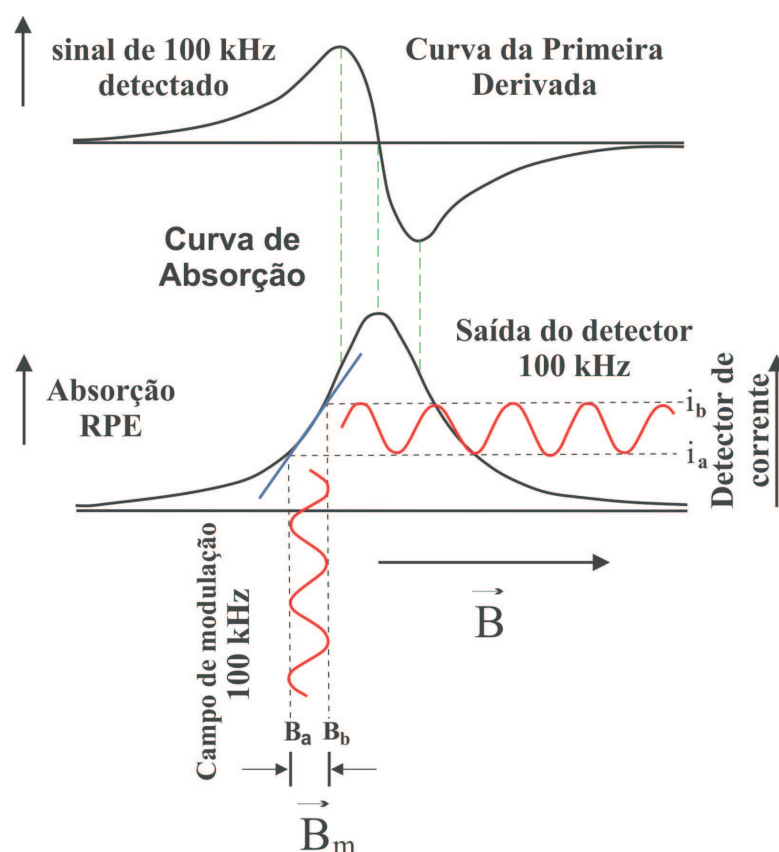


Figura 2.3: Efeito de um campo de modulação de pequena amplitude e frequência de 100 kHz na saída do detector de corrente. O campo magnético estático \mathbf{B} é modulado entre os limites B_a e B_b , que gera uma variação na corrente do detector entre os limites i_a e i_b . O diagrama mostra o sinal de 100 kHz registrado e retificado em função de \mathbf{B} [73].

Se a variação ($i_a - i_b$) for pequena, será proporcional a curva de absorção, que deve exibir um sinal aproximado da primeira derivada desta curva. Devido ao fato do cristal de detecção também produzir um ruído que é inversamente proporcional à frequência do sinal detectado, os equipamentos geralmente utilizam uma frequência mais alta (100 kHz) para o campo de modulação [73, 74]. O amplificador “Lock-in”, ou detector sensível à fase, produz um sinal DC proporcional à amplitude do sinal de RPE modulado. Assim, ele compara o sinal modulado com o sinal de referência e somente amplifica a onda que estiver na mesma fase e frequência do sinal de referência.

O valor do campo de modulação deve ser de algumas vezes menor que as larguras das linhas de ressonâncias dos espectros medidos, pois se o valor for superior, ou até mesmo comparável à largura de linha, o sinal ficará “sobremodulado”, ou deformado pela modulação, aumentando assim a largura de linha.

2.4 Spin do Elétron em um Campo Magnético (Efeito Zeeman)

O operador momento magnético, μ_e , e o momento angular de spin do elétron estão associados, de modo que μ_e é proporcional a \mathbf{S} . Isto significa que seus vetores são paralelos conforme foi mostrado na Figura 2.2. Eles têm direções opostas, pois a constante de proporcionalidade é negativa.

$$\mu_e = g\gamma_e\mathbf{S}, \quad (2.4)$$

onde g é um número chamado fator de Landé ou simplesmente fator g e $\gamma_e = \frac{e}{2m_e}$, sendo γ_e a constante giromagnética, e a carga e m_e a massa de repouso do elétron, respectivamente. A energia do spin do elétron é dado pelo produto escalar entre μ_e e \mathbf{B} , e

seu valor dependerá da orientação de μ_e em relação a \mathbf{B} .

$$E = g\gamma_e \mathbf{S} \cdot \mathbf{B} \quad (2.5)$$

O produto escalar se reduz a um único termo, se a direção de \mathbf{B} coincidir com um dos eixos para o qual \mathbf{B} e \mathbf{S} estão representados. Sendo a escolha do referencial arbitrária, pode-se escolher o eixo z ao longo da direção de \mathbf{B} . Assim, considerando que o campo magnético tenha intensidade B_0 e levando em conta que a componente z do spin atuando no estado α é $1/2\hbar|\alpha\rangle$ e no estado β é $-1/2\hbar|\beta\rangle$, então a energia do spin do elétron pode assumir apenas dois valores conforme mostra a equação abaixo.

$$E = \pm(1/2)g|\beta_e|B_0 \quad (2.6)$$

onde $\beta_e = \frac{e\hbar}{2m_e}$ corresponde ao magneton de Bohr e o sinal positivo refere-se ao estado α e o negativo para o estado β .

A divisão do nível de energia do spin do elétron em dois níveis, na presença de um campo magnético é chamada de efeito Zeeman, e a interação do momento magnético de um elétron com um campo magnético externo aplicado é chamado de interação eletrônica Zeeman. O spin do elétron no estado β , que é o estado de menor energia, pode absorver um quantum de energia de radiação eletromagnética e passar para o estado α , desde que o quantum de energia $h\nu$ coincida com a diferença de energia entre os estados α e β , ou seja,

$$h\nu = \Delta E. \quad (2.7)$$

Esta diferença de energia $h\nu$ pode ser observada na Figura 2.4, onde ν é a frequência da radiação emitida ou absorvida pelo spin eletrônico durante a transição de um estado para outro.

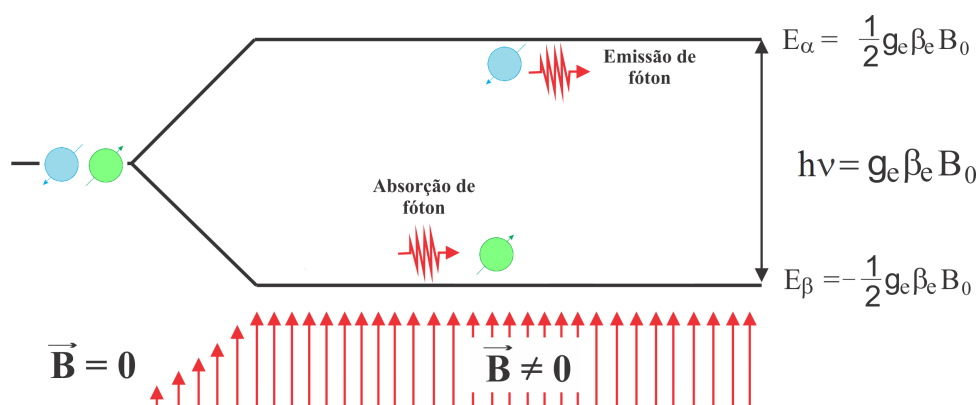


Figura 2.4: O spin do elétron: para campo zero ($B_0 = 0$) o spin dos estados α e β representados por setas para cima e para baixo têm a mesma energia zero. Na presença de um campo magnético estático ($B_0 \neq 0$) o spin do estado β tem menor e α maior energia. A separação de energia é proporcional à intensidade do campo magnético. Os níveis de energia são linearmente dependentes do fator g eletrônico.

A equação (2.7) é a equação fundamental da RPE; como a magnitude do campo magnético normalmente utilizado em vários equipamentos de RPE é de 3.5 T, então para $g = 2,0023$ a frequência ν da radiação absorvida ou emitida é de 9,5GHz. Esta frequência cai na região de radiação de microondas da banda-X (8 – 12 GHz). Existem outras regiões de altas frequências de microondas usadas em espectrômetros de RPE comerciais, tais como a banda-L (1 – 2 GHz), banda-S (2 – 4 GHz), banda-Q (30 – 50 GHz) e a banda-W (75 – 110 GHz).

Para um sistema de spin absorver uma energia irradiada, o campo magnético oscilante B_1 associado à radiação eletromagnética deve ser polarizado perpendicularmente ao campo estático B_0 e o spin do elétron deve estar no estado β . Assim, após a absorção dependendo da energia do fóton o spin do elétron salta para o estado α . No estado α não é permitida absorção de radiação, pois já é o estado de maior energia, porém na presença de um campo magnético oscilante de frequência adequada pode ocorrer uma transição induzida do estado α para o estado β , com perda de energia e a emissão de um fóton $h\nu$. Contudo é importante ressaltar que, para o campo oscilante B_1 transferir energia para o sistema é necessário que sua frequência seja a mesma do momento magnético de spin em

torno do eixo z . Assim, o sistema de spins é capaz de entrar em ressonância com o campo oscilante e trocar energia.

2.5 Descrição Semi-Clássica da Ressonância Magnética

Devido às restrições quânticas, o momento angular de spin não se orienta paralelamente ao campo magnético externo B_0 , como foi visto na Figura 2.2. Por esse motivo o momento magnético μ_e também não fica alinhado com o campo e assim, sofre a ação de um torque que pode ser escrito por $\vec{T} = \vec{\mu}_e \times \vec{B}_0$. Sendo $\vec{T} = \frac{d\vec{S}}{dt}$ e $\vec{\mu}_e = g\gamma_e\vec{S}$, temos a seguinte equação:

$$\frac{d\vec{\mu}_e}{dt} = g\gamma_e\vec{\mu}_e \times \vec{B}_0. \quad (2.8)$$

Invertendo a ordem do rotacional na equação (2.8) e fazendo $\vec{\omega}_L = -g\gamma_e\vec{B}_0$, onde ω_L corresponde a frequência de precessão de Larmor, temos:

$$\frac{d\vec{\mu}_e}{dt} = \vec{\omega}_L \times \vec{\mu}_e. \quad (2.9)$$

Sabendo que $\beta_e = -\gamma_e\hbar$ e que $\omega_L = 2\pi\nu_L$, podemos escrever

$$h\nu_L = g\beta_e B_0, \quad (2.10)$$

sendo que para condição de ressonância a frequência do campo oscilante B_1 deve ser igual a ν_L .

Agora a equação diferencial (2.9) pode ser obtida representando cada vetor em um sistema cartesiano de base $\hat{i}, \hat{j}, \hat{k}$. Sendo assim podemos escrever a seguinte matriz:

$$\begin{vmatrix} \hat{i} & \hat{j} & \hat{k} \\ 0 & 0 & \omega_L \\ \mu_{ex} & \mu_{ey} & \mu_{ez} \end{vmatrix} = \omega_L \mu_{ex} \hat{j} - \omega_L \mu_{ey} \hat{i} \quad (2.11)$$

Desta forma, ao compararmos a equação (2.9) com a solução da matriz (2.11) obtemos as seguintes equações diferenciais:

$$\frac{d\mu_{ex}}{dt} = -\omega_L \mu_{ey}, \quad (2.12)$$

$$\frac{d\mu_{ey}}{dt} = \omega_L \mu_{ex}, \quad (2.13)$$

$$\frac{d\mu_{ez}}{dt} = 0. \quad (2.14)$$

Assim as soluções das equações diferenciais (2.12), (2.13) e (2.14) são triviais de forma que podemos escrever

$$\mu_{ex} = \cos \omega_L t, \quad (2.15)$$

$$\mu_{ey} = \sin \omega_L t, \quad (2.16)$$

$$\mu_{ez} = \text{const.} \quad (2.17)$$

Portanto este modelo semi-clássico é consistente com o modelo quântico comentado inicialmente.

2.6 Distribuição da População dos Níveis de Energia

Os spins dos elétrons de um ensemble são estatisticamente distribuídos nos estados α e β , sendo esses estados equivalentes na ausência de um campo magnético, ou seja, para $B_0 = 0$ metade dos spins está no estado α e a outra metade no estado β . Nessas condições, a componente z do momento angular total é zero, como também são as componentes ao longo de qualquer outra direção. Na verdade, todas as direções no espaço são

equivalentes. A situação muda na presença de um campo magnético B_0 se ao ensemble de spin é permitido interagir com seu ambiente (rede). Como foi dito anteriormente, se $B_0 \neq 0$, os estados α e β não têm a mesma energia. Assim, em equilíbrio térmico com a rede, os spins se distribuem entre os dois estados de tal forma que exista um pequeno excesso no nível de energia mais baixo (estado β). A relação entre o número (N) de spins α e o número de spins β depende da temperatura e sua expressão é dada pela lei de distribuição de Boltzmann:

$$N_\alpha/N_\beta = \exp(-g|\beta_e|B_0/k_B T), \quad (2.18)$$

onde k_B é a constante de Boltzmann e T a temperatura absoluta da rede. Na temperatura ambiente (300 K) e para os campos magnéticos da ordem de 0,3 T, referente ao espectrômetro da banda-X, tem-se $g|\beta_e|B_0 \ll k_B T$, assim a exponencial pode ser expandida em série, de forma que retendo apenas o termo linear a equação (2.18) torna-se aproximadamente

$$N_\alpha/N_\beta = 1 - g|\beta_e|B_0/k_B T. \quad (2.19)$$

Portanto, de acordo com a equação (2.19), na temperatura ambiente e com campo magnético aplicado na faixa da banda-X ocorre um excesso de spins β sobre os spins α de aproximadamente 1/1000. Este excesso de pequeno porte é suficiente para a absorção de microondas superar a emissão, tornando possível a observação de um sinal de absorção de RPE.

De fato, um campo de microondas induz transições de β para α , e um reverso de α para β , em um número proporcional ao número de spins no estado inicial. No entanto, se o sistema de spins não for associado à rede ou fracamente acoplado a ela, o campo de microondas atuando continuamente sobre o sistema de spins igualaria o nível das populações e depois de um curto período de tempo a absorção do sinal de RPE desa-

pareceria. Por outro lado, interações dos spins com a rede restauram o equilíbrio térmico, que é o excesso de spins no nível de baixa energia, permitindo a observação contínua do sinal de absorção de RPE. Estes processos de restauração são denominados processos de relaxação, sendo responsáveis pela manutenção das populações de spin na condição de equilíbrio.

2.7 Processos de Relaxação Spin-Rede e Spin-Spin

O processo de relaxação é dividido em dois na espectroscopia de RPE: relaxação spin-rede, ou longitudinal e relaxação spin-spin, ou transversal [75]. No caso do spin eletrônico, quando o sistema libera energia para átomos ou moléculas vizinhas, passando do estado de maior energia α para o estado de menor energia β , sendo esta energia dissipada na forma de calor, então dizemos que ocorreu a relaxação spin-rede.

A relaxação spin-rede é caracterizada por um decaimento exponencial de primeira ordem relacionado com um tempo de relaxação T_1 , sendo este o tempo de vida médio dos elétrons no estado de maior energia. No entanto, esta relaxação depende de quão fortemente o sistema de spin está “acoplado” à rede, sendo que geralmente os valores de T_1 são pequenos. Numa rede onde a mobilidade das moléculas está na faixa da frequência de Larmor, o processo de relaxação spin-rede fica mais eficiente e o T_1 é curto. Caso T_1 fique muito curto, as linhas podem se tornar tão largas que a transição de RPE não é observada. No entanto, se ocorrer o contrário (T_1 muito longo), há uma grande probabilidade de ocorrer o fenômeno de saturação, ou seja, as transições do estado β para o estado α acontecerem e o sistema não ter tempo de relaxar. Pode-se observar o efeito de alargamento da linha de ressonância provocada pela relaxação através do princípio de incerteza de Heisenberg considerando que um determinado estado de energia apresenta um tempo de vida τ .

$$\Delta E \cdot \tau \cong h, \quad (2.20)$$

substituindo ΔE por $h \cdot \Delta\nu$ na equação (2.20) podemos escrever

$$\Delta\nu \cong \frac{1}{\tau}, \quad (2.21)$$

onde $\Delta\nu$ e ΔE são as incertezas nos valores de frequência e energia desse estado, respectivamente. Utilizando então a equação (2.10), podemos escrever

$$h \cdot \Delta\nu = g\beta_e \Delta B. \quad (2.22)$$

Assim substituindo (2.21) em (2.22) temos que

$$\Delta B \cong \frac{h}{g\beta_e} \frac{1}{\tau}. \quad (2.23)$$

Por meio da equação (2.23) é fácil ver que quanto menor o tempo de vida T_1 do estado excitado tanto maior será a largura de linha, isto é, tempos de relaxação curtos levam às linhas de ressonâncias largas [76]. Vários outros efeitos tendem a diminuir os tempos de relaxação e, portanto, alargam as linhas de RPE. Dentre os efeitos mais importantes está a interação magnética dipolar que ocorre entre dois momentos magnéticos que, em geral, podem ser divididos em estático e dinâmico. As interações estáticas resultam em linhas de RPE muito largas, obrigando, na maioria das vezes, a realização de uma diluição das amostras sólidas. Um dos efeitos desta interação dipolar dinâmica são as mudanças de estados simultâneos dos spins, o que limita o tempo de vida de um spin no estado excitado.

A relaxação spin-spin não é capaz de dissipar a energia do sistema de spin, portanto, não consegue provocar uma redução na saturação, mas contribui para o alargamento de linha, devido à redução do tempo de vida do spin no estado excitado. Esta relaxação está relacionada com as orientações relativas dos spins, cuja distribuição aleatória

de suas direções muda exponencialmente no tempo, com uma constante de tempo T_2 conhecida como tempo de relaxação spin-spin ou transversal. O tempo T_2 está associado com a largura da linha do sinal de RPE de modo que

$$\Delta\nu \cong \frac{1}{\pi T_2}, \quad (2.24)$$

pois quanto menor for tempo o de relaxação spin-spin, maior será a largura de linha de ressonância. Este processo depende da intensidade e da distribuição dos campos locais em torno dos centros paramagnéticos, já que a largura de linha depende da coerência entre os movimentos de precessão dos spins em torno do campo magnético e a frequência de precessão é alterada conforme a intensidade do campo local.

Assim a largura de linha intrínseca é determinada por T_2 , que é menor que T_1 . No caso de radicais livres em solução (que é o mais comum em RPE) a forma da linha é Lorentziana e para os sólidos a forma de linha é geralmente Gaussiana, que é característica de uma distribuição aleatória de linhas superpostas [76].

2.8 Spin Nuclear e Interação Hiperfina

Como os elétrons, os núcleos são caracterizados por um momento angular de spin, geralmente indicado por I , e pelo correspondente momento magnético associado, dado por uma relação análoga à equação (2.4)

$$\mu_N = g_N \beta_N I. \quad (2.25)$$

A presença deste dipolo magnético nuclear causa uma variação no campo local, pois dependendo de sua orientação ele é somado ou subtraído ao campo magnético externo aplicado. Assim, o spin do electrón desemparelhado sofrerá interações com o spin

magnético nuclear do radical que o contém, dando origem ao que chamamos de interação hiperfina que é responsável pelo desdobramento das linhas de ressonância nos espectros de RPE [77]. Dependendo do número quântico I ($0, \frac{1}{2}, 1, \frac{3}{2}, 2, \dots$), o núcleo poderá ter $(2I + 1)$ diferentes orientações no espaço e por consequência diferentes valores de campos locais. Portanto, haverá $(2I + 1)$ linhas hiperfinas de intensidades iguais [78].

Na interação hiperfina existem duas contribuições. Uma aparece quando um elétron do orbital p, d, f, ... está próximo do núcleo de modo que seus respectivos momentos magnéticos de spins (μ_e) e (μ_N) estejam separados por uma distância \vec{r} . Neste caso, o campo local produzido pelo núcleo se parece com o de um dipolo magnético puntiforme. Porém, esta interação clássica depende também do ângulo formado entre a linha que liga os dipolos e o campo magnético aplicado B_0 conforme mostra a Figura 2.5.

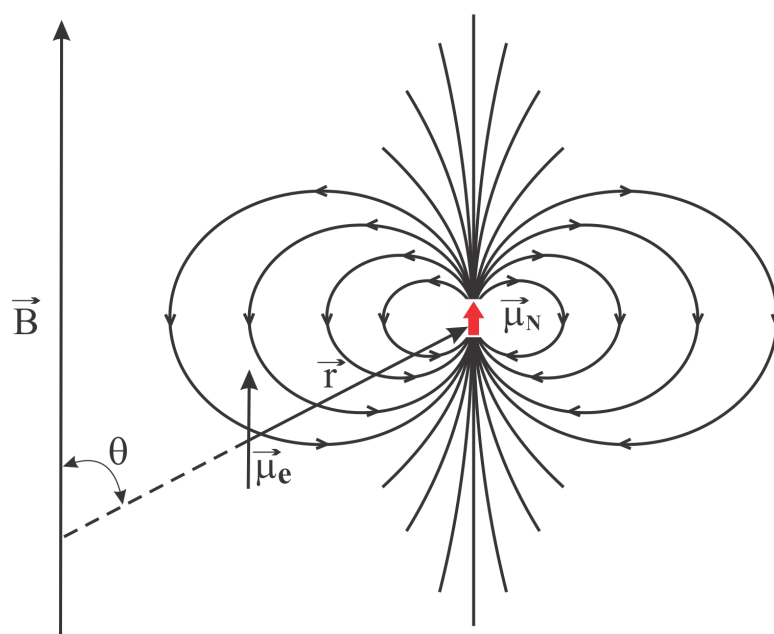


Figura 2.5: Interação dipolo-dipolo entre o núcleo e o elétron: a figura representa a interação entre o momento magnético μ_e do elétron no estado quântico $m_S = -\frac{1}{2}$ e o momento magnético μ_N do núcleo indicado pelo estado quântico $I = \frac{1}{2}$. O ângulo θ é formado entre o vetor \vec{r} , que liga os dipolos, e o campo aplicado B_0 .

Devido às características das interações entre os dipolos, ela é classificada como uma interação anisotrópica, pois depende da orientação do campo local. A Hamiltoniana que descreve esta interação entre os dipolos é dada por

$$\hat{H}_{dip} = -g_e\beta_e g_N\beta_N \left[\frac{\hat{S}\cdot\hat{I}}{r^3} - \frac{3(\hat{S}\cdot\vec{r})(\hat{I}\cdot\vec{r})}{r^5} \right], \quad (2.26)$$

onde g_N e β_N correspondem ao fator g nuclear e o magneton de Bohr nuclear, respectivamente, \hat{S} e \hat{I} são os operadores de spin eletrônico e nuclear, respectivamente, e \vec{r} é a distância entre o elétron e o núcleo [79].

Expandindo o vetor \vec{r} em termos das coordenadas cartesianas, reescrevemos a equação (2.26) na forma tensorial da seguinte forma:

$$\hat{H}_{dip} = g_e\beta_e g_N\beta_N \hat{S} \cdot \begin{bmatrix} \langle \frac{3x^2-r^2}{r^5} \rangle & \langle \frac{3xy}{r^5} \rangle & \langle \frac{3xz}{r^5} \rangle \\ \langle \frac{3xy}{r^5} \rangle & \langle \frac{3y^2-r^2}{r^5} \rangle & \langle \frac{3yz}{r^5} \rangle \\ \langle \frac{3xz}{r^5} \rangle & \langle \frac{3yz}{r^5} \rangle & \langle \frac{3z^2-r^2}{r^5} \rangle \end{bmatrix} \cdot \hat{I}, \quad (2.27)$$

onde cada elemento da matriz representa uma média da função de onda do elétron desemparelhado. Para simplificar a equação (2.27), podemos escrever $\hat{H}_{dip} = \hat{S} \cdot \overleftrightarrow{T} \cdot \hat{I}$, onde \overleftrightarrow{T} é um tensor de segunda ordem dado por

$$\overleftrightarrow{T} = g_e\beta_e g_N\beta_N \begin{bmatrix} \langle \frac{3x^2-r^2}{r^5} \rangle & \langle \frac{3xy}{r^5} \rangle & \langle \frac{3xz}{r^5} \rangle \\ \langle \frac{3xy}{r^5} \rangle & \langle \frac{3y^2-r^2}{r^5} \rangle & \langle \frac{3yz}{r^5} \rangle \\ \langle \frac{3xz}{r^5} \rangle & \langle \frac{3yz}{r^5} \rangle & \langle \frac{3z^2-r^2}{r^5} \rangle \end{bmatrix}. \quad (2.28)$$

A segunda contribuição para a interação hiperfina ocorre quando o elétron desemparelhado se encontra no orbital s. Uma vez que este orbital apresenta simetria esférica em torno do núcleo, a interação entre os dipolos tem média nula. No entanto, existe uma probabilidade do elétron deste orbital ser encontrado na posição do núcleo, por isto não é correto dar tratamento clássico para as interações dos dois dipolos. Neste

caso ocorre a interação de contato ou de Fermi [80], que depende da aproximação entre o elétron e o núcleo e que somente ocorre se o elétron ocupar o orbital s. A Hamiltoniana desta interação isotrópica pode ser escrita por

$$\hat{H}_{iso} = \frac{8\pi}{3} g_e \beta_e g_N \beta_N |\psi(0)|^2 \hat{S} \cdot \hat{I}, \quad (2.29)$$

sendo $|\psi(0)|^2$ a probabilidade do elétron ser encontrado na posição do núcleo. Chamando $a = \frac{8\pi}{3} g_e \beta_e g_N \beta_N |\psi(0)|^2$ de (constante de desdobramento hiperfino isotrópico), podemos finalmente escrever a Hamiltoniana total para o spin do elétron por

$$\hat{H} = g_e \beta_e \hat{B} \cdot \hat{S} + \hat{S} \cdot \overleftrightarrow{\mathbf{T}} \cdot \hat{I} + a \hat{S} \cdot \hat{I}, \quad (2.30)$$

onde os dois últimos termos da equação (2.30) correspondem a interação dipolar e a interação de contato de Fermi, respectivamente. Juntando estes dois termos podemos escrevê-la de forma mais compacta, definindo um novo tensor de segunda ordem (tensor de acoplamento hiperfino) $\overleftrightarrow{\mathbf{A}}$.

$$\hat{H} = g_e \beta_e \hat{B} \cdot \hat{S} + \hat{I} \cdot \overleftrightarrow{\mathbf{A}} \cdot \hat{S} \quad (2.31)$$

2.9 O Fator g

O fator g num ambiente molecular está relacionado à facilidade de o campo aplicado introduzir correntes eletrônicas locais no esqueleto molecular e à intensidade dos campos gerados por essas correntes. Elétrons podem migrar através do esqueleto molecular utilizando os estados excitados, de forma que esse caminho adicional para a circulação dos elétrons produz um campo magnético local que se soma ao campo aplicado. Assim, a facilidade de induzir correntes é inversamente proporcional à separação entre os níveis

de energia, ΔE , da molécula [81]. É conveniente definir o campo de ressonância e permitir que o fator g varie, em resposta a diferentes magnetizações da amostra de acordo com a equação abaixo.

$$g_{eff} = \frac{h\nu}{\beta B_r} \quad (2.32)$$

A principal fonte de campo magnético local, a qual causa desvios do fator g em relação ao elétron livre, é um momento magnético orbital introduzido por uma mistura de estados excitados no nível fundamental. Assim, a anisotropia do fator g é usualmente resumida na forma de um tensor de segunda ordem. Geralmente, em sistemas de eixos cartesianos, \overleftrightarrow{g} é escrito como

$$\overleftrightarrow{g} = \begin{vmatrix} g_{xx} & g_{xy} & g_{xz} \\ g_{yx} & g_{yy} & g_{yz} \\ g_{zx} & g_{zy} & g_{zz} \end{vmatrix}. \quad (2.33)$$

Para um radical com sinal isotrópico, $g_{xx} = g_{yy} = g_{zz} = g_{eff}$. Alguns sistemas apresentam uma simetria axial onde $g_{xx} = g_{yy} \neq g_{zz}$, ou seja, os eixos x e y são equivalentes e apenas o eixo z possui anisotropia. Nestes casos, o valor de g_{zz} é conhecido como g_{\parallel} , enquanto que g_{xx} e g_{yy} são denominados de g_{\perp} . Porém, para sistema totalmente anisotrópico temos $g_{xx} \neq g_{yy} \neq g_{zz}$.

2.10 O Método de Marcador de Spin

A técnica de RPE só se aplica em sistemas que possuem elétrons desemparelhados, portanto, para se estudar sistemas biológicos que em sua maioria não possuem

elétrons desemparelhados, ou seja, são sistemas diamagnéticos, foram desenvolvidos marcadores de spin (“spin labels”) que são radicais livres estáveis ligados a sítios específicos de uma molécula. O método de marcador de spin consiste em incorporar ao sistema biológico uma pequena porção de molécula contendo um radical paramagnético que por sua vez é capaz de desempenhar o papel de sonda, permitindo assim a investigação do meio em que se encontram [82].

Marcadores de spins que possuem boa compatibilidade com sistemas biológicos e um sinal de RPE adequado para gerar informações sobre o sistema são geralmente derivados do nitróxido como mostra a Figura 2.6. No entanto, de forma geral qualquer espécie paramagnética pode ser um marcador de spin.

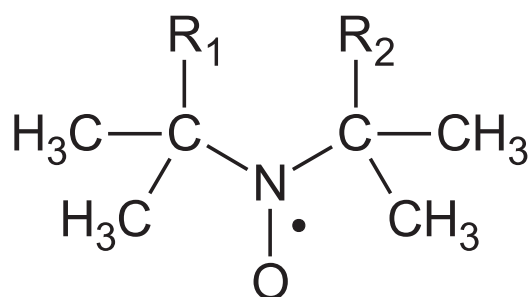


Figura 2.6: Forma química do radical nitróxido. R_1 e R_2 representam grupos químicos que variam de acordo com o marcador de spin.

Os marcadores contendo o grupo nitróxido como elemento paramagnético que é um radical bastante estável pode se ligar covalentemente a grupos funcionais específicos de proteínas, como é o caso do marcador derivado do maleimido (6-MSL), ou podem ser intercalados em regiões lipídicas de sistemas de interesse como é o caso do 5-doxil estearato (“5-Doxyl Stearic Acid” 5-DSA), ambos apresentados na Figura (2.7).

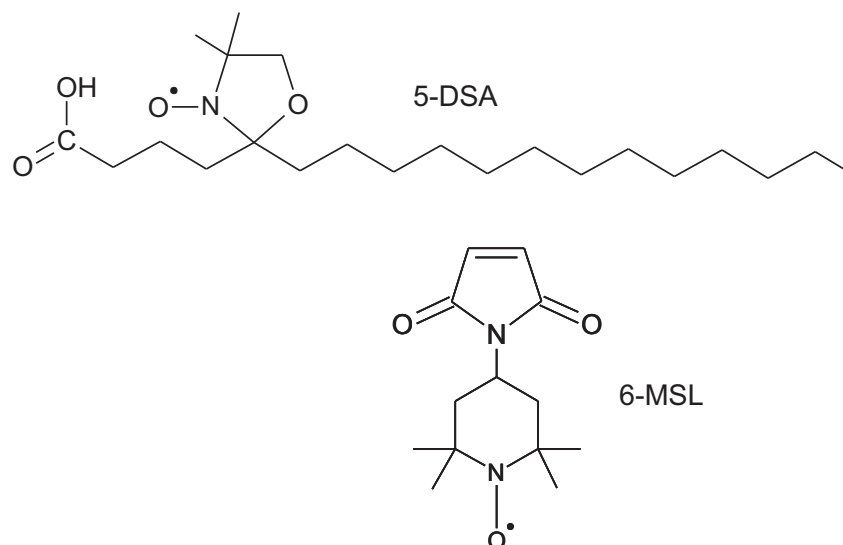


Figura 2.7: Marcador de proteína, 6-MSL, e marcador lipídico 5-DSA (possui grupo nitroxido ligado ao 5^o C carbono numa cadeia acila tipicamente saturada).

A presença dos quatro grupos metilas adjacentes ao fragmento $N - O$ (como mostra a Figura 2.6), conferem uma estabilidade aos marcadores e impedem que o elétron desemparelhado circule pelo anel piperidínico. No nitroxido, o elétron desemparelhado interage com o núcleo do nitrogênio que tem spin nuclear $I = 1$, desta forma o radical sente a ação de três campos locais diferentes devido aos valores do número quântico de spin $m_I = -1, 0, +1$, resultando no desdobramento de três níveis de energia. Para $m_I = +1$, existe uma contribuição favorável ao campo externo, de forma que a ressonância se dá em um campo externo menor, por outro lado, para $m_I = 0$ não existe contribuição de campo local pra o campo externo e para $m_I = -1$ a contribuição é desfavorável ao campo externo de forma que a ressonância ocorre num campo externo maior. No entanto, a ressonância que ocorre para este tripleto em campos distintos deve satisfazer a regra de seleção $\Delta m_I = 0$ conforme é observado na Figura 2.8.

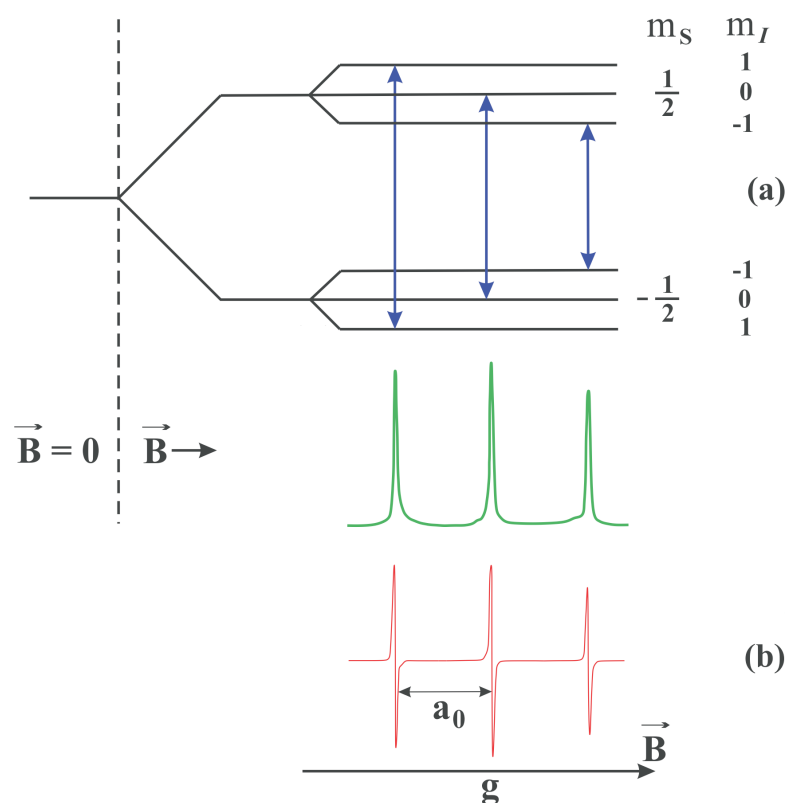


Figura 2.8: (a) Níveis de energia do elétron desemparelhado interagindo com o spin nuclear do nitrogênio do grupo nitróxido (estrutura hiperfina) numa região de campo magnético aplicado ao longo do eixo z . (b) primeira derivada do espectro de absorção.

De acordo com a Figura 2.8 a distância entre duas linhas adjacentes do espectro de RPE corresponde exatamente à média da constante de desdobramento hiperfino, a_0 , sendo que o fator g médio define a posição da linha central em relação ao campo magnético aplicado. Seus valores são dados respectivamente pelas equações (2.34) e (2.35).

$$a = \frac{1}{3}(A_{xx} + A_{yy} + A_{zz}) \quad (2.34)$$

$$g = \frac{1}{3}(g_{xx} + g_{yy} + g_{zz}) \quad (2.35)$$

No entanto, o valor da constante de desdobramento hiperfino, a_0 , pode sofrer influência do meio onde se encontra o radical nitróxido. Para o marcador de spin dissolvido em meio aquoso, o oxigênio do nitróxido também realiza ligação de hidrogênio com

moléculas de água. Assim, o átomo de hidrogênio da molécula de água contribui com uma carga local positiva gerando um campo elétrico sobre a molécula do nitróxido, polarizando a densidade eletrônica da ligação $N - O$. Desta forma, a região onde está o átomo de nitrogênio fica mais positiva. Este efeito está representado de forma esquemática na Figura 2.9.

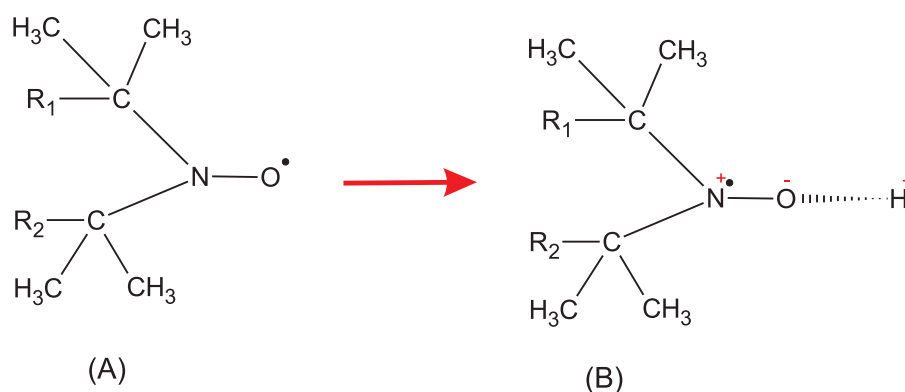


Figura 2.9: Representação esquemática do oxigênio do radical nitróxido realizando ligação de hidrogênio, onde o hidrogênio polariza a ligação $N - O$ fazendo com que o elétron se localize mais próximo do núcleo do átomo de nitrogênio, aumentando assim a contribuição do acoplamento hiperfino isotrópico.

Assim, o elétron desemparelhado do radical se aproxima mais do núcleo do nitrogênio (Figura 2.9), aumentando a interação hiperfina isotrópica, pois sua localização sobre a ligação $N - O$ é pouco restrita, pelo fato do nitróxido ser um radical livre². Por este fato, o valor do desdobramento hiperfino isotrópico que pode ser medido no espectro de RPE, tem a influência da constante dielétrica do solvente, sendo um parâmetro importante para se acompanhar mudanças de polaridade no meio.

²O elétron se encontra fracamente ligado ao núcleo

2.11 Anisotropia Espectral e o Parâmetro $2A_{\parallel}$

A anisotropia espectral é a base fundamental da utilidade do método de marcadores de spin. Os eixos dos tensores \overleftrightarrow{g} e \overleftrightarrow{A} são orientados na molécula como mostra a Figura 2.10. O eixo x se encontra na direção da ligação $N - O$, o eixo z na direção do orbital $2p\pi$ do nitrogênio e o eixo y se encontra simultaneamente perpendicular aos eixos x e z .

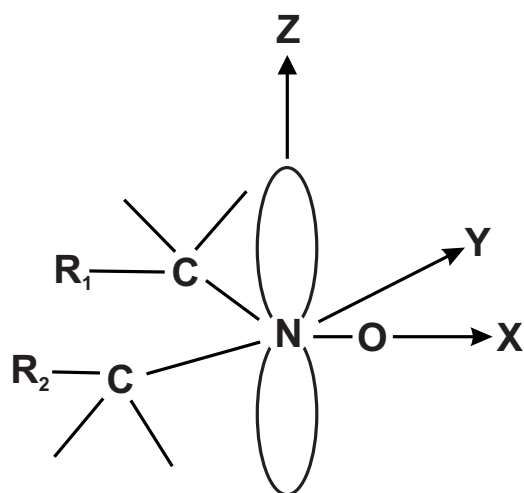


Figura 2.10: Orientação dos eixos principais dos tensores de segunda ordem \overleftrightarrow{g} e \overleftrightarrow{A} no radical nitroxídeo.

Normalmente a anisotropia espectral é definida pelos três valores do fator g e da constante hiperfina nas direções paralelas aos eixos principais: A_{zz} , A_{xx} , A_{yy} e g_{zz} , g_{xx} , g_{yy} . Em muitos casos o sistema molecular é simétrico axialmente e os principais valores são designados como: $A_{\parallel} = A_{zz}$, $A_{\perp} = A_{xx} = A_{yy}$ e similarmente $g_{\parallel} = g_{zz}$ e $g_{\perp} = g_{xx} = g_{yy}$. As anisotropias de g e A são a base do cálculo dos parâmetros de ordem em membranas.

De acordo com a Figura 2.10, grande parte da densidade eletrônica está ao longo do eixo z . Assim, quando se aplica o campo ao longo do eixo z , o valor obtido para a

constante de acoplamento hiperfino é maior do que dos valores obtidos quando se aplica o campo ao longo dos eixos x e y ($A_{zz} \cong 32$, $A_{xx} \cong A_{yy} \cong 6$). A mudança na direção do campo em relação aos eixos do nitróxido também causa deslocamentos da posição dos espectros em relação aos valores de campo magnético (Figura 2.11), devido a uma variação no fator g ($g_{xx} = 2,0090G$, $g_{yy} = 2,0060G$, $g_{zz} = 2,0027G$). Quando a direção do campo muda do eixo z para y e para x o espectro se desloca para a esquerda como mostrado na Figura 2.11.

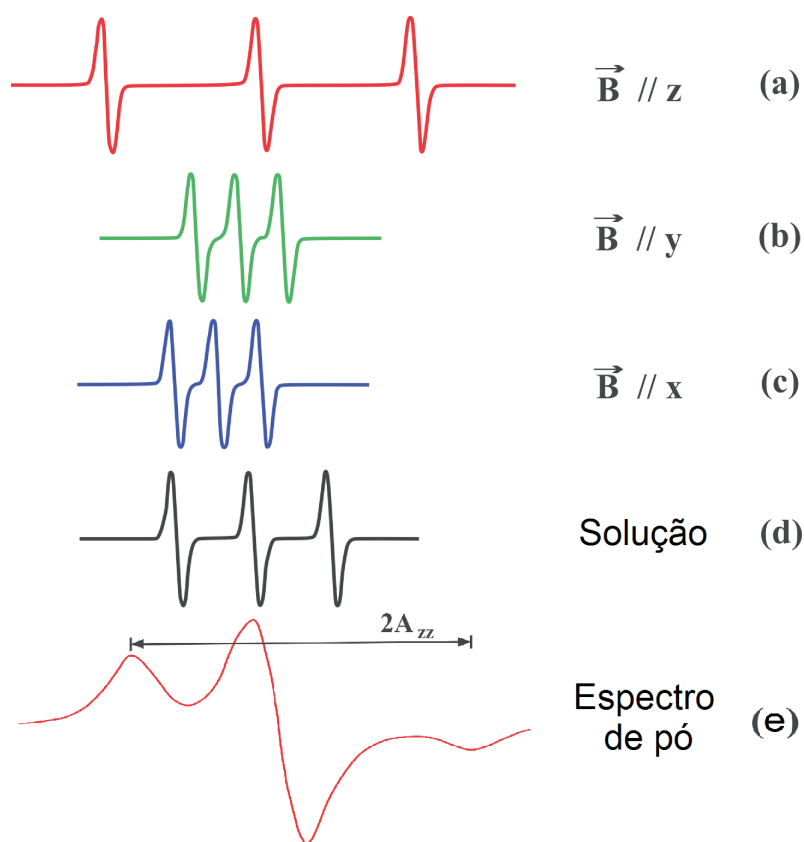


Figura 2.11: Espectro de RPE ilustrando a anisotropia do fator g e da constante de acoplamento hiperfino. (a) Campo magnético aplicado paralelo ao eixo z , (b) paralelo ao eixo y e (c) paralelo ao eixo x . (d) Espectro do marcador em solução (o radical gira rapidamente e a anisotropia do espectro desaparece, sendo observado apenas a média) e (e) espectro obtido de pó de cristal triturado a -70°C , onde aparecem contribuições de todas as orientações ao mesmo tempo.

Quando o marcador se encontra em solução podendo se movimentar rapidamente, é observado um espectro como o da Figura 2.11d. Isto acontece porque com o movimento rápido do marcador de spin em relação ao campo magnético externo apa-

rece a média da interação dipolar, cujo tensor que a representa tem traço nulo, portanto a interação dipolar tende a desaparecer com o movimento do marcador, enquanto a interação isotrópica (ou de contato de Fermi) permanece constante, isto é, independe do movimento do marcador. No entanto, quando o marcador possui movimento lento, as contribuições de interação dipolar das diferentes orientações fazem com que a média temporal não seja mais efetiva e, assim, no limite onde o movimento é muito lento (líquido viscoso ou congelado), a forma espectral corresponde a do “espectro de pó” (Figura 2.11e).

É importante ressaltar que o movimento molecular relevante não é o movimento do grupo radical nitróxido, e sim da molécula na qual ele está ligado. Em membranas biológicas, o eixo principal dos marcadores de spin pode assumir todos os possíveis ângulos em relação à direção do campo magnético externo. Sendo assim, o espectro de RPE desses marcadores será uma superposição dos espectros de todas as possíveis orientações das cadeias carbônicas em relação ao campo magnético externo, cujos desdobramentos máximos ocorrerão quando uma determinada população de marcadores de spin possuir suas cadeias carbônicas alinhadas paralelamente ao campo externo, e mínimo quando estiver alinhada perpendicularmente.

Na medida em que o marcador ganha movimento saindo da situação rígida do espectro de pó (Figura 2.11e) e indo para situação de movimento rápido (espectro de solução, Figura 2.11d), o espectro de RPE muda gradativamente, refletindo as mudanças de movimento rotacional. No espectro de pó o desdobramento hiperfino máximo é $2A_{zz}$ e na medida em que ganha movimento o desdobramento máximo aparente é chamado de $2A_{\parallel}$. Com o aumento do movimento rotacional o parâmetro $2A_{\parallel}$ diminui. Assim, este parâmetro tem sido muito utilizado para avaliar o grau de movimento do marcador.

Vários fatores podem alterar a dinâmica molecular na bicamada lipídica ou membrana celular, como por exemplo, pela adição de moléculas em concentrações que causam interferência na estrutura da bicamada ou membrana. Esta modificação das propriedades físicas dessa estrutura é justamente na fluidez da bicamada lipídica, a qual pode

ser monitorada pelo parâmetro espectral $2A_{\parallel}$. A Figura 2.12 mostra o parâmetro $2A_{\parallel}$ obtido a partir de um espectro do marcador de spin (5-DSA).

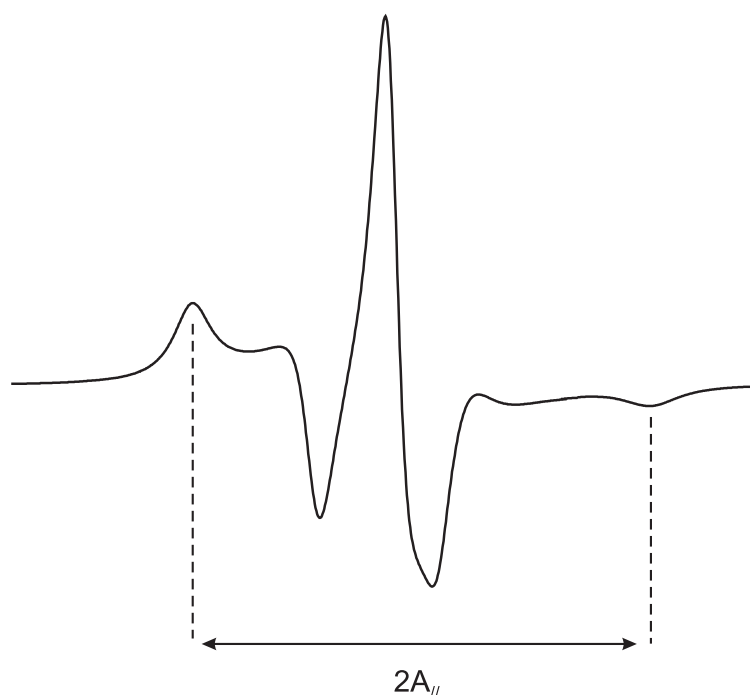


Figura 2.12: Espectro de RPE do marcador de spin “5-doxyl stearic acid”(5-DSA) obtido em temperatura ambiente com a indicação do parâmetro espectral $2A_{\parallel}$.

2.12 Simulação do Espectro de RPE

Embora pareça ser simples de obter o parâmetro $2A_{\parallel}$, medindo-o diretamente nos espectros, outros espectros de RPE podem ser mais complexos e apresentarem mais de uma componente espectral resolvida ou não resolvida. Nestes casos torna-se necessário a aplicação de uma simulação espectral para se extrair informações que se encontram codificadas nos espectros de RPE.

Estas componentes espectrais representam populações de marcadores de

spin com diferentes parâmetros de movimento molecular. Permitindo monitorar duas ou mais componentes espectrais ao mesmo tempo, a técnica de simulação é capaz de fornecer informações do movimento dos marcadores de cada uma das componentes e também determinar a fração de cada componente no espectro. Neste trabalho foi feito o uso do programa de simulação “Non-linear least square” (*NLLS*) desenvolvido por Jack H. Freed e colaboradores [83] que usa como base a solução da equação estocástica de Liouville (*SLE*, de “Stochastic Liouville Equation”), a partir dos valores de entrada de vários parâmetros, que são definidos pelo usuário, a fim de gerar o espectro teórico. A *SLE* possui como origem a equação quântica de Liouville utilizada para determinar uma matriz densidade ρ , que pela teoria quântica, contém as informações para o cálculo de quantidades observáveis de um sistema quântico.

Desta forma, este método de simulação permite avaliar quantitativamente os espectros de RPE em função das taxas de movimento do radical nitróxido, afetadas pelas restrições ao movimento que lhe são impostas pelas estruturas do meio onde se encontra inserido, e associar estas taxas de movimento a um tensor de difusão rotacional, que é utilizado para se determinar o tempo de correlação rotacional e um parâmetro de ordem.

2.13 Tempo de Correlação Rotacional

Uma análise precisa dos espectros de RPE de marcadores de spin juntamente com a simulação computacional permite uma boa avaliação do movimento molecular do nitróxido. Um dos parâmetros mais importantes neste tipo de estudo que pode ser medido é o tempo de correlação rotacional, τ_c . Este parâmetro de RPE está relacionado com o tempo que o marcador leva para se reorientar em seu movimento de rotação e reflete diretamente a dinâmica do meio onde o marcador de spin se encontra.

Na região do movimento rápido, com τ_c menor que 10^{-9} s, a sensibilidade dos espectros às mudanças de movimento é boa quando se trabalha em banda-X e pode ser medido diretamente no espectro com o uso da equação (2.36),

$$\tau_c = kW_0 \left[\sqrt{\frac{h_0}{h_{-1}}} - 1 \right], \quad (2.36)$$

onde $k = 6,5 \cdot 10^{-10} \text{ s} \cdot \text{G}^{-1}$, W_0 é a largura pico a pico da linha central medida em G (Gauss), h_0 é a intensidade da linha central e h_{-1} é a intensidade da linha de campo alto. Estes parâmetros espectrais podem ser visto na Figura 2.13.

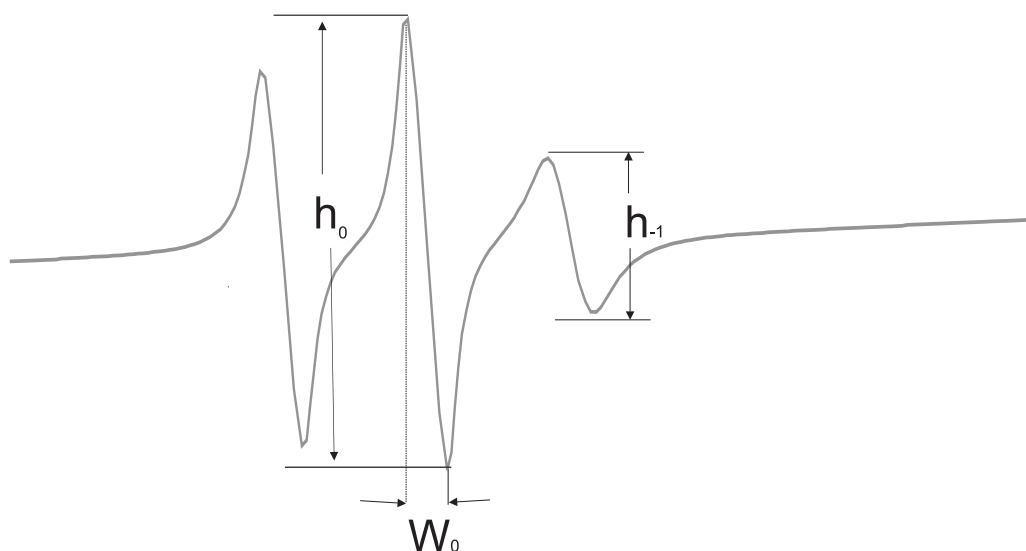


Figura 2.13: Espectro de RPE do marcador de spin “5-doxyl stearic acid”(5-DSA) para movimento rápido, com a indicação dos parâmetros espectrais usados na determinação do tempo de correlação rotacional.

Na região de movimento com τ_c compreendido entre 10^{-9} s e $< 10^{-7}$ s, os espectros ainda possuem uma boa sensibilidade às mudanças de τ_c , mas para se obter uma melhor avaliação pode-se fazer uso da técnica de simulação computacional. No entanto, para valores de $\tau_c > 10^{-7}$ torna-se difícil avaliar sua dinâmica molecular, ficando indispensável o uso da simulação dos espectros.

O operador do programa de simulação deve determinar os parâmetros de en-

trada utilizados no regime de movimento lento que são divididos em quatro grupos: (i) parâmetros magnéticos e estruturais que descrevem os tensores magnéticos \overleftrightarrow{g} e \overleftrightarrow{A} (do fator g e do desdobramento hiperfino descritos anteriormente); (ii) parâmetros dinâmicos que incluem as taxas de difusão rotacional para vários modelos dinâmicos; (iii) coeficientes do potencial de ordenamento que descrevem a influência da orientação dos fluidos anisotrópicos tais como cristais líquidos e membranas; e (iv) os parâmetros inteiros que definem o truncamento dos cálculos [83]. Estes parâmetros, com suas descrições e símbolos estão apresentados na tabela (2.1).

Tabela 2.1: Lista dos parâmetros de entrada usados no programa NLLS para a realização da simulação teórica dos espectros experimentais [83].

Parâmetros	Descrição
g_{xx}, g_{yy}, g_{zz}	Tensor g
a_{xx}, a_{yy}, a_{zz}	Tensor A (hiperfino) (G)
w_{xx}, w_{yy}, w_{zz}	Tensor de largura de linha lorentziana (G)
R_{bar}	Coefficiente de difusão rotacional (s^{-1})
c_{20}, c_{22}	Coeficiente para o potencial de orientação
b_0	Campo central estático (G)
lemx, lomx, kmx, mmx	Índices de truncamento do cálculo

O programa *NLLS* utiliza um sistema de coordenadas fixo na molécula e outro fixo no laboratório para descrever a dinâmica rotacional e ordenamento do marcador de spin. De forma que, para o sistema da molécula o tensor \overleftrightarrow{g} é representado nas coordenadas (x_m, y_m, z_m) , o tensor \overleftrightarrow{A} nas coordenadas da interação hiperfina (x_a, y_a, z_a) e o tensor de difusão rotacional R nas coordenadas de difusão rotacional (x_r, y_r, z_r) . Neste programa são apresentados quatro modelos de difusão, sendo eles: difusão rotacional browniana, difusão rotacional não-browniana, difusão por saltos discretos e difusão anisotrópica. No

entanto, apenas o primeiro modelo foi aplicado em nossas simulações, devido às características do marcador de spin de tamanho intermediário e das macromoléculas marcadas em nossas amostras.

Durante a simulação é necessário fixarmos às coordenadas do espectrômetro no sistema do laboratório em (x_L, y_L, z_L) , no qual o campo magnético estático externo é definido usualmente na direção z_L [84]. Deverá haver ainda um sistema diretor local de coordenadas (x_d, y_d, z_d) , que pode ser escolhido de forma arbitrária. A Figura 2.14 mostra estes sistemas de coordenadas para o marcador de spin 5-DSA.

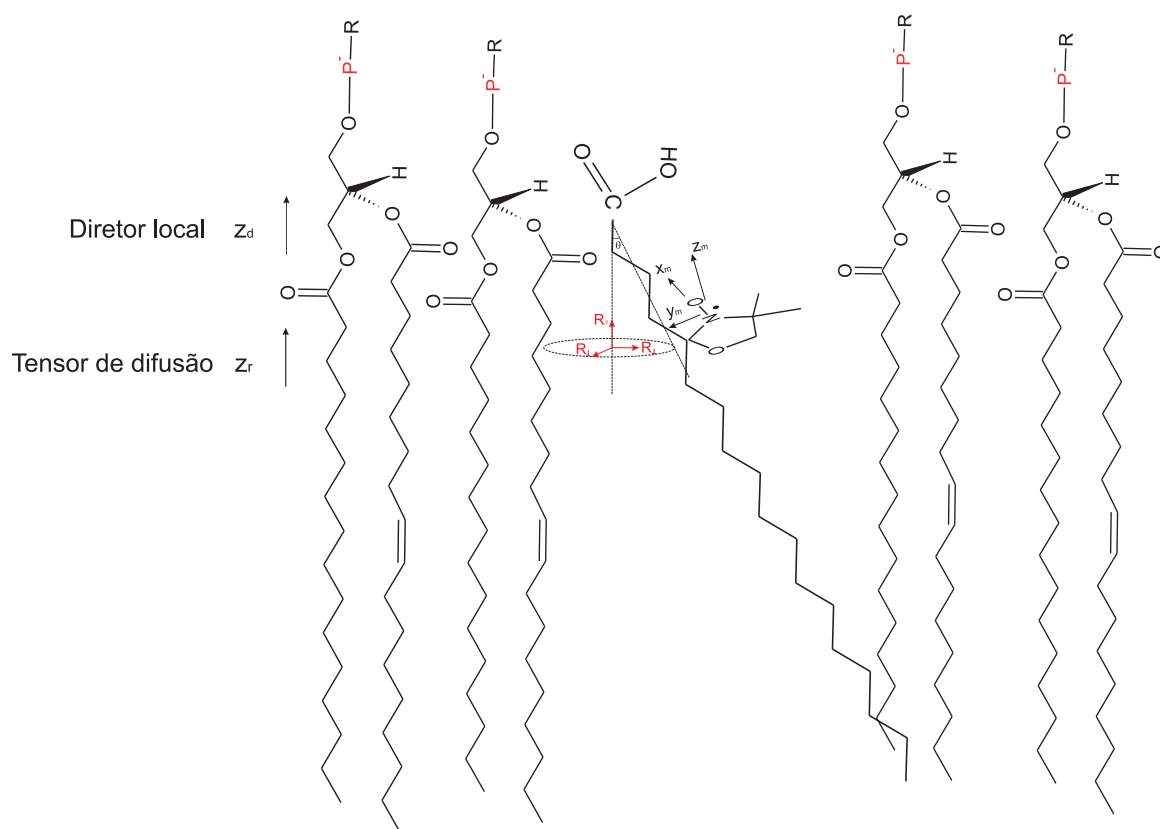


Figura 2.14: Representação esquemática do marcador de spin 5-DSA com alguns eixos dos sistemas de coordenadas. O eixo z_d é o diretor local da membrana, z_r é o eixo de simetria da cadeia acila sendo paralelo ao diretor local, $R_{||}$ e R_{\perp} são os valores principais do tensor de difusão, θ é o ângulo de inclinação da cadeia acila relativo ao eixo, z_r está relacionado com o parâmetro de ordem e x_m , y_m e z_m são os eixos magnéticos do radical nitroxídeo [84].

Geralmente a difusão rotacional molecular do marcador inserido em membranas lipídicas é descrita pela média das taxas de difusão rotacional dada por

$$R_{bar} = \bar{R} \equiv (\overline{R_x R_y R_x})^{1/3} \quad (2.37)$$

em que R representa a média geométrica das constantes de difusão rotacional sobre cada um dos eixos de difusão molecular. De forma análoga, a anisotropia de rotação axial pode ser dada por

$$\bar{N} \equiv R_z / (R_x R_y)^{1/2} \quad (2.38)$$

onde N é a razão entre as taxas das constantes de difusão rotacional em relação aos eixos perpendiculares e paralelo ao eixo z_d . No caso da simetria axial, em que $R_x = R_y$, a definição de R_{bar} pode ser escrita como

$$R_{bar} = \log \bar{R} \quad (2.39)$$

$$\bar{R} = (R_{\perp}^2 R_{\parallel})^{1/3}, \quad (2.40)$$

sendo que esta forma mais simples facilita os cálculos no programa, e ainda torna possível adicionar o termo que fornece a anisotropia de rotação axial [84].

O tensor de difusão rotacional caracteriza o tempo de correlação rotacional do marcador de spin. Este tempo possui uma relação com a largura de linha dos espectros de RPE, ou seja, quanto maior a largura de linha, maior o tempo de correlação, pois será menor a mobilidade da sonda. Além desses parâmetros que afetam a forma de linha do espectro, existe também uma matriz de largura de linha lorentziana adicional anisotrópica $W(G)$, que pode alargar seletivamente a linha do espectro de RPE correspondente a cada componente (w_{xx}, w_{yy}, w_{zz}) . No caso do nitróxido, por exemplo, w_{zz} monitora o alargamento

das linhas extremas (de campo mais baixo e de campo mais alto) que correspondem a g_{zz} e A_{zz} .

Como em nosso trabalho usamos marcadores lipídicos inseridos em uma bicamada lipídica devemos considerar que os marcadores sentem um potencial restaurador que restringe a amplitude de seu movimento rotacional. Assim, a tendência da sonda em se ordenar neste meio pode ser modelada por um potencial de orientação $U(\Omega)$, sendo $U(\beta, \gamma)$ o ângulo sólido formado entre o eixo diretor e o de difusão. De forma geral, a função potencial $U(\Omega)$ pode ser expandida em uma série de harmônicos esféricos [85].

$$U(\Omega) = -k_B T \sum_{k,l} C_{k,l} Y_k^l(\Omega), \quad (2.41)$$

em que k_B é a constante de Boltzman, T corresponde à temperatura do sistema, $C_{k,l}$ representam os coeficientes do potencial e Y_k^l os harmônicos esféricos normalizados. Por questão de simetria e utilização, geralmente são considerados somente os termos $c_{2,0}$ e $c_{2,2}$ na expansão de $U(\Omega)$, resultando em uma equação mais simples que pode ser escrita como

$$U(\beta, \gamma) = -k_B T \left[C_{2,0} \frac{3\cos^2(\beta) - 1}{2} + C_{2,2} \frac{\sqrt{3}\sin^2(\beta)\cos(2\gamma)}{2} \right]. \quad (2.42)$$

O coeficiente $C_{2,0}$ está relacionado com a dispersão angular em relação ao eixo diretor z_d , de forma que quanto maior o módulo de $C_{2,0}$ menor é o ângulo de oscilação em torno de z_d . Já o coeficiente $C_{2,2}$ representa a ordem na direção perpendicular a z_d , assim quanto maior for o seu módulo menor será a dispersão angular, ou seja, maior a probabilidade de se observar o eixo molecular orientado em $\beta = 90^\circ$ em relação a z_d . Com isto o $c_{2,2}$ representa uma medida da anisotropia no plano diretor perpendicular (xy) [84].

Assim que o programa *NLLS* encontra a solução, ele realiza um ajuste do espectro teórico ao experimental por meio de um algoritmo de minimização envolvendo o método de mínimos quadrados não lineares. Neste algoritmo de otimização, o método

utilizado é o quase-Newton que apresenta a vantagem de incluir convergência global, e um maior controle de flexibilidade sobre os critérios de convergência, de tal forma que iterações excessivas sejam evitadas.

Capítulo 3

Objetivos

3.1 Objetivos Gerais

Avaliar as interações da MT em membranas modelo, membranas de eritrócitos e de seus DRMs e em membranas de *Leishmania (L.) amazonensis* promastigota através da técnica de RPE e o método de marcadores de spin. Verificar se há uma relação entre os efeitos da MT nas membranas com a citotoxicidade sobre os parasitos, realizando ensaios de inibição do crescimento dos parasitos bem como sua morte através da contagem microscópica.

3.2 Objetivos específicos

- * Medir a concentração de colesterol nos DRMs e ghosts de eritrócito;
- * Verificar os efeitos da MT em vesículas preparadas com lipídios constituintes dos rafts;
- * Utilizar a espectroscopia de RPE para avaliar os efeitos da MT na dinâmica

de lipídios e proteínas da membrana do eritrócito, tanto em ghosts como em seus DRMs;

- * Avaliar o potencial hemolítico da MT tanto em solução tampão fisiológico como diretamente no sangue total;

- * Realizar medidas de fluidez em membrana plasmática da *Leishmania* por meio da técnica de RPE para avaliar os efeitos da MT;

- * Realizar testes de citotoxicidade da MT nos parasitos da *Leishmania* para as concentrações citotóxicas da MT com as que produzem alterações na membrana celular.

Capítulo 4

Materias e Métodos

4.1 Reagentes Químicos e Parasitos

A MT, os marcadores de spin 5-doxil ácido esteárico (5-DSA), 4-maleimido-1-oxil-2 ,2,6,6-tetrametilpiperidina (6-MSL) e o colesterol (Chol) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA). A esfingomielina (SM), 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (POPC) e 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DPPC), foram comprados da Avanti Polar Lipids Inc. (Alabaster, EUA). Todos os reagentes foram do mais alto grau de qualidade disponível no mercado. As soluções foram preparadas com água milli-Q.

O isolado de referência (MHOM/BR/75/Josefa) na forma promastigota foram cultivadas e preparadas no Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás (IPTESP/UFG). Os parasitos foram cultivados em placas de microtitulação com 24 poços a 26 °C contendo meio Grace (Sigma-Aldrich), suplementado com soro fetal bovino 20% (FCS), 2 mM de L-glutamina, 100 U/ mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomomicina (Sigma-Aldrich).

4.2 Preparação e Marcação de Vesículas de Lipídios Constituintes de Rafts

As misturas de POPC: CHOL: DPPC, SM: Chol: DPPC ou SM: POPC: Chol em várias razões molares, com ou sem MT a 20 mol% foram preparadas em clorofórmio, e a sonda (marcador de spin) 5-DSA foi adicionado a uma razão 1:100 de lipídio. Filmes destas misturas lipídicas foram formados em tubos de vidro por evaporação do solvente sob um fluxo de gás de N_2 e foi mantido sob vácuo durante a noite para remover qualquer solvente orgânico residual. Uma solução salina tamponada com fosfato (PBS, 10 mM de fosfato, 154 mM de NaCl, 500 μ M EDTA, pH 7,4) foi utilizada para hidratar o filme lipídico e formar as suspensões de vesículas multilamelares. Para formar vesículas unilamelares, as suspensões multilamelares passaram por um processo de extrusão usando o mini-extrusor da Avanti Polar Lipids Inc. (Alabaster, EUA), com um filtro de policarbonato de 0,1 μ m. Este processo de extrusão, que consistiu em uma série de 21 passagens, foi realizado a 55 °C. Posteriormente, as suspensões de vesículas unilamelares foram transferidas para tubos capilares, os quais foram selados para as medições por RPE.

4.3 Preparação das Membranas de Eritrócito

O sangue foi coletado de doadores humanos normais no Instituto Goiano de Oncologia e Hematologia (INGOH) e mantido a uma temperatura de 4 °C. Primeiramente, os eritrócitos foram isolados por várias centrifugações a 300xg a 4 °C utilizando uma solução salina tamponada de fosfato (PBS, 5 mM de fosfato, 150 mM NaCl, 0,2 mM EDTA, pH 7,4) como descrito por Beutler e colaboradores [86]. Os eritrócitos a um hematócrito de 10% foram hemolisados em uma solução tamponante hipotônica de fosfato (5 mM de fosfato,

pH 8,0) e incubados por 12 horas a 4 °C. Após este período a solução de eritrócito foi centrifugada várias vezes a 18000xg durante 10 minutos mantendo-se a temperatura em 4 °C. No final de cada centrifugação o sobrenadante foi cuidadosamente removido até que toda hemoglobina fosse retirada de acordo com o método de preparação das membranas de eritrócito [87]. Por fim as membranas já com aspecto transparente (ghosts) foram então ressuspensas em PBS.

4.4 Purificação do DRM

Nesta etapa de preparação das amostras de DRMs, os ghosts de eritrócito preparados anteriormente foram tratados com o detergente Triton X-100 (Tx-100) a 10%(v/v) em tampão Tris (25 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7,4)(TNE). Depois de 30 minutos a 4 °C, o extrato foi misturado com um volume igual de TNE a 80%(p/v) de sacarose, que em seguida foi distribuído em frações de 900 µL e sobreposto com outras frações de 1750 µL e 900 µL de sacarose a 30% e 5%(p/v), respectivamente, nos tubos da ultracentrifuga de rotor SW41. A ultracentrifugação foi realizada por 4 horas sob rotação de 225000xg com temperatura de 4 °C, assim, devido ao gradiente de sacarose, uma fração rica em colesterol e esfingolipídios surge durante a ultracentrifugação, sendo correspondente a 560 µL da segunda fração como descrito por Domingues e colaboradores [88]. As amostras foram então cuidadosamente retiradas e estocadas em freezer a -20 °C.

4.5 Quantificação de Proteína em Ghosts e DRMs de Membranas de Eritrócito

Após a preparação das amostras de ghosts e de DRMs, foi feito a quantificação das proteínas presentes a fim de obter amostras de igual teor proteico para serem tratamento com MT. Neste caso foi feito o uso de um método que utiliza do ácido bicinconínico (BCA) [89] adquirido da empresa Sigma Chem. Co. (St Louis, MO). Este método se baseia na capacidade dos aminoácidos presentes nas proteínas reduzirem o Cu^{2+} a Cu^{1+} , em meio alcalino, que juntamente com o BCA, forma um complexo de cor púrpura conforme pode ser observado na Figura 4.1, sendo este método o que se tem de melhor atualmente superando o de Lowry [90].

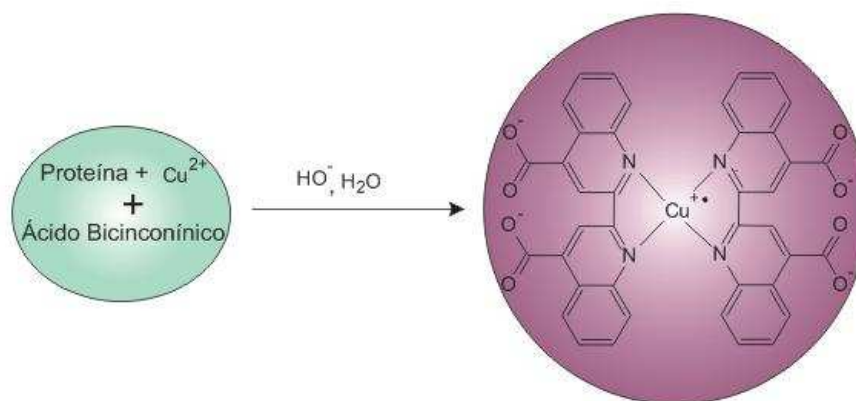


Figura 4.1: Princípio da quantificação de proteína pelo método BCA.

Neste processo uma pequena alíquota da amostra foi adicionada à solução de BCA que ficou incubada por 30 minutos a $37^{\circ}C$. Após este tempo sua absorvância foi medida no espectrofotômetro a 562 nm . Desta forma, a concentração de proteínas presentes nas membranas de ghosts e DRMs foi determinada por meio da comparação

da absorbância das amostras com uma curva característica de calibração preparada com albumina de soro bovino (BSA) mostrada na Figura 4.2.

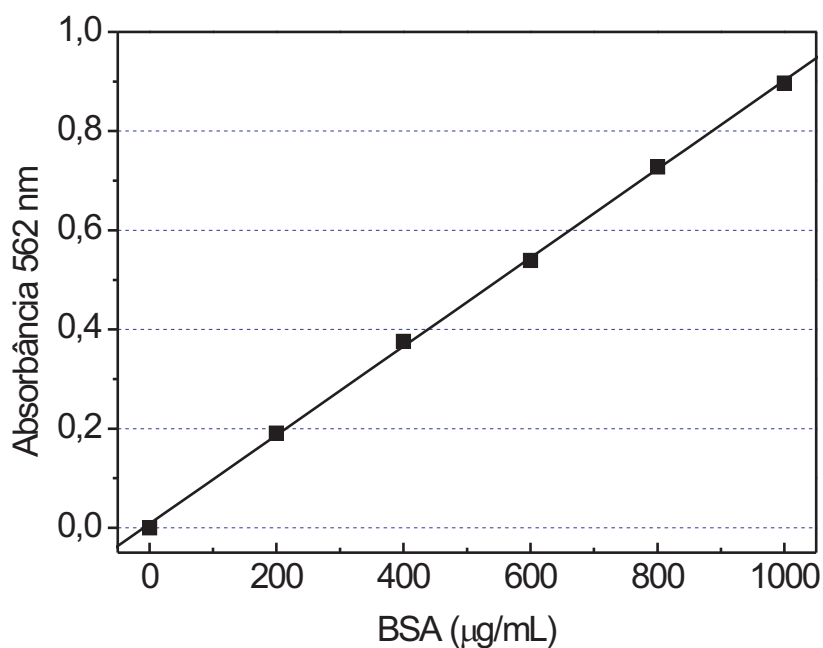


Figura 4.2: Curva de calibração utilizada para determinar a concentração de proteínas nas amostras de ghosts e DRMs das membranas de eritrócitos.

O teor de colesterol das amostras de ghosts e DRMs foi medido por um sistema enzimático utilizando o teste Liquiform Colesterol (Labtest, Minas Gerais, Brasil) e BIO PLUS modelo BIO 2000 photometer.

4.6 Potencial Hemolítico da Miltefosina

Para fazer os filmes de MT em tubos variando de 3 a 60 µg MT/tubo, alíquotas da solução estoque de MT em etanol (3, 30 e 100 mg/mL) foram usadas e 100 µL de plasma de sangue total foi adicionado ao filme de cada tubo de ensaio. Após agitação moderada,

os tubos foram incubados a 37 °C durante 1,5 h. Os eritrócitos foram então precipitados por centrifugação a 300xg a 25 °C durante 10 min. O grau de hemólise foi determinado espectrofotometricamente a 540 nm com base na seguinte equação:

$$Hemolise(\%) = \frac{A_a - A_{c1}}{A_{c2} - A_{c1}} \quad (4.1)$$

onde A_{c1} corresponde a absorbância da amostra de controle (0% de MT), A_{c2} a absorbância da amostra totalmente hemolisada em água Milli-Q e A_a a absorbância da amostra que contém a concentração desejada MT.

4.7 Incorporação dos Marcadores nas Membranas e Tratamento com Miltefosina

Para a incorporação do marcador de spin entre os lipídios das membranas de ghosts e DRMs de eritrócito, um filme do marcador de spin foi formado na parte inferior de um tubo de ensaio. 1 μ L de uma solução estoque do marcador de spin 5-DSA em etanol (4 mg/mL) foi transferida para um tubo de vidro. Depois que o solvente foi evaporado, 50 μ L de ghosts ou de DRMs (4 mg de proteína por mL) foram adicionados sobre a película do marcador de spin e o tubo de ensaio foi agitado suavemente. Após a incorporação do marcador de spin, um procedimento semelhante foi usado para tratar as membranas com MT. Uma alíquota de uma solução estoque de MT em etanol (30 ou 100 mg/mL) foi utilizada para fazer um filme em um tubo de vidro, na concentração desejada. As proteínas das membranas de ambas as amostras de ghosts e/ou DRMs foram marcadas por meio de incubação durante 2 horas a 4 °C pela adição de um excesso do marcador de spin específico para grupos tióis (6-MSL). Para remover os marcadores de spin livres (que não reagiram), centrifugamos e removemos o sobrenadante (repetindo o processo por 8 vezes),

no caso das amostras de ghosts e para os DRMs dialisamos as amostras durante 24 horas a 4 °C em PBS.

A interação da MT com membranas de eritrócito também foi avaliada adicionando MT diretamente no sangue total. Uma amostra de sangue foi centrifugada e imediatamente o soro foi separado do sangue. Após os eritrócitos serem marcados com 6-MSL (por 1 h de incubação), o soro foi retornado para restaurar o sangue. Em seguida o sangue foi tratado com MT por um processo semelhante ao utilizado para o tratamento dos ghosts de eritrócito.

Para incorporar o marcador de spin 5-DSA na membrana plasmática da *Leishmania*, foi preparado um filme usando o mesmo método utilizado para marcar as membranas de ghosts e DRMs de eritrócito. Após a evaporação do solvente, 50 µL de *Leishmania* contendo 10⁸ células suspensas em PBS foram adicionados ao filme de marcador de spins, seguido por agitação suave. Após marcar as membranas com 5-DSA, um procedimento semelhante ao que foi feito em ghosts e DRMs foi utilizado para incorporar a MT na membrana de *Leishmania*. Da mesma forma que nas membranas de eritrócito, o marcador de proteína específico para o grupo tiol, 6-MSL, foi utilizado para marcar as proteínas da membrana da *Leishmania*, usando um período de incubação de 2 horas a 26 °C. Para remover os marcadores livres, a suspensão de *Leishmania* foi centrifugada (5000xg, 4 °C) durante 15 min e em seguida ressuspensa em PBS, este procedimento foi repetido por 8 vezes. Cada amostra marcada e tratada foi então introduzida em um tubo capilar de 1 mm de diâmetro que foi selado usando chama para em seguida realizar a medição de RPE.

4.8 Medições da Ruptura da Membrana de *Leishmania*

Num intervalo de tempo de 1 a 5 minutos após marcar as proteínas da membrana de *Leishmania* e tratá-las com MT, tal como descrito acima, as amostras foram centrifugadas a $18000\times g$ durante 15 *min* à temperatura ambiente, sendo então o sobrenadante transferido para um tubo capilar para verificar a presença de fragmentos de membrana marcada, usando a espectroscopia de RPE. Alternativamente, o teor de proteína no sobrenadante foi medida usando um kit comercial (Sigma), com base na reação do ácido bicinconínico (BCA).

4.9 Ensaios de Atividade Antiproliferativa *in Vitro*

As promastigotas em concentrações de 2×10^7 a 2×10^9 células/mL em meio de cultura enriquecido com 10% ou 20% de FCS foram incubados durante um período de 5 *min*, 1 *h* ou 24 *h* em placas de cultura de 96 poços (Corning Life Sciences, Corning, EUA), com concentrações crescentes de MT (1-80 μ M). A viabilidade celular foi avaliada através do método de ensaio que mede a clivagem do Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio (MTT) (Sigma-Aldrich) pelas células metabolicamente ativas.

Resumidamente, os parasitas foram incubados numa solução contendo 5 *mg*/mL de MTT durante 3 horas a 26 °C, logo após as células foram lisadas, e os cristais de formazan solubilizados, primeiro pela adição de 100 μ L de uma solução de dodecil sulfato de sódio (10% SDS em 50% de dimetilformamida) em cada poço, e depois pela incubação das amostras por mais 18 horas a 37 °C. Com o término da incubação, a absorbância foi lida a 550 *nm* utilizando um espectrofotômetro T80 + (PG Instruments, Wibtsoft, England). As medições foram realizadas em triplicata para cada tratamento, e os valores obtidos foram

utilizados para calcular a percentagem média de células viáveis em relação as amostras não tratadas com MT (controle). A concentração inibitória de 50% (IC_{50}) foi então determinado com base num ajuste sigmoidal (função de Boltzmann) da curva de concentração-resposta. O valor médio de IC_{50} e seu desvio padrão foram obtidos a partir de pelo menos três experimentos independentes.

Alternativamente, após o tratamento das promastigotas *Leishmanias (L.) amazonensis* com MT, a viabilidade das células e a inibição do crescimento foram avaliadas através da contagem microscópica das células vivas e mortas utilizando o método de exclusão de azul de tripano. Nessa etapa dos experimentos, as células foram ressuspensas em PBS ou meio de cultura contendo 10^8 células/50 μL , tratada com MT da mesma forma utilizada para as medidas de RPE (usando filmes MT na parte inferior do tubo de vidro). Após uma diluição de 40 vezes, foi adicionado 0,1% (p/v) de azul de tripano (Sigma-Aldrich). As células vivas e mortas em cada amostra foram contadas numa câmara de Neubauer após vários períodos de incubação (5 min, 1 h, 2 h, 4 h e 24 h).

4.10 A Espectroscopia de RPE

Um espectrômetro Bruker ESP 300 (Bruker, Rheinstetten, Alemanha) equipado com um ressonador 4102ERST foi utilizado para realizar as medições de RPE. Os parâmetros do instrumento foram os seguintes: potência de microondas, 2 mW, modulação de frequência, 100 kHz, modulação de amplitude, 1,0 G; varredura de campo magnético, 100 G; tempo de varredura, 168 s, constante de tempo de detecção, 41 ms e temperatura, 25 °C. As simulações de espectros de RPE foram realizadas utilizando o programa “non-linear least-square”(NLLS) [91]. Nos cálculos espectrais, o programa NLLS inclui os tensores magnéticos \overleftrightarrow{g} e \overleftrightarrow{A} e o tensor de difusão de rotação \mathbf{R} , que expressa as taxas rotacionais

em torno dos eixos de um sistema cartesiano fixado na molécula do marcador de spin.

Para reduzir o número de parâmetros nos ajustes e simplificar a simulação, a taxa de difusão rotacional média R_{bar} foi calculada pelo programa de ajuste com base na relação $R_{bar} = (R_{per} \cdot 2R_{par})^{1/3}$, em que R_{per} é a componente perpendicular e R_{par} é a componente paralela da difusão rotacional. O parâmetro R_{bar} foi convertido para o tempo de correlação rotacional (τ_C) através da relação $\tau_C = 1/6R_{bar}$ [91]. Semelhante a estudos anteriores [93, 94], os parâmetros magnéticos foram determinados através de uma análise global dos espectros obtidos neste trabalho, e todos os espectros de RPE foram simulados utilizando os mesmos parâmetros magnéticos dos tensores \overleftrightarrow{g} e \overleftrightarrow{A} .

4.11 Análise Estatística

Todos os dados apresentados estão expressos como a média \pm desvio padrão de pelo menos três experimentos independentes. Os dados foram comparados através de uma análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey para diferenças estatisticamente significativas com $P < 0,05$.

Capítulo 5

Resultados

5.1 Efeito da Miltefosina em Vesículas Preparadas com Lipídios Formadores de Rafts

Misturas lipídicas utilizadas para imitar plataformas lipídicas coexistentes em domínios-rafts são geralmente compostas de misturas ternárias de POPC/SM/Chol ou então de SM/DPPC/Chol [98–100]. Para examinar as características biofísicas destes sistemas de membranas modelo, com ou sem 20 mol% de MT, preparamos vesículas com diversas proporções molares destes componentes lipídicos. Os espectros de RPE do marcador de spin 5-DSA (Figura 2.7) em vesículas de POPC/Chol/DPPC/MT e SM/Chol/DPPC/MT, bem como os valores do parâmetro espectral $2 A_{||}$, que mede a separação hiperfina das linhas externas do espectro, tem sido amplamente utilizado para monitorar a fluidez da membrana, no entanto, em princípio, o $2 A_{||}$ é um parâmetro estático associado à distribuição e orientação dos marcadores de spin na membrana (ordem molecular). A Figura 5.1 mostra o comportamento deste parâmetro para diferentes combinações lipídicas.

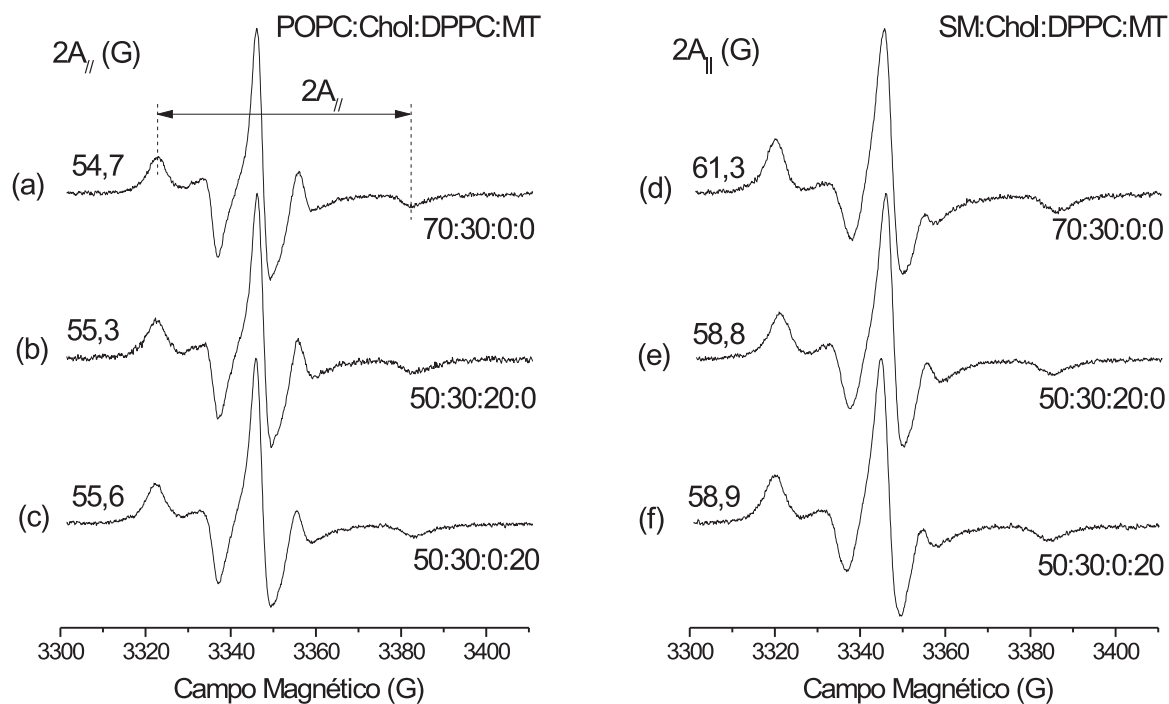


Figura 5.1: Espectros de RPE do marcador 5-DSA em vesículas de várias composições de lipídios e seus correspondentes valores do parâmetro $2A_{||}$. Como indica na figura o $2A_{||}$ é a separação em unidades de campo magnético entre o primeiro pico e o último vale (indicados por linhas verticais) do espectro. Este parâmetro diminui com o aumento da fluidez da bicamada lipídica; seu erro experimental é de 0,5 G.

O espectro (a) correspondente a vesícula de POPC/Chol/DPPC/MT em uma razão molar 70:30:0:0, teve como medida um $2A_{||}$ de 54,7 G. A substituição de 20 mol% do lipídio insaturado POPC por 20 mol% do lipídio saturado DPPC na bicamada lipídica tornou menos fluido ($2A_{||} = 55,3$ G espectro b), e quando a MT foi substituída em vez da DPPC, um resultado equivalente foi observado, ($2A_{||} = 55,6$ G espectro c). Isto sugere que a MT pode substituir a DPPC sem alterar a fluidez da bicamada.

Ao substituir 70 mol% de POPC com a mesma fração molar de SM, houve uma grande diminuição da fluidez, tal como indicado pelo valor de $2A_{||} = 61,3$ G do espectro (d). O espectro (d), em comparação com (e), mostrou que a presença de SM tem uma maior contribuição para uma membrana menos fluido do que a DPPC ($2A_{||}$ de 61,3 e 58,8 G, respectivamente). A substituição de DPPC por MT na vesícula não resultou em nenhuma alteração na fluidez da bicamada lipídica. De maneira similar a substituição de 20 mol%

de SM por 20 mol% de MT dentro de várias composições de SM/POPC/Chol não mudou essencialmente o espectro RPE (Figura 5.2).

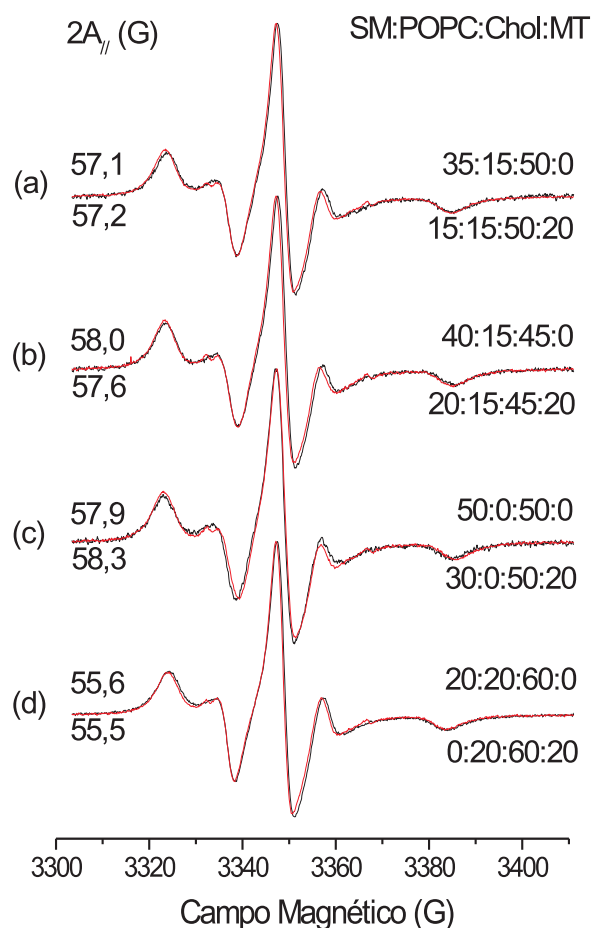


Figura 5.2: Espectros de RPE sobrepostos e os correspondentes valores do $2 A_{||}$ do marcador 5-DSA em vesículas compostas por SM-POPC-Chol-MT em diversas proporções molares. Os dados acima e abaixo do par de espectros sobrepostos referem-se a espectros representados por linhas vermelhas e pretas, respectivamente. As diferenças nos valores do $2 A_{||}$ para os espectros sobrepostos não excedem o erro experimental de 0,5 G.

Na Figura 5.2 pode-se observar que a diferença do parâmetro $2 A_{||}$ para os pares de espectros apresentados é menor do que o erro experimental (0,5 G), sugerindo que o efeito da MT sobre a dinâmica dos lipídios nestas composições foi semelhante à da SM.

5.2 Efeito da miltefosina em ghosts e DRMs de Eritrócito

A proporção de colesterol/proteína obtidos nas amostras de ghosts e DRMs foram $0,254 \pm 0,006$ e $0,514 \pm 0,127$, respectivamente, para três preparações independentes, indicando uma concentração mais elevada de colesterol nos DRMs. Os espectros de RPE do marcador de spin 5-DSA, em ghosts e DRMs de eritrócito são mostrados na Figura 5.3.

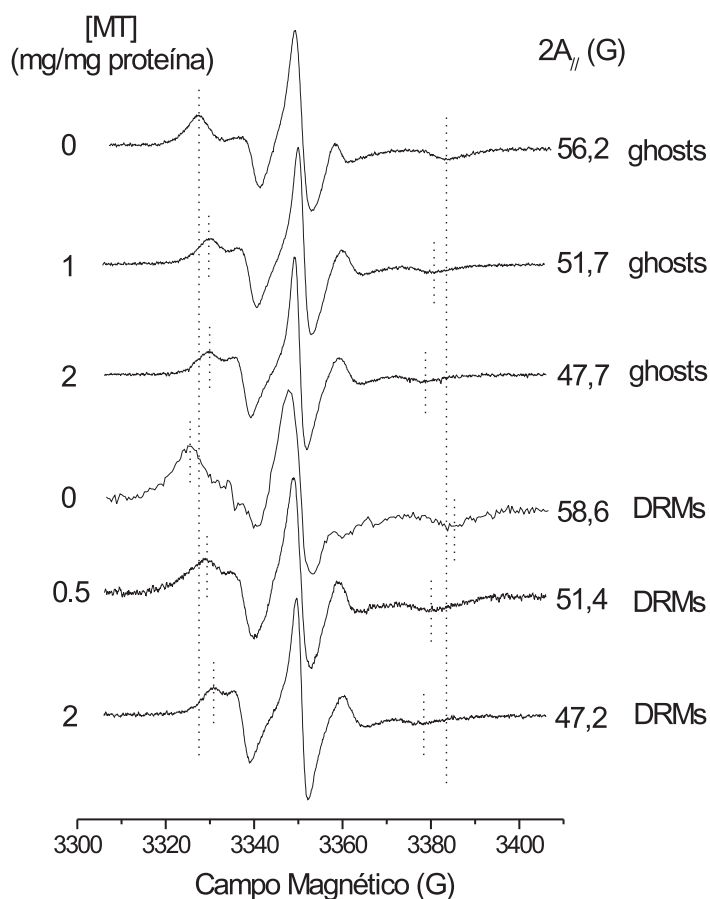


Figura 5.3: Espectros de RPE do marcador de spin 5-DSA em amostras de ghosts e DRMs de eritrócito para amostras não tratadas e amostras tratadas com miltefosina. As linhas verticais melhoraram a visualização das mudanças no parâmetro $2 A_{||}$.

O tratamento com MT causou uma diminuição substancial no parâmetro de RPE $2 A_{\parallel}$, o que indica um grande aumento na fluidez da membrana. A Figura 5.4 mostra a dependência da concentração de MT com o parâmetro espectral $2 A_{\parallel}$. Os aumentos de até 10 G nos valores deste parâmetro são considerados grandes e correspondem a um aumento da fluidez que pode ser obtido através da variação de temperatura dos ghosts de eritrócito de cerca de 30°C [101].

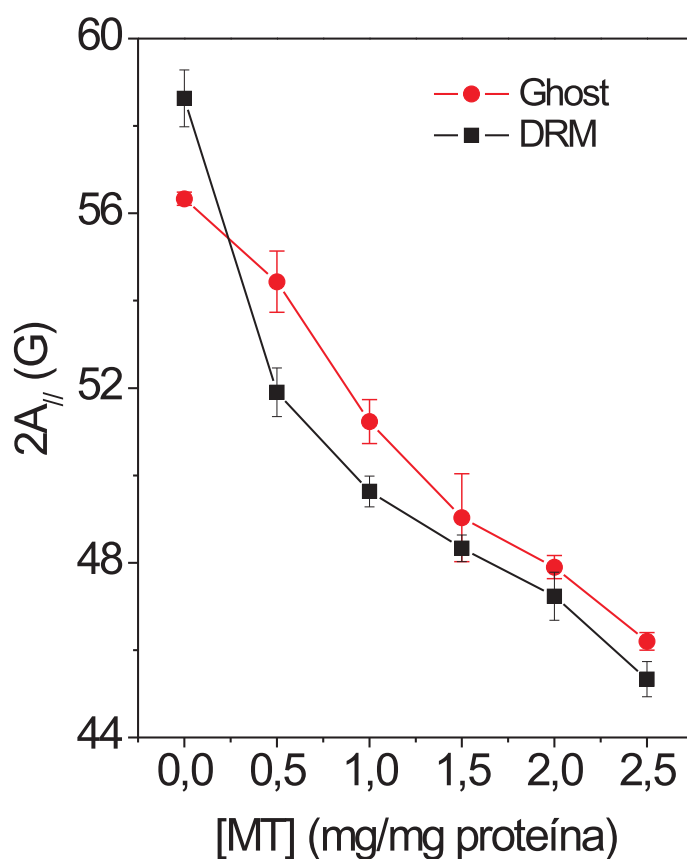


Figura 5.4: Parâmetro espectral $2 A_{\parallel}$ do marcador de spin 5-DSA em amostras de ghosts e DRMs de eritrócito em função da concentração de miltefosina. As médias e desvios padrão foram calculados a partir de três experimentos independentes.

Vale notar que preparamos amostras de DRMs seguindo um protocolo experimental utilizado em diversos trabalhos que têm caracterizado os DRMs por vários métodos.

Como mostrado na Figura 5.4 para as amostras de controle, o DRM foi mais rígido do que a membrana de ghost, que está de acordo com os dados relatados para o marcador de spin em DRMs de eritrócito [102]. Para examinar as mudanças dinâmicas na componente de proteína de membrana, foi feito o uso do marcador de spin maleimido 6-MSL (Figura 2.7). Os espectros de RPE do marcador 6-MSL ligado a grupos sulfidrilo tanto nos ghosts como nos DRMs, tratados e não tratados com MT, são mostrados na Figura 5.5.

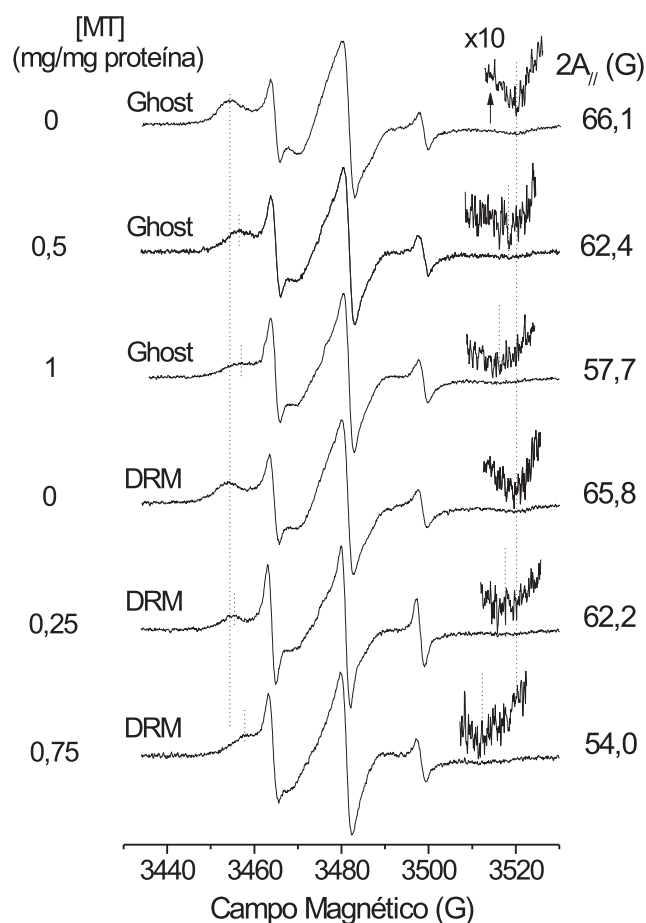


Figura 5.5: Espectros de RPE do marcador de spin 6-MSL covalentemente ligado aos grupos sulfidrila dos ghosts e DRMs de eritrócito para amostras não tratadas (controle) e para amostras tratadas com diferentes concentrações de MT. A região do último pico (invertido) no espectro foi ampliada 10 vezes para facilitar a visualização da posição de campo magnético deste pico.

É importante mencionar que o número de grupos sulfidrila livres acessíveis nas amostras de ghosts foi aproximadamente 20 vezes maior do que nas amostras de DRMs

para igual teor de proteína, tal como avaliado pela intensidade dos espectros de RPE para estes dois tipos de amostras. Os espectros encontrados são típicos para as proteínas em geral, incluindo a mobilidade das cadeias de polipeptídeos, com um valor de $2A_{\parallel}$ de 65,8 G a 26 °C. Este valor é semelhante ao observado para as proteínas do estrato córneo [92–95] e também para BSA marcada em seu único grupo sulfidril [96, 97]. Os espectros de RPE mostraram que a dinâmica das cadeias polipeptídicas das proteínas de ghosts e DRMs de eritrócito é semelhante e que a adição de MT resultou em aumentos drásticos na dinâmica de ambas as amostras. A Figura 5.6 mostra que o efeito da MT foi mais pronunciado nas amostras de DRMs.

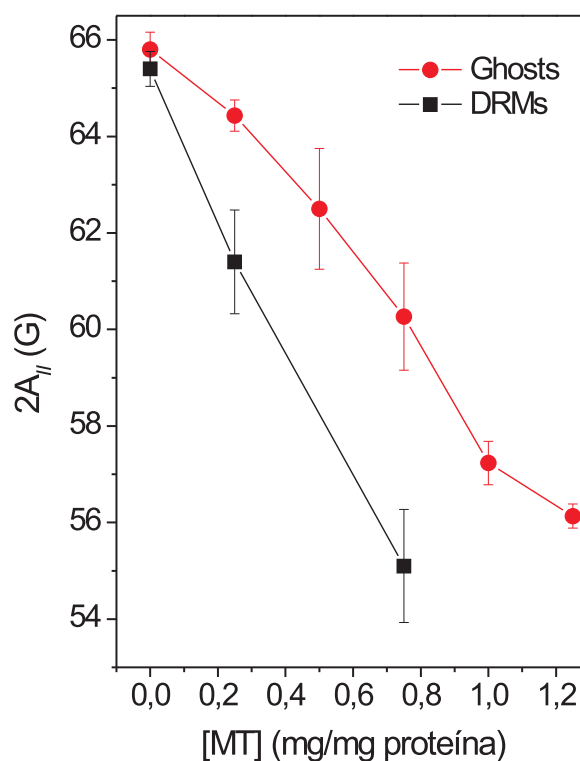


Figura 5.6: Parâmetro de RPE $2A_{\parallel}$ do marcador de spin 6-MSL ligado às proteínas de ghosts e DRMs de eritrócito como uma função da concentração de MT.

5.3 Efeito da Miltefosina em Membranas de Eritrócito Medido no Sangue Total

A farmacocinética da MT em pacientes com leishmaniose cutânea foi examinada por Dorlo e colaboradores [71] em 31 pacientes que receberam 150 mg de miltefosina por dia, durante 28 dias, seguido até 5 meses de acompanhamento após o término do tratamento. A concentração plasmática média de MT durante a última semana de tratamento foi de 30,8 $\mu\text{g/mL}$ e atingiu picos de 51,6 $\mu\text{g/mL}$ [71]. Para analisar se estas concentrações sanguíneas de MT pode produzir qualquer efeito mensurável sobre membranas de eritrócitos, foram realizadas medidas diretamente no plasma sanguíneo (Figura 5.7).

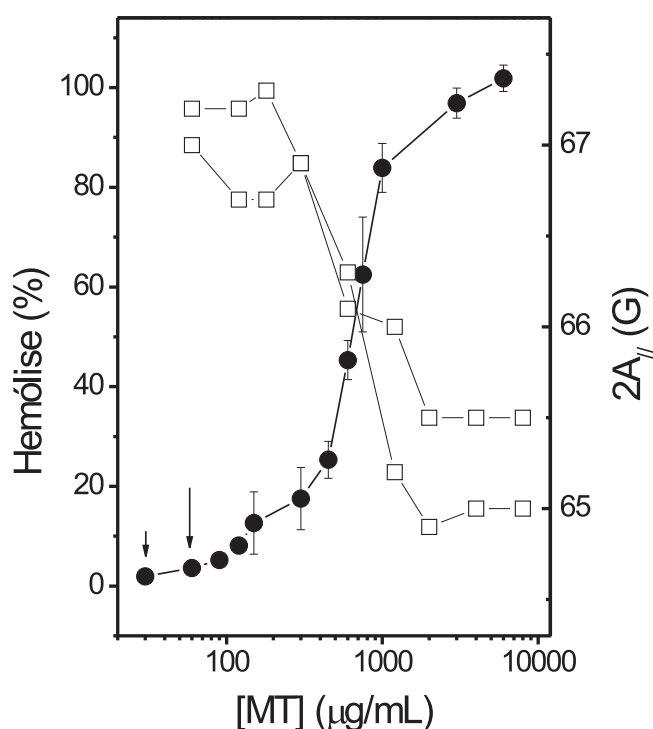


Figura 5.7: Efeitos da miltefosina em diferentes concentrações no plasma sanguíneo sobre o parâmetro de RPE $2A_{||}$ do marcador de spin 6-MSL nas membranas de eritrócito intacto (quadrados) e percentagem de hemólise (círculos). Os dois primeiros pontos experimentais indicados pelas setas são 30 $\mu\text{g/mL}$ ($2,0 \pm 0,6\%$ de hemólise) e 52 $\mu\text{g/mL}$ ($3,1 \pm 0,8\%$ de hemólise). Os dados experimentais são de dois experimentos independentes de RPE e três para a hemólise.

Neste gráfico se observa como a concentração de MT modifica o parâmetro $2 A_{||}$ do marcador de spin 6-MSL nas membranas de eritrócito intactos e causa hemólise no sangue total. A média e máxima concentração de MT no sangue observado durante o tratamento da leishmaniose cutânea foi 30,8 e 51,6 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente [71]. Nestas concentrações as percentagens de hemólise foram de $2,0 \pm 0,3$ e $3,1 \pm 0,8\%$, respectivamente.

Para os pacientes com leishmaniose visceral, foram encontrados picos elevados de concentração plasmática de MT (aproximadamente 90 $\mu\text{g/mL}$) [69], o que corresponde a $5,2 \pm 1,1\%$ de hemólise (Figura 5.7). No entanto, a concentração de MT necessária para alterar a fluidez da membrana dos eritrócitos foi de 600 $\mu\text{g/mL}$, que é a concentração que provoca 46% de hemólise.

5.4 Efeito da Miltefosina em Membranas de *Leishmania*

Os espectros de RPE do marcador de spin (5-DSA), incorporado na membrana plasmática das promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* sem tratamento e tratado com MT em diferentes concentrações (Figura 5.8), indicaram através da diminuição dos parâmetros $2 A_{||}$ e do τ_c aumentos progressivos na fluidez da membrana a medida que aumentava a concentração de MT.

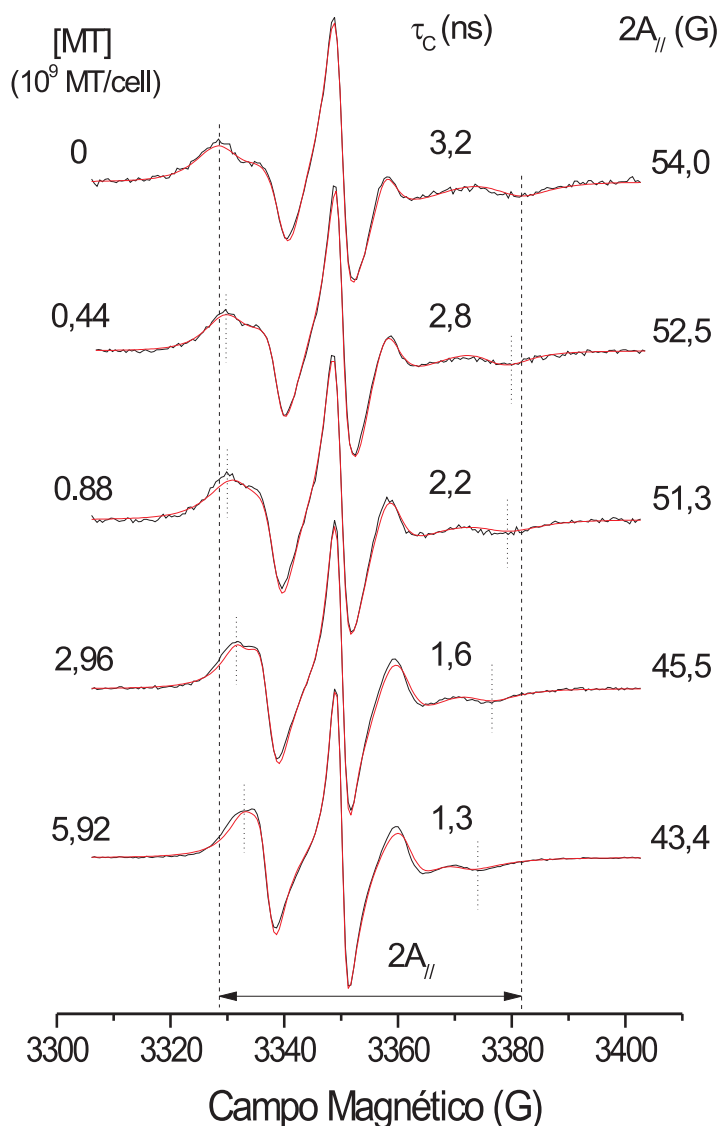


Figura 5.8: Espectros de RPE do marcador 5-DSA nas membranas plasmáticas de *Leishmania*, com ou sem tratamento com MT. Os espectros de melhor ajuste (linha vermelha) foram fornecidos pelo programa NLLS usando um modelo de duas componentes em todos os ajustes para obter a média do tempo de correlação rotacional, τ_c . Os valores dos parâmetros de RPE τ_c e $2 A_{\parallel}$ estão indicados. Estes dois parâmetros diminuem com o aumento da fluidez da membrana. Os erros experimentais obtidos para o τ_c e o $2 A_{\parallel}$ são 0,2 ns e 0,5 G, respectivamente.

Para examinar as alterações na dinâmica de proteína da membrana de *Leishmania*, o marcador de spin maleimido 6-MSL foi utilizado. O espectro de RPE do marcador 6-MSL ligado aos grupos sulfidrilas da membrana de *Leishmania* promastigota tratada e não tratada com MT estão mostrados na Figura 5.9.

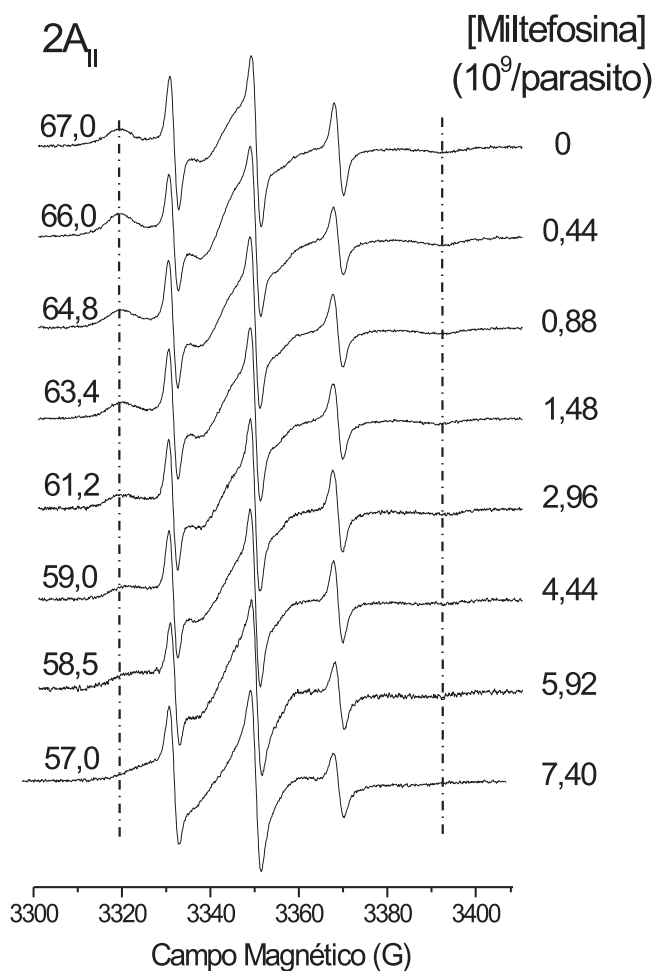


Figura 5.9: Espectros de RPE do marcador 6-MSL ligado covalentemente ao grupo sulfidril da membrana plasmática de *Leishmania* para amostras com ou sem tratamento com MT.

Os gráficos apresentados na Figura 5.10 mostram os valores do parâmetro $2A_{||}$ de ambos marcadores de spin (5-DSA e 6-MSL) para diferentes concentrações da MT em membranas de *Leishmania*. Um aumento significativo na dinâmica dos marcadores de spins tanto lipídico quanto de proteína são observados a partir de uma concentração de $0,44 \times 10^9$ MT/célula.

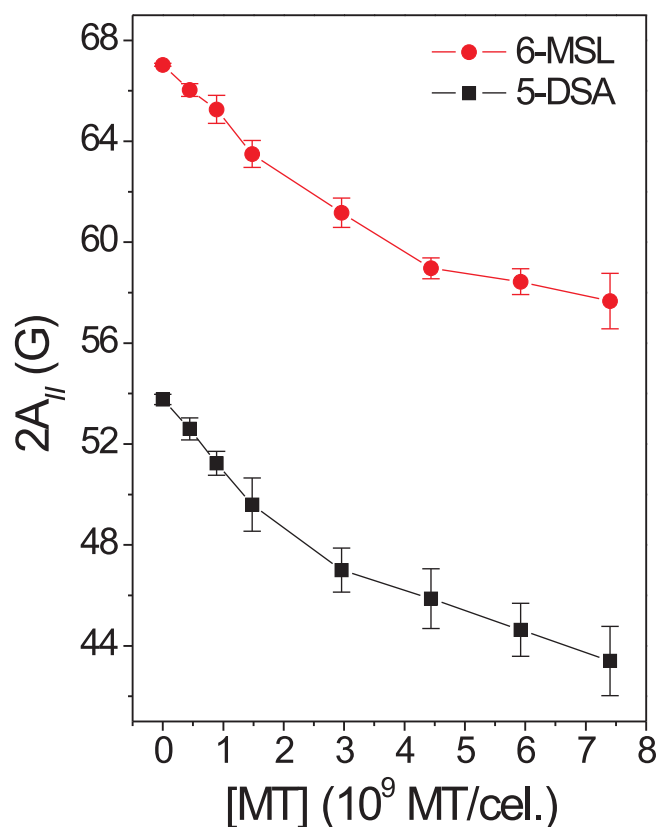


Figura 5.10: O parâmetro $2A_{||}$ para os marcadores de spin 5-DSA e 6-MSL em membranas de *Leishmania* como uma função da concentração de MT. As amostras tratadas com uma concentração de $0,44 \times 10^9$ MT/célula foram significativamente diferentes das amostras de controle $P < 0,05$ para ambos os marcadores de spin, e todas as outras amostras foram diferentes das do controle com $P < 0,01$.

Os espectros de RPE para marcadores de spin de proteína são geralmente compostos por duas componentes espectrais correspondentes a duas populações de spin associadas a dois estados de mobilidade da sonda, tecnicamente denotadas como componentes fortemente (*S*) e fracamente (*W*) imobilizadas [93, 94]. Embora a espectroscopia dos marcadores de proteínas tenha sido amplamente utilizada para analisar a estrutura da proteína através do método de marcação de spin sítio dirigido [97], a origem dessas duas componentes espectrais que aparecem resolvidas no espectro ainda não é bem compreendida. A nossa interpretação atual tem sido descrita em trabalhos anteriores [96], e pode ser resumida pela descrição a seguir.

A componente mais móvel, W , apresenta três linhas de ressonância nítidas com uma separação hiperfina isotrópica, a_0 , igual a 17,1 G, indicando um radical nitróxido dissolvido em tampão, enquanto que a componente menos móvel, S , exibe um tempo de correlação rotacional aproximadamente de uma ordem de magnitude maior do que W , indicando fortes interações entre a cadeia lateral do nitróxido e o esqueleto da proteína como ilustrado na Figura 5.11.

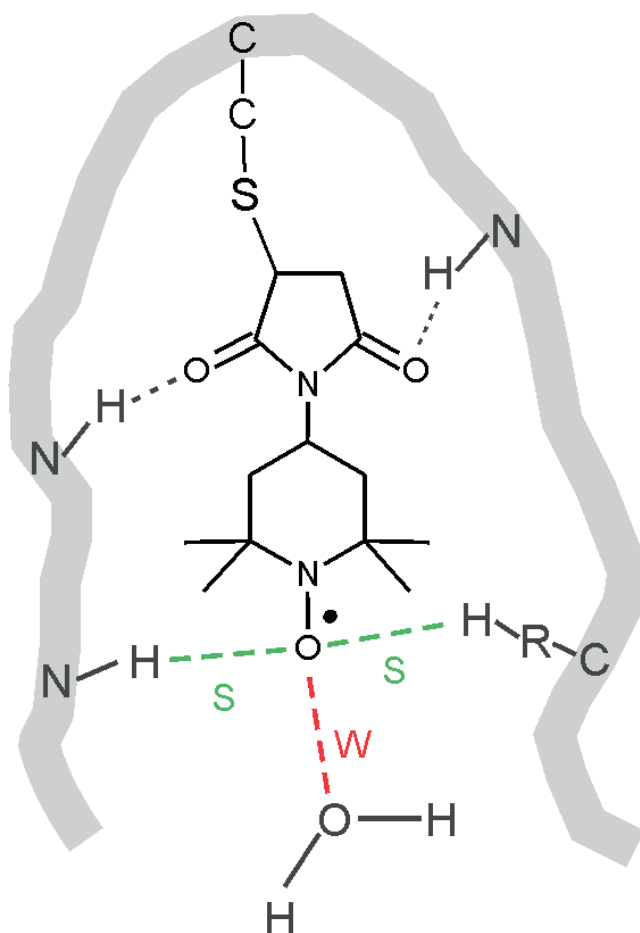


Figura 5.11: Ilustração esquemática do modelo molecular do marcador de spin 6-MSL ligado covalentemente ao grupo sulfidrílica da proteína. O radical nitróxido pode formar ligações de hidrogênio com o grupo amida da cadeia principal da proteína, gerando a componente fortemente imobilizada (S), ou com as moléculas de água para gerar a componente fracamente imobilizada (W). Também há uma possível formação de ligação de hidrogênio entre a proteína e os dois átomos de oxigênio do anel maleimido, prendendo fortemente o marcador à dobra da cadeia polipeptídica.

Uma interação que contribui para a formação da componente menos móvel, S , é uma ligação de hidrogênio entre o radical nitróxido e qualquer doador de hidrogênio na proteína, tal como deduzido a partir do valor observado da componente z do tensor hiperfino A_{zz} do ^{14}N , que pode ser avaliada por simulação espectral ou por meio de medições diretas em $-140\text{ }^\circ\text{C}$. Campos elétricos locais podem afetar a densidade do elétron não emparelhado sobre o núcleo de nitrogênio e alterar o parâmetro A_{zz} modulando a interação de contato de Fermi. Quando o radical nitróxido forma ligação de hidrogênio em um estado cristalino, o valor do A_{zz} é cerca de 35 G [103] e este valor pode ser menor em cerca de 3 G em um ambiente hidrofóbico. Assim, os valores do τ_c das componentes de W e S refletem a dinâmica do marcador de spin da cadeia lateral, quando o radical nitróxido está livre no solvente ou presa à cadeia polipeptídica local, respectivamente.

A forma de linha de RPE do movimento rápido (W) apresenta separação hiperfina isotrópico consistente com uma cadeia lateral de nitróxido dissolvido num meio aquoso, o que indica que os grupos sulfidríla da membrana acessado pelo marcador de spin são essencialmente encontrados na camada externa da membrana, onde eles são acessíveis ao solvente aquoso. Se o radical nitróxido entrar em contato com componentes do citoplasma, ele seria reduzido pelo ácido ascórbico, $F_e(II)$ ou outros agentes redutores e, assim, a intensidade do sinal de RPE diminuiria. A presença de MT diminuiu a população (ou intensidade) da componente S (N_S), proporcionando suporte para a noção de que a MT desestabiliza as proteínas da membrana, levando a conformações mais expandidas e expostas ao solvente.

Desta forma, à medida que as amostras foram tratadas com concentrações maiores de MT aumentou significativamente a dinâmica da cadeia polipeptídica das proteínas ligadas à membrana, como indicado pelos valores de τ_c e $2 A_{\parallel}$ da componente S conforme mostrado na Figura 5.12.

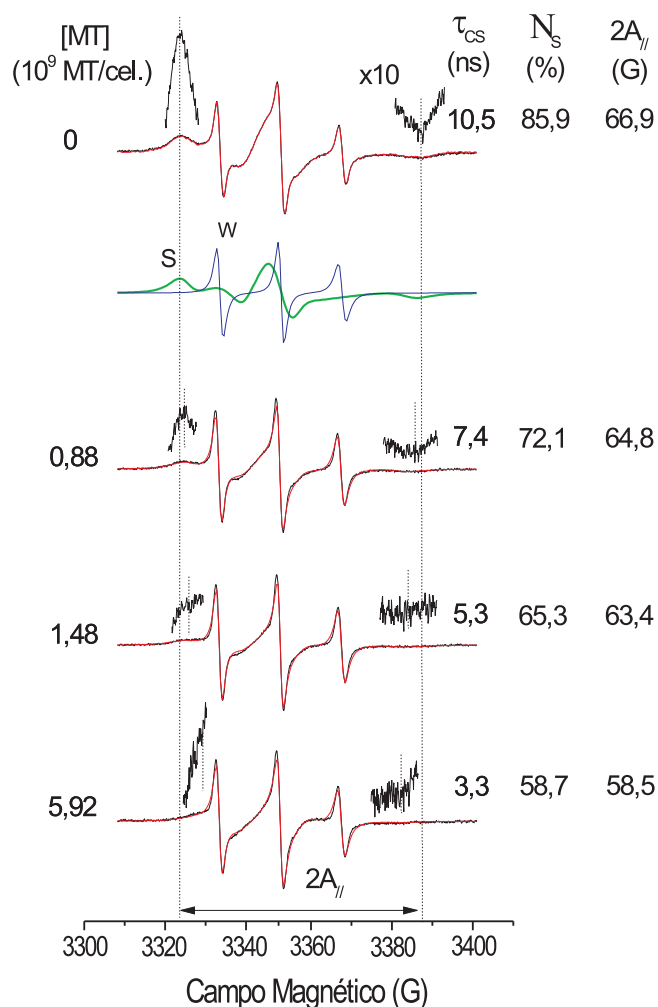


Figura 5.12: Espectros de RPE experimental (linha preta) e de melhor ajuste (linha vermelha) do 6-MSL ligado aos grupos *SH* de proteínas de membrana de *Leishmania* em amostras não tratadas e tratadas com MT. Os espectros de melhor ajuste foram obtidos pelo programa NLLS usando um modelo com duas componentes em todos os ajustes. Os espectros das componentes *S* e *W*, que juntos formam o espectro simulado da amostra de controle (primeiro espectro) são indicados pela linha verde (*S*) e linha azul (*W*). Os valores de três parâmetros de RPE estão indicados: τ_c (tempo de correlação rotacional) e N_S (população da componente *S*), os quais foram gerados pelo programa de ajuste e o $2A_{||}$ que é medido diretamente no espectro, como indicado pelas linhas verticais. As regiões correspondentes as primeiras e últimas linhas de ressonância do espectro foram amplificados 10 vezes para melhorar a visualização das posições do campo magnético.

5.5 Miltefosina Induz Lise em *Leishmania*

A lise celular foi também observada no intervalo de concentrações de MT que alteram a fluidez da membrana de *Leishmania*. Logo após o tratamento com MT, as *Leishmanias* marcadas com 6-MSL foram centrifugadas, e os espectros de RPE dos sobrenadantes foram registrados. A intensidade do espectro de RPE aumentou com a concentração de

MT nas amostras, atingindo um patamar a uma concentração de $1,48 \times 10^9$ MT/célula (Figura 5.13).

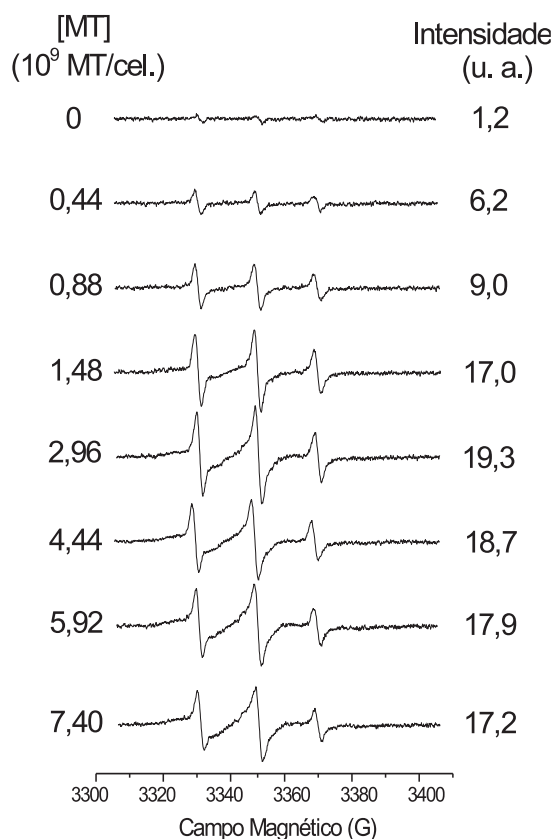


Figura 5.13: Os espectros de RPE do marcador de spin 6-MSL ligado covalentemente aos grupos sulfidrila das membranas de *Leishmania* presentes no sobrenadante das amostras de *Leishmania* tratadas com MT. Com o aumento na concentração de MT, as amostras mostraram um aumento de fragmentos de membranas marcadas no sobrenadante.

Os espectros de RPE mostrados na Figura 5.13 são para os fragmentos de membranas marcadas presentes no sobrenadante das amostras tratadas com MT. Estes espectros são semelhantes aos apresentados na Figura 5.9 obtida com concentrações mais elevadas de MT. As amostras não tratadas apresentaram um sinal de RPE fraco, provavelmente porque nem todos os marcadores de spins livres foram removidos das amostras durante o processo de preparação. Na Figura 5.14 está apresentado o gráfico da intensidade do sinal RPE em função da concentração de MT em comparação de medições de lise

celular pelo teor de proteína no sobrenadante das amostras.

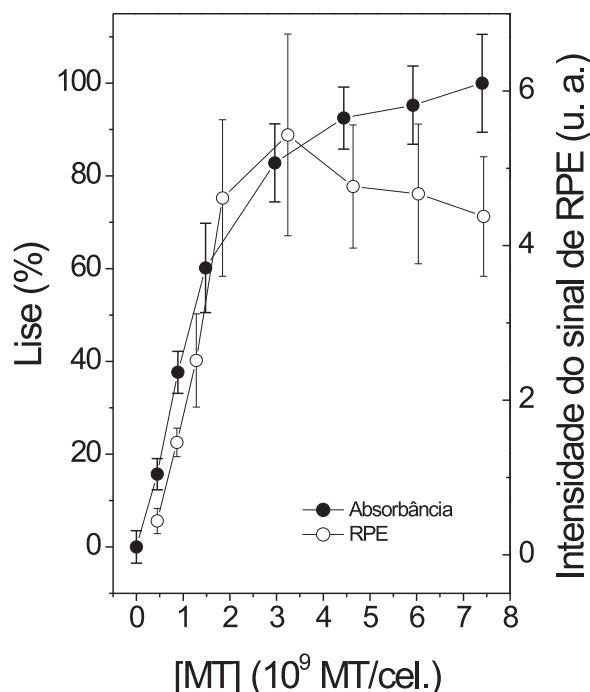


Figura 5.14: Percentagem de lise celular (círculos sólidos) e conteúdo de membrana marcada no sobrenadante (círculos abertos) em amostras de *Leishmania* tratadas com MT. As medições de lise foram baseadas no conteúdo de proteína no sobrenadante das amostras de *Leishmania*.

O fato da intensidade do sinal de RPE se manter estável em concentrações acima de $1,5 \times 10^9$ MT/célula, enquanto que o teor de proteína no sobrenadante aumentou ainda mais, pode ter como causa a redução do nitróxido devido o contato com o conteúdo citoplasmático após a lise celular.

5.6 Medidas de Citotoxicidade da Miltefosina em *Leishmania*

Para examinar como as mudanças na dinâmica da membrana estão relacionadas com os efeitos de toxicidade da MT sobre as promastigotas *L. amazonensis* nos ensaios

in vitro, realizamos ensaios com as mesmas condições experimentais utilizadas nos experimentos de RPE e logo em seguida (menos de 5 minutos) contamos as células vivas e mortas para as amostras com diferentes concentrações de MT. Para as células tratadas em PBS, tal como nas experiências de RPE, aproximadamente 70% de morte celular foi observado na concentração de MT que produz alterações na membrana detectadas pela espectroscopia de RPE. A Figura 5.15 mostra a viabilidade celular em função da concentração de MT.

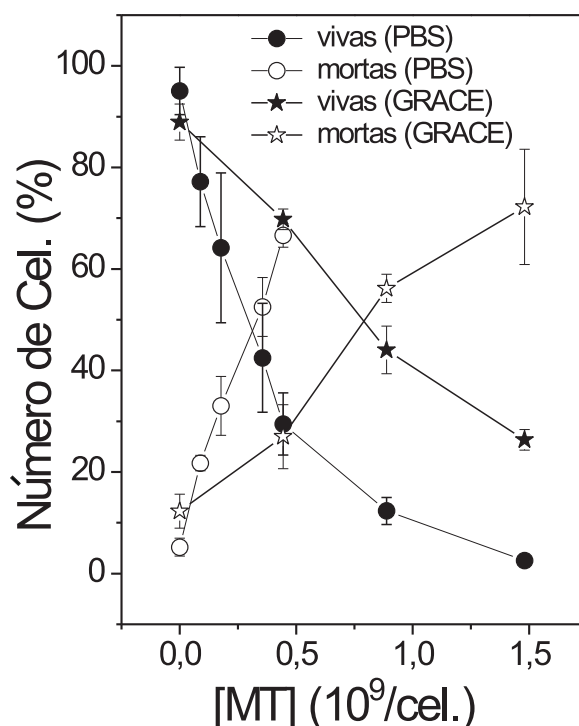


Figura 5.15: Contagem de células nas amostras de *Leishmania* em função da concentração de MT utilizada no tratamento. Células vivas e mortas foram contadas através do método de exclusão do azul de tripan, 1 a 5 minutos após o tratamento das *L. amazonensis* promastigotas em PBS ou meio de cultura.

Os experimentos também foram realizados com as células em meio de cultura suplementado com 10% de FCS. Neste caso, para atingir 50% de morte celular foi necessária uma concentração de MT mais do que duas vezes a concentração necessária em PBS, o que indica que uma fração considerável de MT permanece ligada na albumina

presente no FCS (Figura 5.15). Contagens de células registradas para vários períodos de incubação, a 26 °C (Figura 5.16) demonstram que imediatamente após o tratamento com MT, uma fração significativa das células foram mortas, mas o processo de morte celular e o crescimento continuou, especialmente nas primeiras 4 h de incubação.

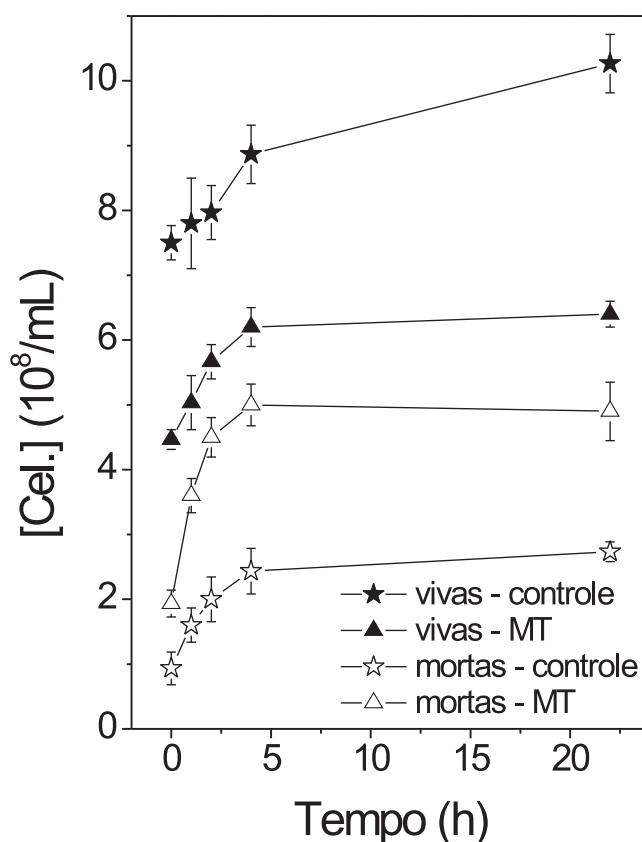


Figura 5.16: Números de células vivas e mortas em amostras de *Leishmania* não tratadas e tratadas com MT ($0,44 \times 10^9$ MT/célula) em meio de cultura para vários períodos de incubação a 26 °C.

A viabilidade das células foi também medida usando o ensaio de clivagem de MTT, onde a atividade celular foi quantificada pela redução do MTT (somente as células vivas reduzem o MTT). Um dos gráficos obtidos para a viabilidade celular como função da concentração de MT está apresentado na Figura 5.17. Do ajuste da curva sigmoidal (Origin 8.0) foi estimada a concentração de MT que inibe 50% do crescimento dos parasitos IC_{50} .

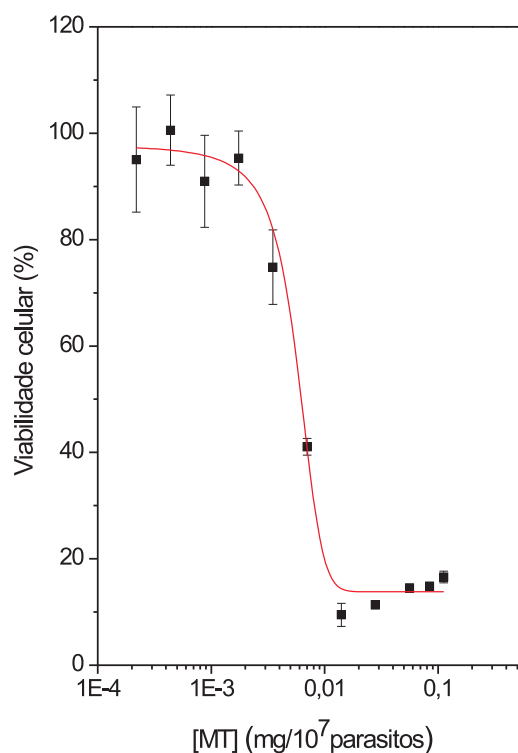


Figura 5.17: Viabilidade das *Leishmanias* em função da concentração de MT pelo método de MTT.

O teste foi repetido para várias concentrações de células e também realizado com 20% de FCS ao invés de 10% e períodos de incubação de 5 minutos, 1 h e 24 h (antes da adição de MTT). De acordo com nosso protocolo experimental, o fármaco foi normalmente dissolvido no meio de cultura e aplicado a um número variável de parasitas ($2 - 10 \times 10^7$ /mL) durante um período de 24 h e logo após o MTT foi adicionado. Os primeiros três experimentos usando concentrações diferentes de parasitas mostraram que os valores de IC_{50} expressos em concentração molar aumentaram com o aumento da concentração de parasitos usada no ensaio. Em um trabalho recente de nosso laboratório [104] foi mostrado que este efeito é causado por um erro no cálculo do IC_{50} que ocorre para a atividade de moléculas hidrofóbicas como é o caso da MT. Para baixas concentrações de parasitos, tais como 10^6 células/mL, este erro fica diminuído e o valor de IC_{50} tende para o verdadeiro. Os dados estão apresentados na Tabela 5.1.

Tabela 5.1: Atividade *in vitro* de MT contra promastigotas de *L. amazonensis*.

Parasitas/mL	Incubação ^a	IC ₅₀ (μM)	IC ₅₀ (10 ⁹ MT/cel.)
2x10 ⁷	24h	26,4 ± 6,4 (A) ^d	0,79 ± 0,19 (A)
4x10 ⁷	24h	43,4 ± 8,9 (AB)	0,65 ± 0,14 (AB)
1x10 ⁸	24h	59,3 ± 9,2 (B)	0,36 ± 0,06 (BC)
1x10 ⁸ (20%FCS) ^b	24h	126,2 ± 31,6 (C)	0,76 ± 0,19 (A)
1x10 ⁸	1h	143,9 ± 19,4 (C)	0,87 ± 0,12 (AB)
2x10 ⁹ (filme) ^c	5min	-	0,53 ± 0,12 (ABC)

(a) Período de incubação após o tratamento e antes da adição de MTT. (b) 20% de soro fetal bovino foi utilizado no meio de cultura em vez de 10%. (c) Método para rápida incorporação de miltefosina (ver Materiais e Métodos). (d) significância estatística: em cada coluna, os dados que não são indicados com letras maiúsculas em comum são significativamente diferentes com $P < 0,05$.

Para concentrações altas de células, tais como 10⁸ células/mL, a quantidade de MT que vai para a membrana da célula é grande e a distribuição da molécula não pode mais ser considerada homogênea. Assim, na Tabela 5.1 nós também expressamos os valores de IC₅₀ em número de moléculas/célula e, neste caso, foi observado um efeito contrário, isto é, o IC₅₀ diminuiu com o aumento na concentração de parasitos. Conforme o trabalho recente [104], isto ocorre porque o cálculo do IC₅₀ dessa forma expresso só é preciso para altas concentrações de parasito tal como 10⁹ células/mL.

Quando o experimento foi realizado com o mesmo número de células/mL, mas o dobro da concentração de albumina (20% de FCS), os valores de IC₅₀ aumentaram de forma significativa. Reduzindo o tempo de incubação antes da adição do MTT de 24 h para 1h foi observado um aumento no valor de IC₅₀. Este dois experimentos indicam que a MT é inicialmente incorporada na albumina e requer um longo período para atingir a membrana do parasita. Em contraste, quando os tratamentos foram realizados colocando uma elevada concentração de células em um tubo de vidro contendo um filme de MT a

incorporação do fármaco nas células foi rápida, e o efeito foi observado com apenas 5 minutos de incubação.

Capítulo 6

Discussão

A aplicação bem sucedida da espectroscopia de RPE de marcadores de spin para estudar a membrana celular depende da incorporação eficiente do marcador na membrana. Um método que tem se mostrado muito adequado consiste em dissolver o marcador de spin em etanol e formar um filme em um tubo de vidro por evaporação do solvente; quando as células são colocadas sobre o filme e o tubo agitado moderadamente, os monômeros das moléculas marcadas são transferidos para a membrana. A eficiência da incorporação de sonda e uniformidade da distribuição na membrana pode ser monitorada pelos próprios espectros de RPE. Usando este método, os marcadores de spin de lipídios foram incorporados com sucesso em membranas intercelulares do estrato córneo [105, 106], bem como nas membranas celulares de segmentos das pontas de raiz de café [107, 108], protozoários *Trypanosoma cruzi* [109] e de fibroblastos [110]. Devido à incorporação rápida do marcador de spin na membrana celular, é possível obter um sinal RPE estável dentro de 10 minutos após a marcação. Neste trabalho, um procedimento semelhante foi utilizado para obter rápida incorporação da MT em membranas de ghosts e DRMs de eritrócito e membranas de *Leishmania*.

Os espectros de RPE de marcadores de spin lipídicos em membrana celular podem ser compostos por duas componentes espectrais devido à coexistência de duas populações de marcadores de spin em diferentes estados de mobilidade. A componente

mais restrita tem sido associada aos marcadores de spin que circundam as regiões hidrofóbicas das proteínas, ao passo que a componente mais móvel surge a partir dos marcadores de spin localizados no “bulk” da bicamada, longe da proteína [111]. Somente a componente espectral correspondente aos marcadores de spin 5-DSA em contato com as proteínas foi observada no espectro de RPE, indicando que a fração do marcador de spin, que não entra em contato com a proteína é muito pequena. Isto ocorre provavelmente devido ao elevado teor de proteína na membrana de eritrócito (aproximadamente 52% da massa) e de *Leishmania*. Assim, um marcador de spin lipídico pode refletir alterações nas proteínas da membrana celular. Interessante que as membranas de eritrócito e *Leishmania* mostraram uma dinâmica molecular muito semelhança, denotada tanto pelo marcador lipídico 5-DSA quanto pelo de proteína 6-MSL.

Lisofosfolípidios análogos da MT [24–26] e edelfosina [27–31] foram considerados moduladores de rafts. Tem sido proposto que a MT e outros alquilfosfolípidios utilizam rafts para internalização em células cancerígenas para inibir a síntese de fosfatidilcolina, a qual é supostamente suficiente para induzir a apoptose [24]. Nossos resultados indicaram que os efeitos da MT em DRMs foram mais pronunciados do que os observados nas membranas de ghosts de eritrócito. Em vesículas preparadas com os constituintes de rafts lipídicos, os dados demonstraram que a MT poderia substituir a SM sem causar alterações na dinâmica dos lipídios. Este último resultado está de acordo com estudos recentes que demonstram que a MT não altera a fluidez das vesículas de DPPC em concentrações de até 25 mol% [68].

Nossas medidas no sangue total indicaram que nas concentrações sanguíneas de MT, observadas durante o tratamento da leishmaniose [69–71], ocorre uma pequena quantidade de hemólise (2-5%). A concentração de MT necessária para causar uma mudança na fluidez da membrana de eritrócitos (detectável pela espectroscopia de RPE) foi de 600 $\mu\text{g/mL}$, o que causou hemólise de 46%, em ambos os casos utilizando sangue total. Esta menor sensibilidade da espectroscopia de RPE em relação ao potencial hemolítico pode

ser explicada pelo fato de que os marcadores de spin só detectarem alterações de fluidez generalizada na membrana, pelo fato de estarem esparsamente distribuídos por toda a membrana, enquanto que o efeito hemolítico é mais sensível, pois depende de ruptura da membrana, que é uma modificação bem localizada. A razão molar entre os marcadores de spin e os lipídios de membrana utilizadas nas nossas medições por RPE foi de aproximadamente 1:150, assim, para a detecção de uma alteração na fluidez da membrana, o ambiente da maioria dos marcadores de spin precisa mudar, o que requer uma maior concentração de MT. O fato de o efeito hemolítico ter sido observado em concentrações de MT menores do que para a mudança na fluidez, sugere que a MT possui ação bem localizada na membrana. É importante ressaltar que para concentração sanguínea de MT superior a 100 $\mu\text{g/mL}$ a percentagem de hemólise passaria de 10% e, portanto, poderia aumentar consideravelmente os efeitos colaterais da MT durante o tratamento da leishmaniose.

Como demonstrado pelos dados da espectroscopia de RPE de marcadores de spin, a MT induz alterações conformacionais na estrutura da proteína, provocando a desnaturação em concentrações mais elevadas. Em um estudo recente abordando a interação de surfactantes com BSA, empregando a mesma técnica, o marcador de spin 5-MSL ligado covalentemente ao único grupo tiol livre da proteína mostrou que os surfactantes causam uma diminuição no parâmetro $2 A_{\parallel}$ do espectro de RPE e redução da população da componente S , indicando que o surfactante favorece conformações de proteína mais dinâmicas e expostas ao solvente [32]. Entre os modelos que têm surgido para descrever a estrutura dos complexos detergente-proteína resultantes da desnaturação de proteínas, o modelo “colar de pérolas” é o mais amplamente discutido na literatura [71]. Neste modelo, a ligação cooperativa de surfactantes induz a formação de estruturas abertas como colar de pérolas na proteína desdobrada, com agregados similares das micelas envolvendo as cadeias polipeptídicas [71]. Um mecanismo de ação da MT com base no ataque indiscriminado de proteínas ligadas à membrana celular é consistente com a atividade ampla da MT contra fungos patogênicos [114], espécies de *Leishmania* [70], *Trypanosoma cruzi* [115] e

vários tipos de células tumorais [11, 116].

A literatura tem mostrado que a MT no seu valor de IC_{50} foi capaz de induzir a morte celular programada do tipo similar à apoptose em promastigotas (*L.* *donovani*) [32,33] e (*L.* *amazonensis*) [34]. A comparação dos nossos resultados sobre contagem de células com os dados relatados por Verma e colaboradores [33] é relevante neste contexto. Estes autores trataram promastigotas de (*L.* *donovani*) (5×10^6 células/mL) com $25 \mu\text{M}$ de MT (IC_{50}), e nenhum efeito do fármaco foi observado até pelo menos 4 horas após o tratamento. As células tratadas com o fármaco tinham crescido cerca de 50% após 12 horas de tratamento e, em seguida, manteve-se constante até 96 h, enquanto que as células das amostras não tratadas aumentaram 400-500% durante o mesmo período.

Um IC_{50} de $25 \mu\text{M}$ para 5×10^6 células/mL é equivalente a 3×10^9 MT/células, o que é aproximadamente 3,8 vezes superior ao valor IC_{50} encontrado neste estudo para (*L.* *amazonensis*), em meio de cultura. A explicação para a relação superior de MT/célula pode ser associado com o menor número de células/mL usados pelos autores [33], que é comumente utilizado, mas parece ser menos relevante para as condições fisiológicas. No sangue humano, a MT deve ser submetida à partição nas membranas de todas as células presentes no sangue e na albumina, onde existem aproximadamente 5×10^9 eritrócitos/mL. A relação albumina/parasita aumenta com a diluição dos parasitas no meio de cultura, o que poderia resultar num efeito retardado do fármaco aumentando os valores do IC_{50} como observado neste trabalho.

Para promastigotas (*L.* *donovani*), Paris e colaboradores [32] encontraram um IC_{50} de $13,6 \mu\text{M}$, mas como os autores utilizaram uma concentração de 10^6 parasitas/mL, isto é equivalente a um valor de IC_{50} de $8,2 \times 10^9$ MT/célula, que é ainda maior ao IC_{50} obtido por Verma e colaboradores [33]. Além disso, no experimento de fragmentação de DNA, Paris e colaboradores [32] aplicaram $40 \mu\text{M}$ de MT durante 24 h, sendo uma concentração muito maior da utilizada neste trabalho. No presente estudo, um método para a incorporação rápida da MT na membrana de *Leishmania* permitiu que as medições pu-

dessem ser feitas pela espectroscopia de RPE e pela contagem microscópica de parasitas, sem período de incubação. Os dados apresentados na Figura 5.16 mostraram que logo após o tratamento, houve uma queda acentuada no número de parasitas, mas o processo de crescimento e morte celular continuou na presença de MT. Acreditamos que os parasitas que receberam uma concentração mais baixa do fármaco são aqueles que podem ter sofrido morte celular programada do tipo apoptose.

É interessante que tem sido demonstrado que a MT exibe atividade contra *esquistossomo in vitro* induzindo apoptose [117]. Como mostrado por microscopia eletrônica de varredura, a morte destes parasitos foi precedida por danos progressivos na superfície da membrana celular que causaram sua ruptura [117]. Em um estudo recente destacando a *Giardia lamblia* como novo alvo da MT, a microscopia revelou graves alterações morfológicas induzidas pela MT em trofozoítos *Giardia lamblia*, principalmente na membrana da célula [118]. A MT também apresenta atividade *in vitro* contra *Trichomonas vaginalis* [119], isolados clínicos de *Acanthamoeba spp.* [120], *Trypanosoma cruzi* [121] e *Streptococcus pneumoniae* [122], em todos os casos por meio do ataque celular e atividade lítica.

Capítulo 7

Conclusões

A MT não causa alteração na dinâmica lipídica de vesículas formadas com lipídios constituintes dos rafts. Foi mostrado que 20 mol% de esfingomiéline ou 20 mol% de DPPC podem ser substituídos por 20 mol% de MT sem essencial alteração na dinâmica da bicamada.

A espectroscopia de RPE de um marcador lipídico (5-DSA) e de um marcador de proteína (6-MSL) demonstrou que a MT causa grandes aumentos de dinâmica molecular tanto no componente lipídico quanto no proteico de ghosts e DRMs de eritrócito e membrana de promastigotas *Leishmania (L.) amazonensis in vitro*.

Medidas de lise da *Leishmania* indicaram que ela ocorre na mesma faixa de concentração de MT que altera a dinâmica de membrana. Na medida em que a dinâmica de membrana é aumentada mais lise celular é observada.

Experimentos com sangue total indicaram que na concentração sanguínea da MT durante o tratamento da leishmaniose ocorre uma pequena quantidade de hemólise de 2 a 5% e que a alteração de fluidez detectada por RPE só seria detectada para uma concentração de MT que causaria 46% de hemólise, este resultado sendo explicado pela menor sensibilidade do método de marcador de spin.

No caso da *Leishmania*, foi demonstrado que a concentração de MT que provoca uma alteração significativa na membrana do parasito, detectada por RPE, leva a apro-

ximadamente 70% de sua morte.

Ensaio de citotoxicidade em várias concentrações de parasitas indicaram que o IC_{50} da MT aumenta com a concentração de células e que para concentrações mais altas de células os valores de IC_{50} tendem para a concentração de MT que gera um efeito na membrana do parasito.

Um método de incorporação rápida da MT na membrana plasmática da *Leishmania* mostrou que o efeito da MT pode ser observado logo após o tratamento, sugerindo que sua ação primária é sobre a membrana celular.

Os espectros de RPE do marcador de proteína indicaram que na presença da MT as proteínas da membrana plasmática da *Leishmania* assumem conformações mais expandidas e expostas ao solvente, sugerindo que a MT tem uma ação do tipo detergente sobre as proteínas de membrana.

Nossa interpretação é que a MT penetra na membrana através de seu componente lipídico e interage com as cadeias laterais hidrofóbicas na interface lipídio-proteína. Assim, com uma ação do tipo detergente, a MT pode formar estruturas semelhantes a micelas em torno das cadeias polipeptídicas favorecendo conformações mais dinâmicas e expostas ao solvente, podendo levar à ruptura da membrana devido à penetração de grupos hidrofílicos da MT no seu interior, assim causando a morte do parasito.

Um mecanismo de ação da MT baseado no ataque à membrana celular é consistente com o largo espectro de atividade da MT contra fungos patogênicos e protozoários, bem como alguns tipos de células tumorais.

Bibliografía

- [1] Byrne, B., Iwata, S.; (2002) Membrane protein complexes. *Current Opinion in Structural Biology*. 12, 239–243.
- [2] Olliaro P. L., Guerin P. J., Gerstl S., Haaskjold A. A., Rottingen J. A., Sundar S.; (2005) Treatment options for visceral leishmaniasis: a systematic review of clinical studies done in India, 1980-2004. *Lancet Infect Dis*. 5, 763–774.
- [3] Pérez-Victoria F. J., Sánchez-Cañete M. P., Seifert K., Croft S. L., Sundar S., Castanys S., Gamarro F.; (2006) Mechanisms of experimental resistance of *Leishmania* to miltefosine: Implications for clinical use. *Drug Resist Updat*. 9, 26–39.
- [4] Bhattacharya S. K., Sinha P. K., Sundar S., Thakur C. P., Jha T. K., Pandey K., Das V. R., Kumar N., Lal C., Verma N., Singh V. P., Ranjan A., Verma R. B., Anders G., Sindermann H., Ganguly N. K.; (2007) Phase 4 trial of miltefosine for the treatment of indian visceral leishmaniasis. *J Infect Dis*. 196, 591–598.
- [5] Soto J., Arana B. A., Toledo J., Rizzo N., Vega J. C., Diaz A., Luz M., Gutierrez P., Arboleda M., Berman J. D., Junge K., Engel J., Sindermann H.; (2004) Miltefosine for new world cutaneous leishmaniasis. *Clin Infect Dis*. 38, 1266–1272.
- [6] Soto J., Toledo J., Gutierrez P., Nicholls R. S., Padilla J., Engel J., Fischer C., Voss A., Berman J.; (2001) Treatment of american cutaneous leishmaniasis with miltefosine, an oral agent. *Clin Infect Dis*. 33, e57–e61.

- [7] Mohebbali M., Fotouhi A., Hooshmand B., Zarei Z., Akhoundi B., Rahnema A., Razaghian A. R., Kabir M. J., Nadim A.; (2007) Comparison of miltefosine and meglumine antimoniate for the treatment of zoonotic cutaneous leishmaniasis (ZCL) by a randomized clinical trial in Iran. *Acta Trop.* 103, 33–40.
- [8] Soto J., Toledo J., Valda L., Balderrama M., Rea I., Parra R., Ardiles J., Soto P., Gómez A., Molleda F., Fuentelsaz C., Anders G., Sindermann H., Engel J., Berman J.; (2007) Treatment of Bolivian mucosal leishmaniasis with miltefosine. *Clin Infect Dis.* 44, 350–356.
- [9] van Blitterswijk W. J., Verheij M.; (2008) Anticancer alkylphospholipids: mechanisms of action, cellular sensitivity and resistance, and clinical prospects. *Curr Pharm Des* 14(21), 2061–2074.
- [10] Dorlo T. P. C., Balasegaram M., Beijnen J. H., de Vries P. J.; (2012) Miltefosine: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis. *J Antimicrob Chemother* 67, 2576–2597.
- [11] Ruiter G. A., Zerp S. F., Bartelink H., van Blitterswijk W. J., Verheij M.; (2003) Anticancer alkyl-lysophospholipids inhibit the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt/PKB survival pathway. *Anticancer Drugs* 14(2), 167–173.
- [12] Moreira W, Leprohon P, Ouellette M (2011) Tolerance to drug-induced cell death favours the acquisition of multidrug resistance in *Leishmania*. *Cell Death and Dis* 2:e201.
- [13] Ministério da Saúde (2006) Atlas de Leishmaniose Tegumentar Americana (diagnósticos clínico e diferencial), Série A. Normas e Manuais Técnicos.
- [14] Ministério da Saúde (2007) Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. 2ª edição atualizada, Série A. Normas e Manuais Técnicos.

- [15] Lindoso J. A. L.; Instituto de Infectologia Emílio Ribas-SES-SP Laboratório de Soroepidemiologia-LIM38 HC-FMUSP. Disponível em: <http://www.sgc.goias.gov.br/upload/links/arq-450-visceral.pdf>. acessado em 03 de fevereiro de 2014.
- [16] Nishi S., Shraddha A. S., Wahajul H. Suman G.; (2012) Augmentation of antileishmanial efficacy of miltefosine in combination with tuftsia against experimental visceral leishmaniasis. *Parasitol Res* 111, 563–570.
- [17] REY L., *Parasitologia: Parasitos e doenças parasitárias do homem nos trópicos ocidentais*. 4^o ed. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan. (2008).
- [18] Pimenta P. F. P., FREITAS V. C., SECUNDINO A. N. F. C., (2012) A interação do protozoário leishmania com seus insetos vetores. In: *Tópico Avançados em Entomologia Molecular*. INCTEM Cap. 12. Disponível em: <http://www.inctem.bioqmed.ufrj.br/biblioteca/arthrolivro-1>. Acessado em: 15 fevereiro de 2013.
- [19] Castelano L. R. C., Resposta imune anti-leishmania e mecanismos de evasão. *VITAE Academia Biomédica Digital*, v. 12, nº 25, (2005).
- [20] Neves D. P., *Parasitologia humana*. 11^o ed. São Paulo, SP: Atheneu, (2005).
- [21] Weingartner A., (2011) The plasma membrane lipid asymmetry of leishmania donovani and its relevance for phagocytosis.
- [22] WHO (2007) Control of leishmaniasis. Report by the Secretariat, A60/10. The Sixtieth World Health Assembly. Geneva.
- [23] Brasil. Ministério da saúde. disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/2012-11-casos-de-lv-entre-1990-e-2011-final.pdf>. acessado em: 24 janeiro de 2013.

- [24] van der Luit A. H., Vink S. R., Klarenbeek J. B., Perrissoud D., Solary E., Verheij M., van Blitterswijk W. J.; (2007) A new class of anticancer alkylphospholipids uses lipid rafts as membrane gateways to induce apoptosis in lymphoma cells. *Mol Cancer Ther* 6, 2337–2345.
- [25] Weller K., Artuc M., Jennings G., Friedrichson T., Guhl S., dos Santos R. V., Sunder C., Zuberbier T., Maurer M.; (2008) Miltefosine inhibits human mast cell activation and mediator release both in vitro and in vivo. *J Invest Dermatol.* 129(2), 496–498.
- [26] Bäumer W., Wláz P., Jennings G., Rundfeldt C.; (2010) The putative lipid raft modulator miltefosine displays immunomodulatory action in T-cell dependent dermal inflammation models. *Eur J Pharmacol* 628(1?3), 226–232.
- [27] Gajate C., Mollinedo F.; (2001) The antitumor ether lipid ET-18-OCH(3) induces apoptosis through translocation and capping of Fas/CD95 into membrane rafts in human leukemic cells. *Blood* 98,3860–3863.
- [28] Gajate C., Del Canto-Jañez E., Acuña A. U., Amat-Guerri F., Geijo E., Santos-Beneit A. M., Veldman R. J., Mollinedo F.; (2004) Intracellular triggering of Fas aggregation and recruitment of apoptotic molecules into Fas-enriched rafts in selective tumor cell apoptosis. *J Exp Med* 200, 353–365.
- [29] Gajate C., Mollinedo F.; (2007) Edelfosine and perifosine induce selective apoptosis in multiple myeloma by recruitment of death receptors and downstream signaling molecules into lipid rafts. *Blood* 109, 711–719.
- [30] Ausili A., Torrecillas A., Aranda F. J., Mollinedo F., Gajate C., Corbalán-García S., de Godos A., Gómez-Fernández J. C.; (2008) Edelfosine is incorporated into rafts and alters their organization. *J Phys Chem B* 112, 11643–11654.

- [31] Mollinedo F., de la Iglesia-Vicente J., Gajate C., Estella-Hermoso de Mendoza A., Villa-Pulgarin J. A., Campanero M. A., Blanco-Prieto M. J.; (2010) Lipid raft-targeted therapy in multiple myeloma. *Oncogene* 29, 3748–3757.
- [32] Paris C., Loiseau P. M., Bories C., Bréard J.; (2004) Miltefosine induces apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. *Antimicrob Agents Chemother* 48, 852–859.
- [33] Verma N. K., Singh G., Dey C. S.; (2007) Miltefosine induces apoptosis in arsenite-resistant *Leishmania donovani* promastigotes through mitochondrial dysfunction. *Exp Parasitol*. 116, 1–13.
- [34] Marinho F. A., Gonçalves K. C., Oliveira S. S., Oliveira A. C., Bellio M., d'Avila-Levy C. M., Santos A. L., Branquinha M. H.; (2011) Miltefosine induces programmed cell death in *Leishmania amazonensis* promastigotes. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 106, 507–509.
- [35] Varela-M R. E., Villa-Pulgarin J. A., Yepes E., Müller I., Modolell M., Muñoz D. L., Robledo S. M., Muskus C. E., López-Abán J., Muro A., Vélez I. D., Mollinedo F.; (2012) In vitro and in vivo efficacy of ether lipid edelfosine against *Leishmania* spp. and Sb-resistant parasites. *PLoS Negl Trop Dis*. 6, e1612.
- [36] Bolsover, Stephen R., Hyams, Jeremy S. Shephard, Elizabeth A., White, Hugh A., Wiedemann, Claudia G.; (2004) *Cell Biology* Hoboken, New Jersey: John Wiley Sons, 531–582.
- [37] Munro S., (2003) Lipid Rafts: Elusive or Illusive?. *Cell*. 115, 377–388.
- [38] van Meer G.; (1989) Lipid traffic in animal cells. *Annual Review of Cell Biology*. 5, 247–275.
- [39] Calbreath D. F., (1991) Ciulla, A. P. *Clinical chemistry*. 2^o ed. Philadelphia: Saunders, 468.

- [40] Nelson D. L., Cox M. M.; (2011) *Princípios de bioquímica de Lehninger*. 5^o ed. São Paulo-SP. Sarvier, p357. ISBN 978-0-716-77108-1.
- [41] Nelson D. L., Cox M. M.; (2011) *Princípios de bioquímica de Lehninger*. 5^o ed. São Paulo-SP. Sarvier, p360. ISBN 978-0-716-77108-1.
- [42] Bruce A., et al.; (2010) *Biologia Molecular da Célula*. 5^o ed. Porto Alegre-RS. Artmed, 617–228. ISBN 9788536320663.
- [43] Istaelaschvili J. N.; (1991) *Intermolecular and surface forces*. 2^o ed. San Diego: Academic Press.
- [44] Wikipédia. A enciclopédia livre. Disponível em: library.kiwix.org/wikipedia-pt-all-12-2012/A/Lípideos.html. Acessado em 06/02/2014.
- [45] Bruni A., Toffano G., Leon A., Boarato E.; (1976) Pharmacological effects of phosphatidylserine liposomes. *Nature* 260, 331–333.
- [46] Aguirre R., MAY J. M.; (2008) Inflammation in the vascular bed: Importance of vitamin c. *Pharmacology and Therapeutics*. 119, 96–103.
- [47] Cevc G., Marsh D.; (1978) Phospholipid bilayers: Physical principles and models. In: Bittar E. E. (Ed.) *Cell Biology: a series of monographs*. New York-NY: John Wiley and Sons 5, 2–26.
- [48] Nelson D. L., Cox M. M.; (2000) *Princípios de bioquímica de Lehninger*. 2^o ed. São Paulo-SP. Sarvier, 259–266. ISBN 8573780266.
- [49] Marzzoco A., Torres B. B.; (2007) *Bioquímica básica*. 3^a ed. Rio de Janeiro-RJ. Guanabara Koogan, 11–36. ISBN 8527712849.
- [50] Schramm L. L., Stasiuk E. N., Marangoni D. G.; (2003) Surfactants and their applications. *Annu. Rep. Prog. Chem.* 99, 3–48.

- [51] Turro N. J., Lei X. G., Ananthapadmanabhan K. P., Aronson M.; (1995) Spectroscopic Probe Analysis of Protein-Surfactant - Interactions: The BSA/SDS System. *Langmuir*. 11, 2525–2533.
- [52] Gorter E., Grendel F.; (1925) On Bimolecular Layers of Lipoids on the Chromocytes of the Blood. *J. Exp. Med.* 41, 439–443.
- [53] Danielli J. F., Davson J.; (1935) A contribution to the theory of permeability of thin films. *J. Cell Comp. Physiol.* 5, 495–508.
- [54] Keenan T. W., Morre D. J.; (1970) Phospholipid class and fatty acid composition of golgi apparatus isolated from rat liver and comparison with other cell fractions. *Biochemistry*. 9, 19–25.
- [55] Yorek, M. A. (1993) Biological distribution, in *Phospholipids Handbook*, (edited by Gregor Cevc) Marcel Dekker, Inc. New York, 745–775.
- [56] van Helvoort A., van Meer G.; (1995) Intracellular lipid heterogeneity caused by topology of synthesis and specificity in transport. Examples: sphingolipids. *FEBS Lett.* 369, 18–21.
- [57] Simons K., Ikonen E.; (1997) Functional rafts in cell membranes. *Nature*. 387, 569–572.
- [58] Janes P. W., Ley S. C., Magee A. I.; (1999) Aggregation of lipid rafts accompanies signaling via the T cell antigen receptor. *J. Cell Biol.* 147, 447–461.
- [59] Simons K., Toomre D.; (2000) Lipid rafts and signal transduction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1, 31–39.
- [60] Lang T., Bruns D., Wenzel D., et al.; (2001) Snares are concentrated in cholesterol-dependent clusters that define docking and fusion sites for exocytosis. *EMBO J.* 20, 2202–2213.

- [61] Caroni P.; (2001) New EMBO member's review: actin cytoskeleton regulation through modulation of PI(4,5)P(2) rafts. *EMBO J.* 20, 4332–4336.
- [62] Campbell S. M., Crowe S. M., Mak J.; (2001) Lipid rafts and HIV-1: from viral entry to assembly of progeny virions. *J. Clin. Virol.* 22, 217–227.
- [63] Ehehalt R., Keller P., Haass C., Thiele C., Simons K.; (2003) Amyloidogenic processing of the Alzheimer beta-amyloid precursor protein depends on lipid rafts. *J. Cell Biol.* 160, 113–123.
- [64] Simons K., Vaz W. L. C.; (2004) Model Systems, Lipid Rafts, and Cell Membranes. *Biophys. Biomol. Struct.* 33, 269–295.
- [65] Simons K., Ikonem, E.; (2000) How Cells Handle Cholesterol. *Science.* 290, 1721–1726.
- [66] Sood, R., Kinnunen, P.; (2008) Cholesterol, lanosterol, and ergosterol attenuate the membrane association of LL-37(W27F) and temporin. L. *Biochim. Biophys. Acta.* 1778, 1460–1466.
- [67] Sergent O., Djoudi-Aliche F., Lagadic-Gossmann D.; (2012) Up-to-Date insight about membrane remodeling as a mechanism of action for ethanol-induced liver toxicity. *Clinical and Scientific Aspects.* Ed InTech. 159–178. ISBN 9789533079851.
- [68] Alonso L., Mendanha S. A., Marquezín C. A., Berardi M., Ito A. S., Acuña A. U., Alonso A.; (2012) Interaction of miltefosine with intercellular membranes of stratum corneum and biomimetic lipid vesicles. *Int J Pharm.* 434, 391–398.
- [69] Dorlo T. P., Huitema A. D., Beijnen J. H., de Vries P. J.; (2012) Optimal dosing of miltefosine in children and adults with visceral leishmaniasis. *Antimicrob Agents Chemother.* 56, 3864–3872.

- [70] Dorlo T. P., Balasegaram M., Lima M. A., de Vries P. J., Beijnen J. H., Huitema A. D.; (2012) Translational pharmacokinetic modelling and simulation for the assessment of duration of contraceptive use after treatment with miltefosine. *J Antimicrob Chemother.* 67, 1996–2004.
- [71] Dorlo T. P., van Thiel P. P., Huitema A. D., Keizer R. J., de Vries H. J., Beijnen J. H., de Vries P. J.; (2008) Pharmacokinetics of miltefosine in Old World cutaneous leishmaniasis patients. *Antimicrob Agents Chemother.* 52, 2855–2860.
- [72] Hagen W. R.; (2009) *Biomolecular epr spectroscopy*. New York, USA: CRC press.
- [73] Weil J. A., Bolton J. R., Wertz J. E.; (1994) *Electron paramagnetic resonance: Elementary theory and practical applications*. New York, U.S.A. Wiley Interscience.
- [74] Poole C. P. J.; (1994) *Electron spin resonance: A comprehensive treatise on experimental techniques*. 2^o ed. New York, U.S.A. Wiley Interscience.
- [75] Brustolon M. G. E.; (2009) *Electron Paramagnetic Resonance A Practitioner's Toolkit*, New Jersey, 16–17.
- [76] Perussi J. R, Ruggiero A, C. T. M.; (1985) O método de marcadores de spin aplicados a bioquímica. *Química Nova.* 313-324.
- [77] Peter A., de PAULA J.; (2011) *Atkins Físico - Química*. 8^o ed., V. 1, LTC Editora, Rio de Janeiro. 500–503.
- [78] Pake, G. E.; Estle, T. L. (1973) *The Physical Principles of Electron: Paramagnetic Resonance*. 2^a ed., VLondon, Advanced Book Program. 10–63.
- [79] Swartz H. M., Bolton J. R., Borgcullity D. C.; (1972) *Biological Applications of Electron Spin Resonance*. United States of America: John Wile and Sons.
- [80] Peter A., de PAULA J.; (2011) *Atkins Físico - Química*. 8^o ed., V. 1, LTC Editora, Rio de Janeiro. p480.

- [81] Peter A., de PAULA J.; (2011) Atkins Físico - Química. 8^o ed., V. 1, LTC Editora, Rio de Janeiro. 499–500.
- [82] Lacaz-Vieira F., Malnic G.; (1981) Biofísica. Ed. Guanabara Koogan S.A. Rio de Janeiro. 64–85.
- [83] Budil D. E., Lee S., Saxena S., Freed J. H.; (1996) Nonlinear-least-squares analysis of slow-motion epr spectra in one and two dimensions using a modified levenberg-marquardt algorithm. J. of Magnetic Resonance, v. 120, p. 155–189.
- [84] Salmon C. E. G., Neto D. S., Tabak M., Filho A. J. C.; (2007) Simulação de espectros de ressonância paramagnética eletrônica (RPE) através do programa NLSL. Química Nova. 30, 124–1248.
- [85] Jackson J. D.; (1975) Classical Electrodynamics. 2^o ed. New York, U.S.A. John Wiley and Sons. 75–77.
- [86] Beutler E., West C., Blume K. G.; (1976) Removal of Leukocytes and Platelets From Whole-Blood. Jornal of Laboratory and Clinical Medicine. 88, 328–333.
- [87] Dodge J. T., Mitchell C., Hanahan D. J.; (1962) The Preparation and Chemical Characteristics of Hemoglobin-Free Ghosts of Human Erythrocytes. University of Washington. 14, 119–130.
- [88] Domingues C. C., Ciana A., Buttafava A., Balduini C., de Paula E., Minetti G.; (2009) Resistance of Human Erythrocyte Membranes to Triton X-100 and $C_{12}E_8$. J Membrane Biol. 227, 39–48.
- [89] Smith P. K., Krohn R. I., Hermanson G. T., Mallia A. K., Gartner F. H., Provenzano M. D., Fujimoto E. K., Goeke N. M., OLson B. J., Klenk D. C.; (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. Analytical Biochemistry. 150, 76–85.

- [90] Rhoderick E. B., Kari L. J. K. J. H.; (1989) Protein Measurement Using Bicinchoninic Acid: Elimination of Interfering Substances. *Analytical Biochemistry*. 180, 136–13
- [91] Budil D. E., Lee S., Saxena S., Freed J. H.; (1996) Nonlinear-Least-Squares Analysis of Slow-Motion EPR Spectra in One and Two Dimensions Using a Modified Levenberg–Marquardt Algorithm. *J Magn Reson* 120(2), 155–189.
- [92] Alonso A., Gonçalves dos Santos J., Tabak M.; (2000) Stratum corneum protein mobility as evaluated by a spin label maleimide derivative. *Biochim Biophys Acta*. 1478, 89–101.
- [93] Alonso A., dos Santos W. P., Leonor S. J., dos Santos J. G., Tabak M.; (2001) Stratum Corneum Protein Dynamics as Evaluated by a Spin-Label Maleimide Derivative: Effect of Urea. *Biophys J* 81(6), 3566–3576.
- [94] Alonso A., Vasques da Silva J., Tabak M.; (2003) Hydration effects on the protein dynamics in stratum corneum as evaluated by EPR spectroscopy. *Biochim Biophys Acta* 1646, 32–41.
- [95] Gonçalves do Couto S., de Souza O. M., Alonso A.; (2005) Dynamics of proteins and lipids in the stratum corneum: Effects of percutaneous permeation enhancers. *Biophys Chem*. 116, 23–31.
- [96] Anjos J. L. V., Santiago P. S., Tabak M., Alonso A.; (2011) On the interaction of bovine serum albumin with ionic surfactants: Temperature induced EPR changes of a maleimide nitroxide reflect local protein dynamics and probe solvent accessibility. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 88, 463–470.
- [97] McCoy J., Hubbell W. L.; (2011) High-pressure EPR reveals conformational equilibria and volumetric properties of spin-labeled proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 108(4), 1331–1336.

- [98] Goñi F. M., Alonso A., Bagatolli L. A., Brown R. E., Marsh D., Prieto M., Thewalt J. L.; (2008) Phase diagrams of lipid mixtures relevant to the study of membrane rafts. *Biochim Biophys Acta* 1781, 665–684.
- [99] McQuaw C. M., Zheng L., Ewing A. G., Winograd N.; (2007) Localization of sphingomyelin in cholesterol domains by imaging mass spectrometry. *Langmuir* 23, 5645–5650.
- [100] Veatch S. L., Keller S. L.; (2005) Miscibility phase diagrams of giant vesicles containing sphingomyelin. *Phys Rev Lett* 94, 148101.
- [101] Alonso A., Meirelles N. C.; (1995) Effect of hydration upon the fluidity of intercellular membranes of stratum corneum: an EPR study. *Biochim Biophys Acta*. 1237, 6–15
- [102] Crepaldi D. C., Ciana A., Buttafava A., Balduini C., de Paula E., Minetti G.; (2009) Resistance of human erythrocyte membranes to Triton X-100 and C12E8. *J Membr Biol* 227, 39–48.
- [103] Tabak M., Alonso A., Nascimento O. R.; (1983) Single crystal ESR studies of a nitroxide spin label. I. Determination of the G and A tensors. *J Chem Phys* 79(3), 1176–1184.
- [104] Camargos S. H.; Estudos de membranas modelo e efeitos de terpenos em membranas de *Leishmania* por ressonância paramagnética eletrônica. 2013. 169f. Tese (Doutorado em Física)– Instituto de Física, Universidade Federal de Goiás, Goiás. 2013.
- [105] de Queirós W. P., de Sousa N. D., Alonso A.; (2005) Dynamics and partitioning of spin-labeled stearates into the lipid domain of stratum corneum. *J Control Release*. 106, 374–385.

- [106] dos Anjos J. L. V., Neto D. dS., Alonso A.; (2007) Effects of ethanol/l-menthol on the dynamics and partitioning of spin-labeled lipids in the stratum corneum. *Eur J Pharm Biopharm.* 67, 406–412.
- [107] Alonso A., Queiroz C. S., Magalhães A. C.; (1997) Chilling stress leads to increased cell membrane rigidity in roots of coffee (*Coffea arabica L.*) seedlings. *Biochim Biophys Acta.* 1323, 75–84.
- [108] Queiroz C. G. S., Alonso A., Mares-Guia M., Magalhães A. C.; (1998) Chilling-induced changes in membrane fluidity and antioxidant enzyme activities in *Coffea arabica L.* roots. *Biol Plantarum* 41, 403–413.
- [109] Desoti V. C., Lazarin-Bidóia D., Sudatti D. B., Pereira R. C., Alonso A., Ueda-Nakamura T., Dias Filho B. P., Nakamura C. V., de Oliveira S. S.; (2012) Trypanocidal action of (–)-elatol involves an oxidative stress triggered by mitochondria dysfunction. *Mar Drugs.* 10, 1631–1646.
- [110] Mendanha S. A., Moura S. S., Anjos J. L. V., Valadares M. C., Alonso A.; (2013) Toxicity of terpenes on fibroblast cells compared to their hemolytic potential and increase in erythrocyte membrane fluidity. *Toxicol In Vitro.* 27, 323–329
- [111] Jost P. C., Griffith O. H., Capaldi R. A., Vanderkooi G.; (1973) Evidence for boundary lipid in membranes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 70, 480–384.
- [112] Sánchez-Cañete M. P., Carvalho L., Pérez-Victoria F. J., Gamarro F., Castanys S.; (2009) Low plasma membrane expression of the miltefosine transport complex renders *Leishmania braziliensis* refractory to the drug. *Antimicrob Agents Chemother* 53, 1305–1313.
- [113] Samuel B. U., Mohandas N., Harrison T., McManus H., Rosse W., Reid M., Haldar K.; (2001) The role of cholesterol and glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins of

- erythrocyte rafts in regulating raft protein content and malarial infection. *J Biol Chem.* 276, 29319–29329.
- [114] Widmer F., Wright L. C., Obando D., Handke R., Ganendren R., Ellis D. H., Sorrell T. C.; (2006) Hexadecylphosphocholine (miltefosine) has broad-spectrum fungicidal activity and is efficacious in a mouse model of cryptococcosis. *Antimicrob Agents Chemother.* 50(2), 414–421.
- [115] Croft S. L., Seifert K., Duchêne M.; (2003) Antiprotozoal activities of phospholipid analogues. *Mol Biochem Parasitol.* 126, 165–172.
- [116] van Blitterswijk W. J., Verheij M.; (2008) Anticancer alkylphospholipids: mechanisms of action, cellular sensitivity and resistance, and clinical prospects. *Curr Pharm Des.* 14(21), 2061–2074.
- [117] Bertão H. G., Silva R. A. R., Padilha R. J. R., de Azevedo Albuquerque M. C. P., Rádiz-Baptista G.; (2012) Ultrastructural analysis of miltefosine-induced surface membrane damage in adult *Schistosoma mansoni* BH strain worms. *Parasitol Res.* 110(6), 2465–2473.
- [118] Eissa M., Amer E.; (2012) *Giardia lamblia*: a new target for miltefosine. *Int J Parasitol.* 42, 443–452.
- [119] Blaha C., Duchêne M., Aspöck H., Walochnik J. (2006) In vitro activity of hexadecylphosphocholine (miltefosine) against metronidazole-resistant and-susceptible strains of *Trichomonas vaginalis*. *J Antimicrob Chemother.* 57(2), 273–278.
- [120] Seifert K., et al. (2001) Effects of miltefosine and other alkylphosphocholines on human intestinal parasite *Entamoeba histolytica*. *Antimicrob Agents Chemother.* 45(5), 1505–1510.

- [121] Santa-Rita R. M., Santos Barbosa H., Meirelles M. dN. S. L., de Castro S. L.; (2000) Effect of the alkyl-lysophospholipids on the proliferation and differentiation of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop.* 75(2), 219–228.
- [122] Llull D., Rivas L., García E.; (2007) In vitro bactericidal activity of the antiprotozoal drug miltefosine against *Streptococcus pneumoniae* and other pathogenic streptococci. *Antimicrob Agents Chemother.* 51(5), 1844–1848.

Apêndice A

Publicação J. Pharm Sci.

Pharmacokinetics, Pharmacodynamics and Drug Transport and Metabolism

Interaction of Miltefosine with the Lipid and Protein Components of the Erythrocyte Membrane

RODRIGO ALVES MOREIRA, SEBASTIÃO ANTONIO MENDANHA, DAIANE HANSEN, ANTONIO ALONSO

Instituto de Física, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, Brazil

Received 18 December 2012; revised 11 February 2013; accepted 12 February 2013

Published online 1 March 2013 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com). DOI 10.1002/jps.23496

ABSTRACT: Miltefosine (MT) is an alkylphospholipid that has been approved for the treatment of breast cancer metastasis and visceral leishmaniasis, although its mechanism of action remains poorly understood. Electron paramagnetic resonance spectroscopy of a spin-labeled lipid and a thiol-specific spin label showed that MT causes an increase in the molecular dynamics of erythrocyte ghost membranes and detergent-resistant membranes (DRMs) prepared from erythrocyte ghosts. In the vesicles of lipid raft constituents, it was shown that 20 mol % sphingomyelin could be replaced by 20 mol % MT with no change in the molecular dynamics. The effect of MT in DRMs was more pronounced than in erythrocyte ghosts, supporting the hypothesis that MT is a lipid raft modulator. At the reported MT-plasma concentrations found during the treatment of leishmaniasis (31–90 $\mu\text{g/mL}$), our measurements in the blood plasma indicated a hemolytic level of 2%–5%. The experiments indicated that MT acts predominantly on the protein component of the membrane. MT aggregates may wrap around the hydrophobic polypeptide chains, forming micelle-like structures that stabilize protein conformations more exposed to the solvent. Proteins with higher hydrophobicity may induce the penetration of the hydrophilic groups of MT into the membrane and cause it to rupture. © 2013 Wiley Periodicals, Inc. and the American Pharmacists Association *J Pharm Sci* 102:1661–1669, 2013

Keywords: miltefosine; EPR; spin label; erythrocyte membrane; raft; drug interactions; pharmacokinetics; Lipids; Proteins; Nanotechnology

Apêndice B

Publicação Antimicrob. Agents Chemother.

AAC Accepts, published online ahead of print on 10 March 2014
Antimicrob. Agents Chemother. doi:10.1128/AAC.01332-13
Copyright © 2014, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

1 Miltefosine increases lipid and protein dynamics in *Leishmania* membranes at
2 similar concentrations to those needed for cytotoxicity activity

3

4 Rodrigo Alves Moreira,¹ Sebastião Antonio Mendanha,¹ Kelly Souza Fernandes,¹
5 Grazielle Guimaraes Matos,² Lais Alonso,¹ Miriam Leandro Dorta² and Antonio
6 Alonso^{1*}

7

8 ¹*Instituto de Física, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, Brazil*

9 ²*Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Departamento de Imunologia e*
10 *Patologia Geral, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, Brazil*