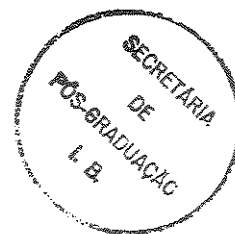


Alexandre de Aquino Soares



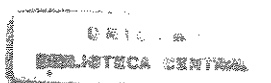
FORMAÇÃO DE DOMÍNIOS LIPÍDICOS EM MEMBRANAS MODELO: EFEITO DA DIBUCAÍNA

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato(a)
<i>Alexandre de Aquino Soares</i>
e aprovada pela Comissão Julgadora.
<i>[Signature]</i>

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Biologia Funcional e Molecular na área de Bioquímica.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Eneida de Paula

2001



UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	T/ UNICAMP
	So11f
V.	Ex
TOMBO BC	46477
PROC.	16-392/01
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	15/09/01
N.º CPD	

ii

CM00159809-9

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

So11f

Soares, Alexandre de Aquino

Formação de domínios lipídicos em membranas
modelo: efeito da dibucaína/Alexandre de Aquino Soares.
–Campinas, SP:[s.n.],2001.
158f.:ilus

Orientadora: Eneida de Paula
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
Campinas. Instituto de Biologia.

1.Lipídios. 2. Anestésico. 3. Membrana (Biologia).
I.Paula, Eneida de. II. Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia. III. Título.

Local e data: Campinas, 13 de julho de 2001.

iii

Banca examinadora:

Prof^a. Dra. Eneida de Paula (Orientadora)



Prof. Dr. Eduardo Galembeck



Prof. Dr. Hidetake Imasato



Prof^a. Dra. Nilce Correa Meirelles

“Show me
your ways,
O Lord;
teach me your paths;
guide me
in your truth...”

Psalm 25:4-5

Agradecimentos

À Eneida pelo seu carinho, orientação e paciência.

À FAPESP por seu incentivo, apoio financeiro e científico.

À UNICAMP pela estrutura que possibilitou minha formação acadêmica.

A meus pais Carlos e Anisete, meu irmão Leandro e meu avô Josias por todo o suporte e atenção.

À Nilce por sua cordialidade e interesse contínuo em meu desenvolvimento.

Aos colegas do laboratório Sônia, Leonardo, Mariza, Eduardo, Daniela, Alessandro, Luciana, Paulo, Rafael, Nonô, Danielle, Bispo, Ieso, Roberta por proporcionarem um bom tempo.

To Dr. Michael Glaser for his hostage and support. Thank you Chan (coffee and helium...), Lornie (Merry Christmas!), Steve, John, Barbora, Vincent for your friendship.

To Drew and Andy for their friendship and kindness for providing me a home and a family. Thank you IVCF for your spiritual and emotional shelter.

À Profª Drª Shirley Schreier e seu laboratório por sua colaboração e disponibilização de material e EPR. Obrigado Lua pelos galhos e troncos quebrados.

Ao Rogério Mugnaini, ao Leopoldo Bulgarelli e ao Prof. Aluísio Pinheiro pela observação e conselhos na análise estatística dos dados de microscopia de fluorescência.

Ao Prof. Dr. Benedito C. Vidal pelo ensino dos rudimentos de microscopia e por disponibilizar o refratômetro.

Ao Nelson M. Salazar por sua atenção sem igual para ensinar e discutir, e à ajuda na leitura dos artigos de simulação de EPR.

À Profª Drª Iris Torriani e Guinter Kellerman pela disponibilização e assistência no uso da linha de SAXS e no tratamento dos dados.

Aos Prof. Mauricio U. Kleinke e Omar Teshke pelo uso do AFM, sugestões e experiência.

À Secretaria do departamento Andréia, Marina, Miriam por todas as soluções.

Aos Profs. Ana Célia Ruggiero, Carlos Bonafé e Francisco B. T. Pessine pelas sugestões e por terem participado do exame de qualificação desta Tese.

Aos Profs. Hidetake Imasato e Eduardo Galembeck pela leitura cuidadosa e por participarem da banca examinadora desta Tese

Índice

Agradecimentos.....	v
Índice.....	vi
Abreviaturas.....	viii
Lista de Figuras.....	x
Lista de Tabelas.....	xii
Lista de Equações.....	xiii
Resumo.....	xiv
Summary.....	xvi
Introdução.....	1
MEMBRANAS	1
DOMÍNIOS LIPÍDICOS.....	2
ANESTÉSICOS LOCAIS E MECANISMO DE ANESTESIA	5
AÇÃO DOS ANESTÉSICOS LOCAIS NA PROTEÍNA CANAL DE SÓDIO	7
DIBUCAÍNA	10
ANESTÉSICOS LOCAIS E DOMÍNIOS LIPÍDICOS.....	13
RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA.....	14
<i>Efeito da orientação molecular no espectro de RPE (parâmetro de ordem)</i>	17
<i>Monitoramento de formação de domínios por RPE</i>	19
MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA	21
Objetivos.....	22
Materiais e Métodos.....	23
LIPÍDIOS.....	23
SOLUÇÕES	25
DOSAGEM DE LIPÍDIOS	26
PREPARO DE MEMBRANAS	27
MARCAÇÃO DE ERITRÓCITOS.....	30
MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA E PROCESSAMENTO DE IMAGENS	31
PREPARO DE LÂMINAS	33
MEDIDAS DE ESPECTROFOTOMETRIA.....	34
MEDIDAS DE FLUORESCÊNCIA.....	34
MEDIDAS FLUORIMÉTRICAS DA DBC EM DIFERENTES CONSTANTES DIELÉTRICAS	35
MEDIDAS DE RPE	36
PROCESSAMENTO DOS ESPECTROS	38
TRATAMENTO DOS DADOS DE FLUORESCÊNCIA.....	40

INTERCONVERSÃO DE VALORES DE CONSTATANTE DE LIGAÇÃO E DE PARTIÇÃO	41
Resultados e Discussão.....	59
ESPECTROFOTOMETRIA.....	43
FLUORESCÊNCIA.....	45
<i>Fluorescência em tampão</i>	45
<i>Determinação do pK_a</i>	50
<i>Supressão da fluorescência da Dibucaína</i>	51
<i>Fluorescência em membranas</i>	55
<i>Ajustes de log-normal a espectros</i>	70
<i>Fluorescência da DBC em dioxano</i>	72
<i>Correção de turbidez de suspensões de membranas</i>	78
<i>Domínios lipídicos observados por fluorescência</i>	86
RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA.....	88
MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA	104
<i>Vesículas marcadas com NBD-DOPA</i>	107
<i>Ghosts marcados com NBD-DOPA</i>	111
<i>Eritrócitos marcados com NBD-DOPA</i>	116
Conclusão.....	124
FLUORESCÊNCIA.....	124
RPE.....	125
MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA	126
Anexo.....	129
Bibliografia.....	130

Abreviaturas

AL	Anestésicos locais
BVC	Bupivacaína
BZC	Benzocaína
CLP	Clorprocaína
DBC	Dibucaína
EDC	Etidocaína
LDC	Lidocaína
MVC	Mepivacaína
PLC	Prilocaina
PRC	Procaína
TTC	Tetracaína
DOPC	Dioleilfosfatidilcolina
EPC	Fosfatidilcolina de ovo
NBD-PA	2-(12-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diol-4-il)amino) dodecanoil – 1 –hexadecanoil <i>sn</i> -glicero 3-fosfocolina
NBD-PS	2-(12-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diol-4-il)amino) dodecanoil – 1 –hexadecanoil <i>sn</i> -glicero 3-fosfoserina
POPA	1-palmitoil 2-oleil ácido fosfatídico
PyPC	1-hexadecanoil-2-(1-pirenodecanoil)- <i>sn</i> -glicero-3- fosfocolina
GUV	Vesículas unilamelares gigantes
LUV	Vesículas unilamelares grandes
MLV	Vesículas multilamelares
PBS	Solução salina de tampão fosfato
Trp	Triptofano
TBS	Solução salina de tampão Tris
h	Constante de Planck
ν	Frequência da radiação incidente
β_e	Magneton eletrônico de Bohr
β_N	Magneton nuclear de Bohr
$=$ g	Fator de Zeeman de desdobramento eletrônico
$=$ g_N	Fator de Zeeman de desdobramento nuclear
AreaCel	Área de toda a célula em <i>pixels</i>

AreaRelativaTotal	Área total em domínios/Área total da célula
MediaAreaDomCel	Área média dos domínios em uma mesma 'célula'
MediaAreaRelativa	Média da área relativa (área em domínio/área da 'célula')
	Média dos domínios em uma mesma 'célula'
MediaMediaDomCel	Média da intensidade média dos domínios em uma mesma 'célula'
SD	Desvio padrão da intensidade dos <i>pixels</i> de toda a célula
SDMedioDomCel	Desvio padrão da intensidade médio dos domínios em uma mesma 'célula'
I_e	Intensidade de emissão de forma excimérica
I_m	Intensidade de emissão de forma monomérica
I_{max}	Intensidade de emissão máxima
λ_{max}	Comprimento de onda de emissão máxima
ρ	Parâmetro de assimetria espectral
Γ	Largura do espectro a meia altura
I_{corr}	Intensidade de fluorescência corrigida
I_{obs}	Intensidade de fluorescência observada
$\tilde{\nu}$	Número de onda
α	Parâmetro de alargamento espectral de RPE
K_{sv}	Constante de Stern-Volmer

Lista de Figuras

FIGURA 1: ESTRUTURA DO CANAL DE POTÁSSIO.....	8
FIGURA 2: REPRESENTAÇÃO DA MOLÉCULA DE DBC.....	10
FIGURA 3: ESPECTRO DE "TROCA" DE RPE TÍPICO COM O MARCADOR 5- MESL,	16
FIGURA 4: FÓRMULA ESTRUTURAL DE LIPÍDIOS E MARCADORES DE MEMBRANA UTILIZADOS.	23
FIGURA 5: FÓRMULA ESTRUTURAL DOS MARCADORES DE MEMBRANA.....	24
FIGURA 6: FÓRMULA ESTRUTURAL DO FLUORÓFORO HOESCHT 33342.....	24
FIGURA 7: PROCESSAMENTO DE IMAGENS DE ERITRÓCITO MARCADO COM NBD.....	32
FIGURA 8: ESPECTRO DE RPE DO MARCADOR 5-MESL EM LIPOSSOMAS	37
FIGURA 9: ESPECTROS DE ABSORÇÃO DA DBC PROTONADA	43
FIGURA 10: DETERMINAÇÃO DO COEFICIENTE DE EXTINÇÃO MOLAR DA DBC PROTONADA.....	44
FIGURA 11: ESPECTROS DE EMISSÃO DA DBC EM DIFERENTES PH.	45
FIGURA 12: ESPECTROS DE FLUORESCÊNCIA DA DBC EM PH FISIOLÓGICO	46
FIGURA 13: INTENSIDADE DE FLUORESCÊNCIA <i>VERSUS</i> CONCENTRAÇÃO DE DBC EM DIFERENTES PH	48
FIGURA 14: CURVA DE TITULAÇÃO DA DBC.....	50
FIGURA 15: ESPECTROS DE DBC PROTONADA EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE NaI.....	51
FIGURA 16: INTENSIDADE DE FLUORESCÊNCIA DA DBC NA PRESENÇA DE NaI EM DIFERENTES PH.....	52
FIGURA 17: SUPRESSÃO DA FLUORESCÊNCIA DA DBC POR NaI EM DIFERENTES PH	53
FIGURA 18: INTENSIDADE DE FLUORESCÊNCIA DA DBC <i>VERSUS</i> CONCENTRAÇÃO DE DOPC EM PH 10,2.....	55
FIGURA 19: λ_{max} DE FLUORESCÊNCIA DA DBC <i>VERSUS</i> CONCENTRAÇÃO DE DOPC EM PH 10,2	57
FIGURA 20: INTENSIDADE DE FLUORESCÊNCIA DA DBC <i>VERSUS</i> CONCENTRAÇÃO DE DOPC EM PH 5,5.....	59
FIGURA 21: λ_{max} DE FLUORESCÊNCIA DA DBC <i>VERSUS</i> CONCENTRAÇÃO DE DOPC EM PH 5,5.	61
FIGURA 22: INTENSIDADE DE FLUORESCÊNCIA DA DBC <i>VERSUS</i> CONCENTRAÇÃO DE DOPC EM PH 7,4.....	63
FIGURA 23: λ_{max} DE FLUORESCÊNCIA DA DBC <i>VERSUS</i> CONCENTRAÇÃO DE DOPC EM PH 7,4.	64
FIGURA 24: SIMULAÇÃO DE ESPECTROS DE EMISSÃO DA DBC EM PRESENÇA DE DOPC A PH 5,5.....	66
FIGURA 25: SIMULAÇÃO DE λ_{max} E INTENSIDADE DA DBC EM PRESENÇA DE DOPC A PH 5,5.....	68
FIGURA 26: AJUSTE DE FUNÇÃO LOG-NORMAL A ESPECTRO DE DBC.....	70
FIGURA 27: ESPECTROS DE DBC EM SOLUÇÕES DE DIOXANO EM PH 5,5 E 10,2.....	73
FIGURA 28: λ_{max} DE FLUORESCÊNCIA DA DBC <i>VERSUS</i> CONSTANTE DIELETRICA DO MEIO	74
FIGURA 29: GRÁFICO DE LIPPERT PARA DBC NEUTRA E PROTONADA EM SOLUÇÕES DE DIOXANO.....	76
FIGURA 30: INTENSIDADE NORMALIZADA DE TRP A PH 5,5 E A PH 10,5	77
FIGURA 31: ESPECTROS DE HOESCHT 33324 A PH 5,5 E A PH 7,4.....	80
FIGURA 32: ESPECTROS DE DBC E DE PYPC: DOPC A PH 5,5.....	81
FIGURA 33: ATENUAÇÃO DA FLUORESCÊNCIA DE PYPC POR SUV.....	82
FIGURA 34: COMPARAÇÃO ENTRE INTENSIDADE EXPERIMENTAL E CORRIGIDA.....	83

FIGURA 35: LOGARITMO NATURAL DA INTENSIDADE DE FLUORESCÊNCIA DO PYPC VERSUS CONCENTRAÇÃO DE DOPC A PH 5,50	84
FIGURA 36: LIGAÇÃO DA DBC PROTONADA A MEMBRANAS, SEM E COM CORREÇÃO DE TURBIDEZ POR PYPC	85
FIGURA 37: I_F/I_M DE PYPC VERSUS CONCENTRAÇÃO DE CÁLCIO A PH 5,5.....	87
FIGURA 38: ESPECTRO DE RPE DO MARCADOR 5-MESL EM ÁGUA E EM EPC A 1 MOL % E 15 MOL%.....	89
FIGURA 39: ESPECTRO DE RPE DE DOPC:POPA:5-MESL A PH 7,4 COM DBC E Ca^{+2}	90
FIGURA 40: $\Delta H_{+1}/H_0$ DE DOPC: POPA: 5-MESL A PH 7,4 COM DBC E Ca^{+2}	91
FIGURA 41: α/α_0 DE DOPC: POPA: 5-MESL 75:10:15 A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE Ca^{+2} VERSUS TEMPO..	93
FIGURA 42: α/α_0 DE DOPC: POPA: 5-MESL 75:10:15 COM E SEM Ca^{+2} VERSUS DBC.....	94
FIGURA 43: α/α_0 DE DOPC: POPA: 5-MESL 75:10:15 VERSUS CONCENTRAÇÕES DE Ca^{+2}	95
FIGURA 44: α/α_0 DE DOPC: POPA: 5-MESL 75:10:15 DE MISTURAS DE DBC E Ca^{+}	96
FIGURA 45: α/α_0 DE DOPC: POPA: 5-MESL 75:10:15 VERSUS RAZÃO ENTRE DBC E Ca^{+}	97
FIGURA 46: COMPARAÇÃO DE α/α_0 DE DOPC: POPA: 5-MESL 75: 10: 15 COM Ca^{+2} , EDTA E DBC	98
FIGURA 47: COMPARAÇÃO DE α/α_0 DE DOPC: POPA: 5-MESL 75: 10: 15 COM Mg^{+2} , EDTA E DBC.....	100
FIGURA 48: VARIAÇÃO DE α/α_0 COM DBC, Ca^{+2} E DBC EM PRESENÇA DE Ca^{+2}	102
FIGURA 49: IMAGENS DE GUV MARCADAS COM NBD-PA NA PRESENÇA DE ADITIVOS	108
FIGURA 50: PARÂMETROS DE DOMÍNIOS DE GUV DE NBD-PA NA PRESENÇA DE ADITIVOS.	110
FIGURA 51: IMAGENS DE GHOSTS MARCADOS COM NBD-PA NA PRESENÇA DE ADITIVOS.	112
FIGURA 52: IMAGENS DE ERITRÓCITOS MARCADOS COM NBD-PA NA PRESENÇA DE ADITIVOS.....	116
FIGURA 53: MODELO DE FORMAÇÃO DE DOMÍNIOS LIPÍDICOS.....	128

Lista de Tabelas

TABELA 1: PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DOS ANESTÉSICOS LOCAIS.....	5
TABELA 2: PARÂMETROS UTILIZADOS NA ANÁLISE DE IMAGENS DE DOMÍNIOS LIPÍDICOS.....	33
TABELA 3: VOLUME MOLAR PARCIAL DOS LIPÍDIOS USADOS.....	42
TABELA 4: CARACTERÍSTICAS FLUORIMÉTRICAS DA DBC EM DIFERENTES TAMPÕES.....	47
TABELA 5: CONSTANTES DE STERN-VOLMER DE SUPRESSÃO DA DBC POR NaI.....	53
TABELA 6: CONSTANTES DE LIGAÇÃO E PROPRIEDADES FLUORIMÉTRICAS DA DBC EM MEMBRANA.....	55
TABELA 7: REGRESSÃO LINEAR ENTRE λ_{max} DA DBC E CONSTANTE DIELÉTRICA DO MEIO.....	74
TABELA 8: CONSTANTE DIELÉTRICA E ÍNDICE DE REFRAÇÃO DE SOLUÇÕES DE DIOXANO.....	76
TABELA 9: CORRELAÇÃO ENTRE PARÂMETROS LOG-NORMAL DE ESPECTROS DE FLUORESCÊNCIA DA DBC.....	78
TABELA 10: COMPARAÇÃO ENTRE VESÍCULAS, <i>GHOSTS</i> E ERITRÓCITOS MARCADOS COM NBD-PA APÓS 30 MIN.....	105
TABELA 11: MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA DE VESÍCULAS MARCADAS COM NBD-PA APÓS 30 MIN.....	108
TABELA 12: MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA DE <i>GHOST</i> MARCADOS COM NBD-PA APÓS 30 MIN.....	112
TABELA 13: CORRELAÇÃO ENTRE PARÂMETROS DE <i>GHOSTS</i> MARCADOS COM NBD-DOPA.....	114
TABELA 14: CLASSIFICAÇÃO DOS PARÂMETROS DE ERITRÓCITOS MARCADOS COM NBD-DOPA.....	115
TABELA 15: MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA DE ERITRÓCITOS MARCADOS COM NBD-PA APÓS 30 MIN.....	117
TABELA 16: CORRELAÇÃO ENTRE PARÂMETROS DE <i>GHOSTS</i> MARCADOS COM NBD-DOPA.....	119
TABELA 17: CLASSIFICAÇÃO DOS PARÂMETROS DE ERITRÓCITOS MARCADOS COM NBD-DOPA.....	121
TABELA 18: ERITRÓCITOS MARCADOS COM NBD-PS APÓS 30 MIN.....	122

Lista de Equações

EQUAÇÃO 1: ENERGIA DE RESSONÂNCIA.....	14
EQUAÇÃO 2: HAMILTONIANA DE <i>SPIN</i>	15
EQUAÇÃO 3: PARÂMETRO DE ORDEM TEÓRICO.....	17
EQUAÇÃO 4: PARÂMETRO DE ORDEM EXPERIMENTAL.....	17
EQUAÇÃO 5: PARÂMETRO α DE ALTERAÇÃO DE ESPECTRO DE RPE.....	19
EQUAÇÃO 6: PERTURBAÇÃO DA MEMBRANA.....	26
EQUAÇÃO 7: CURVA LOG-NORMAL.....	28
EQUAÇÃO 8: CORREÇÃO DE FLUORESCÊNCIA POR DENSIDADE ÓPTICA.....	28
EQUAÇÃO 9: CORREÇÃO DE FLUORESCÊNCIA POR DILUIÇÕES SUCESSIVAS: PRESSUPOSTO.....	29
EQUAÇÃO 10: CORREÇÃO DE FLUORESCÊNCIA POR DILUIÇÕES SUCESSIVAS: INTEGRAÇÃO DA EQUAÇÃO 10.....	29
EQUAÇÃO 11: CORREÇÃO DE FLUORESCÊNCIA POR DILUIÇÕES SUCESSIVAS: EXPRESSÃO FINAL.....	29
EQUAÇÃO 12: EXPRESSÃO PARA AJUSTE DE DADOS A MODELO DE LIGAÇÃO DA DBC À MEMBRANA.....	30
EQUAÇÃO 13: COEFICIENTE DE PARTIÇÃO.....	31
EQUAÇÃO 14: CONSTANTE DE LIGAÇÃO.....	31
EQUAÇÃO 15: RELAÇÃO ENTRE COEFICIENTE DE LIGAÇÃO E CONSTANTE DE PARTIÇÃO.....	31
EQUAÇÃO 16: EQUAÇÃO DE HENDERSON-HASSELBACH.....	48
EQUAÇÃO 17: MODELO DE LIGAÇÃO DA DBC À MEMBRANA.....	58
EQUAÇÃO 18: EQUAÇÃO DE LIPPERT.....	75

Resumo

Domínios lipídicos são regiões de composição diferente em uma mesma membrana, quer seja biológica ou sintética. A dinâmica destes domínios pode participar de processos bioquímicos e fisiológicos. Anestésicos locais são fármacos que agem sobre proteínas de membranas por um mecanismo ainda não totalmente conhecido, e cuja potência está fortemente correlacionada com sua hidrofobicidade. Dentre estes, a dibucaína (DBC) é um potente anestésico, com alto coeficiente de partição em favor das membranas, capaz de interferir com diversos processos fisiológicos e de reverter alguns efeitos do íon cálcio, um conhecido indutor de domínios lipídicos.

Investigamos a interação da DBC com membranas e o efeito deste AL sobre domínios lipídicos naturais e induzidos por cálcio. As técnicas usadas foram Fluorescência Estática, Ressonância Paramagnética Eletrônica e Microscopia de Fluorescência.

Verificamos que a DBC possui um pK_a de 8,4 e que deve localizar-se na altura do glicerol em membranas compostas por DOPC, o que favorece sua competição com o cálcio pelas cabeças polares de lipídios, e que a forma neutra apresenta maior afinidade pela membrana ($K_b = 1500$) que a protonada ($K_b = 930$). A fluorescência intrínseca da molécula foi analisada em água, em membranas e em soluções de diferentes polaridades; observamos diminuição no rendimento quântico de fluorescência da DBC, concomitante a um deslocamento para o azul nos meios mais apolares.

Experimentos de Ressonância Paramagnética Eletrônica com marcadores de *spin* do tipo nitróxido em alta concentração (exibindo alargamento dos espectros devido à interação de troca de estado de *spin*) mostraram que a DBC reverte domínios lipídicos induzidos por cálcio e por magnésio, em sistemas ternários de DOPC: POPA: 5-MeSL.

Por microscopia de fluorescência (usando sondas do tipo nitro-benzoxadiol amino, NBD) notamos diferenças evidentes no padrão de formação de domínios lipídicos entre os tratamentos controle, com cálcio, com DBC e com ambos os aditivos, tanto em vesículas unilamelares gigantes quanto em eritrócitos e *ghosts* de eritrócitos marcados. As diferenças entre os tratamentos foram qualitativamente consistentes para os parâmetros de análise das imagens utilizados. Vimos também aqui o antagonismo entre a DBC e o

cálcio e, além disso, uma aparente capacidade da DBC em reverter domínios induzidos por proteínas de membrana.

Nossos resultados sugerem que a DBC reverte a separação lateral de fases induzida por cálcio ou proteínas de membrana; esta capacidade da DBC – não observada em outros anestésicos locais – estaria relacionada à localização preferencial da DBC próximo à cabeça polar dos fosfolipídios. Tal fenômeno pode ser relevante nos processos membranares em que a DBC reconhecidamente interfere, mediados pela alteração do padrão dos domínios lipídicos, dentre os quais a fusão celular e a própria anestesia.

Summary

Lipid domains are compositionally different regions within biological or artificial membranes that may play an important role in physiological and biochemical events as well. Local anesthetics, however, acts upon membrane proteins by an still unknown mechanism and exhibit a strong correlation between partition to membranes and anesthetic potency. Among this class of pharmaceuticals, dibucaine (DBC) is a potent one, with a high membrane partition, able to alter several physiological processes and revert some calcium-induced effects on artificial membranes.

We have investigated the interaction of neutral and protonated forms of DBC with natural and artificial membranes and its effect upon naturally and calcium-induced lipid domains both in biological and artificial membrane systems. Our approach was based on Static Fluorescence, Electronic Paramagnetic Resonance (EPR) and Fluorescence Microscopy.

Our experiments reveal a pK_a of 8,4 for DBC and that its aromatic ring may be located close to the glycerol backbone of phospholipid membranes. Surprisingly, DBC emission *decreased* simultaneously to a classical blue shift when membranes are available or by reducing its solution polarity.

EPR experiments strongly suggest that DBC reverts Ca^{+2} - or Mg^{+2} -induced lipid domains. The parameter α is increased in ternary systems composed by DOPC: POPA: 5-MeSL when DBC is present, which is antagonistic to calcium ion.

Fluorescence Microscopy experiments revealed distinct patterns among DBC, Ca^{+2} or DBC plus Ca^{+2} treatments, in NBD-PA labeled liposomes, ghosts and erythrocytes. Although Kruskal-Wallis test were not able to tell which treatment differences were statistically significant, those differences were consistent through all parameters analysed. We could observe antagonism between DBC and Ca^{+2} , besides a further ability of DBC to disrupt naturally occurring lipid domains.

These data suggest that DBC is able to revert Ca^{+2} -, Mg^{+2} or protein-induced domains, for its favoured location close to the phospholipid head. Such phenomena may be relevant in lipid domain mediated processes, which may include anesthesia itself.

Introdução

Membranas

As membranas têm uma história relativamente longa de estudos, tendo como um dos marcos as notáveis conjecturas feitas em 1899, por Overton (apud Datta, 1987) quanto a natureza lipídica da membrana, a partir da correlação entre a taxa de transporte de diversos não-eletrólitos e a solubilidade destes solutos em lipídios.

O modelo de membranas biológicas atualmente aceito é o proposto por Singer e Nicholson (1972) e batizado como 'Mosaico-Fluido'. O modelo consiste de três proposições mais importantes, que são:

- A estrutura da biomembrana em bicamada, com os grupamentos hidrofílicos de lipídios voltados para a face aquosa e as cadeias acila formando um *core* hidrofóbico;
- A inserção de proteínas intrínsecas nesta bicamada, também regida pelas forças intermoleculares tradicionais (interações eletrostáticas, covalentes e hidrofóbicas, com prevalência das hidrofóbicas), e a adsorção de proteínas extrínsecas à superfície da membrana principalmente por meio de forças eletrostáticas;
- A livre movimentação dos componentes da membrana, que é de caráter fluido, permitindo uma distribuição aleatória destas moléculas.

Tem-se somado porém algumas considerações a este modelo, importantes quanto ao comportamento das biomembranas (Glaser, 1992). Primeiramente, a descoberta do citoesqueleto e sua ligação com proteínas de membrana implicou na restrição de movimento dessas proteínas. A distribuição de proteínas na membrana também não é aleatória, podendo existir vários tipos de especializações de membrana, como junções do tipo *gap*, junções do tipo *tight* e microvilosidades.

As demais grandes inovações ao Mosaico-Fluido são a existência de assimetria entre as bicamadas, i.e., diferenças de composições entre as monocamadas e que parecem ser importantes para o desempenho adequado das atividades de proteínas de membrana (Honger *et al.*, 1997) e a distribuição não-aleatória de lipídios de uma mesma monocamada, gerando domínios.

A assimetria transversal ocorre em relação a todos os grandes constituintes de membranas biológicas. Os lipídios não fogem à regra. Em eritrócitos, a fosfatidilcolina, esfingomiélin, glicoesfingolipídios e colesterol encontram-se na monocamada externa, enquanto a fosfatidilserina e a fosfatidiletanolamina concentram-se mais na monocamada interna.

Além dessa propriedade, observou-se em membranas naturais a existência de domínios lipídicos, que serão discutidos a seguir.

Domínios lipídicos

Domínios lipídicos podem ser definidos como regiões de membranas naturais ou artificiais que tenham composição diferenciada das demais regiões de uma mesma membrana (Glaser, 1992). Vale distingui-los aqui de qualquer outra forma de especialização da membrana, como a distribuição não-homogênea de proteínas em membranas naturais, apesar disto poder induzir à formação dos domínios lipídicos focalizados nesta Tese.

Membranas são ricas em variedade de lipídios, o que não seria justificado caso servisse somente como uma barreira para separar compartimentos aquosos, ainda que leve-se em conta seu papel em selecionar a entrada e saída de substâncias e a interação da membrana com outras moléculas e células. O papel da diversidade dos lipídios era (e ainda o é em grande parte) incógnito. Alguns avanços deram-se com a identificação da regulação da fluidez da membrana (Datta, 1987) e pela descoberta de afinidade de proteínas de membrana por determinados tipos de lipídios.

Estudos com membranas-modelo, compostas somente por lipídios, revelaram a existência de propriedades bastante interessantes, como a existência de diferentes tipos de fase e, conseqüentemente, arranjos diferentes de lipídios (Datta, 1987). Imediatamente buscou-se correlações biológicas desse fenômeno, que poderiam desempenhar papel regulatório nos diversos processos mediados por membranas, como a fusão de membranas, morfologia celular e regulação de atividade de proteínas de membrana.

Verificou-se porém uma larga prevalência da estrutura em bicamada em fase fluida, com poucas ocorrências de fase gel em sistemas biológicos (Glaser, 1993). Em sistemas biomiméticos, a indução de transição de fase em faixas de temperaturas não

desnaturantes afetou bastante a atividade de enzimas de membrana, alterou restrições de movimento e ligação de proteínas a membranas, além de notar-se a alteração de temperaturas de transição de fases em presença de peptídeos. Tais substâncias eram capazes, de alguma maneira, de influenciar as próprias interações entre lipídios, diminuindo ou aumentando o ΔG de tais interações (Kleinschmidt & Marsh, 1997).

Nesses sistemas artificiais, agentes como cálcio, peptídeos e anestésicos locais mostraram-se capazes de afetar a distribuição de fases lipídicas (Kleinschmidt & Marsh, 1997; Ghosh *et al.*, 1997), embora não se conheça exatamente o mecanismo de tal alteração.

Como dito anteriormente, não foram encontradas muitas estruturas lipídicas diferentes de bicamadas fluidas dentro do contexto biológico, especialmente na fase gel. Verificou-se no entanto por meio de fluorescência estática e dinâmica, (Hartmann *et al.*, 1977), microscopia de fluorescência, técnicas de recuperação de fluorescência após irradiação ou "photobleaching" (FRAP) (Yechiel & Edidin, 1987), e calorimetria (Jorgensen & Mouritsen, 1999; Cevc *et al.*, 1981) alterações na distribuição lateral de lipídios de membranas naturais e artificiais, por mudança de fases dos lipídios e também por meio de agentes indutores de domínios lipídicos havendo ou não transição de fases.

A possibilidade de existir uma heterogeneidade membranar não mediada por transições de fase permitiu uma nova corrida à identificação deste fenômeno em células em plena atividade, ao entendimento das relações físicas subjacentes a este processo e às implicações fisiológicas deste processo. Tal heterogeneidade ou segregação lateral de fases é também mencionada na literatura como formação de domínios lipídicos.

Tem sido demonstrada a existência desses domínios em membranas biológicas como a de eritrócitos (Shukla *et al.*, 1982; Rodgers & Glaser, 1991, 1993), de espermatozoides (Wolf *et al.*, 1990), de fibroblastos (Tocanne *et al.*, 1989), de protoplastos (Metcalf *et al.*, 1986) e cloroplastos (Finzi *et al.*, 1989) que pode estar correlacionada com processos fisiológicos como a fusão e endocitose (embora ainda não comprovada por experimentos *in vivo*). Em membranas ricas em fosfolipídios, a segregação não acontece espontaneamente, mas é induzida por Ca^{2+} (Hartmann *et al.*, 1977, Hui *et al.*, 1983; Haverstick & Glaser, 1987), peptídios como a polilisina (Laroche *et al.*, 1988) e a tionina (Wang *et al.*, 1993) e proteínas como o citocromo C (Birrel & Griffith, 1976), a proteína

básica da mielina (Boggs *et al.*, 1977), a proteína quinase C (Bazzi & Nelsestuen, 1991), a anexina (Bazzi & Nelsestuen, 1992) e a proteína gp41 do envelope de HIV (Trommeshauser & Galla, 1998).

A segregação lateral reflete a preferência na interação seletiva de lipídios com proteínas membranares ou é resultado da interação eletrostática de uma ou mais cabeças polares dos lipídios com o agente indutor. Acredita-se que o papel do Ca^{2+} como agente fusogênico (Sheremetyev *et al.*, 2000; Wiseman *et al.*, 1999; Pryor *et al.*, 1999) está associado a sua capacidade de ligar-se aos grupamentos fosfato de dois lipídios adjacentes, aproximando-os e desestruturando o arranjo local da bicamada (induzindo a formação de fases hexagonais, no caso de vesículas de fosfatidilserina e fosfatidiletanolamina).

Outros processos ainda podem vir a somar-se à extensa lista que está sendo formada, dentre os quais interessa-nos um papel potencial dos domínios lipídicos no mecanismo de anestesia local e de outros mecanismos envolvendo ação de anestésicos locais e moléculas hidrofóbicas mediada pela membrana.

Anestésicos locais e mecanismo de anestesia

Anestésicos locais (AL) são moléculas de estruturas químicas bem variáveis, que podem ser amino-ésteres, amino-carbamatos, amino-cetonas amidas, álcoois, tio-ésteres, tio-amidas, derivados de uréia, ésteres fosfóricos, poliéteres ou aminas (Gupta, 1991). A **Tabela 1** mostra parâmetros físicos e químicos de anestésicos locais do tipo éster, amino-éster e amino-amidas, que são os AL mais usados clinicamente. Diferem dos anestésicos gerais por terem ação localizada, por estes últimos serem aplicados via circulação sangüínea, direta ou indiretamente (pelos pulmões) e por terem ação sobre os axônios, ao invés de agir sobre transmissões sinápticas (Covino e Vassalo, 1976).

Tabela 1: Propriedades físico-químicas dos anestésicos locais. Potência anestésica, parâmetros hidrofóbicos (coeficiente de partição, P, e solubilidade em água, Sw) e estéricos (massa molar, MM, área de van der Waals) dos anestésicos locais das séries éster (BZC), amino-éster (PRC, CLP e TTC) e amino-amida (LDC a DBC). AL⁺ e AL⁰ referem-se as formas protonada e neutra dos anestésicos locais.

AL	MM	pKa	Potência ^a Anestésica	Sw (M) AL ⁺ ^b	Sw (mM) AL ⁰ ^c	Log P _{gct} AL ⁺	Log P _{gct} AL ⁰	P _{epc} AL ⁰ ^e	Área (Å ²) ^f
BZC	165,20	-	1,2	-	4,4	-	1,58	254±43	298
PRC	272,76	9,1	1	2,95	16,3	-1,12	1,27	84±32	422
CLP	307,22	9,1	4	0,20	1,98	-0,55	1,06	250±46	447
TTC	300,81	8,5	16	1,34	0,76	0,63	2,07	868±23	544
LDC	270,79	7,8	4	2,30	13,1	-0,09	1,16	144±54	433
PLC	256,76	7,8	3	0,83	23,1	-0,12	1,32	110±61	428
EDC	312,87	7,7	16	0,20	0,16	0,91	1,68	1202±480	483
MVC	282,80	7,6	2	1,30	8,82	-0,37	1,23	98±12	396
BVC	324,88	8,1	16	0,07	0,58	0,67	1,36	798±147	451
DBC	379,91	8,4	16	1,90	0,03	1,51	1,95	2240±1050	617

^a Potência anestésica relativa e meia-vida sangüínea, de acordo com Covino & Vassalo (1976); ^b

Determinado em tampão acetato 20 mM, pH = 5,0; ^c Determinado em tampão carbonato 20 mM, pH = 10,5;

^d Entre octanol e água, segundo Strichartz (1990); ^e Entre vesículas de EPC e água, segundo de Paula & Schreier (1995) e Pinto *et al* (2000); ^f Gupta (1991).

Apesar deste amplo uso, como ocorre a anestesia local não é ainda completamente conhecido. Urge então um entendimento de como AL agem para que se possa conhecer as contra-indicações, efeitos colaterais, e mesmo desenhar anestésicos mais potentes, menos tóxicos e adequados para diversas situações (de Jong, 1994).

Fisiologicamente, o potencial de repouso de uma membrana é mantido pelo fluxo do K^+ através da membrana, pela atração do K^+ a ânions intracelulares e pela bomba de Na^+/K^+ . A alteração da condutância ou da concentração de um desses componentes pode levar à abertura de canais de Na^+ . Nesta situação, o influxo de Na^+ leva à uma despolarização da membrana¹. A repolarização da membrana dar-se-á pelo fechamento dos canais de sódio, após poucos milissegundos, e pelo bombeamento de potássio para fora da célula pela Na^+, K^+ ATPase. A ativação e fechamento dos canais de Na^+ desempenham papel fundamental e são realizados através de várias etapas entre o canal no estado de repouso (não-condutor) e aberto (condutor) e é nessa proteína que atuam os anestésicos locais.

Além de agir sobre os canais de sódio voltagem-dependentes, os AL têm ainda a capacidade de interferir em vários processos que envolvam estruturas membranares, como receptores de acetilcolina (Forman & Miller, 1989; Arias *et al.*, 1990), citocromo oxidase (Casanovas *et al.*, 1983; Horaková *et al.*, 1989), a proteína EnvZ (Rampersaud & Inouye, 1991) e várias ATPases (Saishu *et al.*, 1983; Vanderkooi & Adade, 1986; Adade *et al.*, 1984; Henao *et al.*, 1991; Wu & Berkowitz, 1991; Wolosker *et al.*, 1992) de retículo endoplasmático, cloroplastos e mitocôndrias, inibindo o transporte de elétrons nessa última (Chazotte & Vanderkooi, 1981; Sztark *et al.*, 1994).

¹ É através da despolarização da membrana que se propaga o estímulo nervoso, transmitido toda vez que é atingido um potencial de ação (Aires, 1991).

Ação dos anestésicos locais na proteína canal de sódio

O canal de sódio voltagem-dependente é a principal proteína do axônio, chegando a representar mais de 90% das proteínas de membranas deste. Esta proteína, que pertence à família dos canais de potássio e de cálcio voltagem-dependentes não possui um sítio receptor, e sua ativação é feita pela alteração do potencial elétrico da membrana que causa modificações conformacionais na proteína, levando-a a ativar-se (Marban *et al.*, 1998). É uma glicoproteína, seletiva ao íon sódio (a passagem de K^+ equivale a cerca de 8% da de Na^+); pode apresentar mais de uma subunidade, mas somente a α é requerida para sua função.

A estrutura primária do canal de Na^+ de lula foi deduzida de sua sequência genética (Noda *et al.*, 1984). O canal possui grandes regiões hidrofóbicas em α -hélice e atravessando a membrana, espaçadas por regiões hidrofílicas, envolvidas na formação do poro iônico e da interface polar e apresenta-se como uma única glicoproteína de aproximadamente 200 kDa, altamente glicosilada e com grande proporção de resíduos de aminoácidos carregados negativamente - cerca de 100 cargas negativas por canal (Miller *et al.*, 1983). Canais de músculo esquelético tem a subunidade α (260 kDa) e uma ou duas subunidades β (38 kDa cada) enquanto os canais voltagem-dependentes de enguia e de coração de galinha apresentam apenas a subunidade α (Caterall, 1992). Experimentos usando anticorpos anti-peptídios de $\beta 1$ e $\beta 2$ mostraram que a maior parte dos canais de sódio de cérebro de rato têm ambas subunidades β ; a subunidade α tem 260kDa e 2006 resíduos de aminoácidos (Noda *et al.*, 1986) e as β têm 23 e 21kDa cada, sendo que $\beta 2$ está ligada à subunidade α por pontes dissulfeto enquanto $\beta 1$ liga-se não covalentemente à α . Cada subunidade β tem um grande resíduo amino terminal extracelular com várias regiões de consenso para N-glicosilação.

Menos de 20 proteínas de membrana tiveram suas estruturas tridimensionais resolvidas até o momento (Sakai & Tsukihara, 1998). O canal de potássio é uma dessas proteínas, cuja estrutura com resolução de 3,2 angstroms, obtida por cristalografia de Raios-X (Doyle *et al.*, 1998) é mostrada na **Figura 1**. Os canais de potássio são muito similares aos de sódio, pois apresentam quatro domínios (I a IV) compostos de seis α -

hélices transmembranares (S1 a S6). Em cada domínio a α -hélice S4 - com vários resíduos de aminoácidos carregados positivamente - tem importância fundamental no processo de abertura do poro. Como esses canais voltagem-dependentes não tem uma molécula ativadora específica, as α -hélices S4 formam a região "voltage-sensing" ou de disparo do canal (Scheuer, 1999). Acredita-se que a mudança do potencial da membrana desestabiliza o segmento S4 cujas cargas positivas são mantidas por pareamento com cargas negativas de outros segmentos transmembranares. Com a despolarização da membrana reduzem-se as forças que mantêm as cargas positivas de S4 na sua posição e a hélice S4 sofre uma rotação (movimento espiral de cerca de 60 graus, deslocando-se cerca de 5 angstroms para fora da bicamada). Esse movimento deixa uma carga negativa não pareada no interior da bicamada e expõe uma carga positiva na superfície externa da membrana, resultando na transferência de carga líquida de +1 (Caterral, 1992).

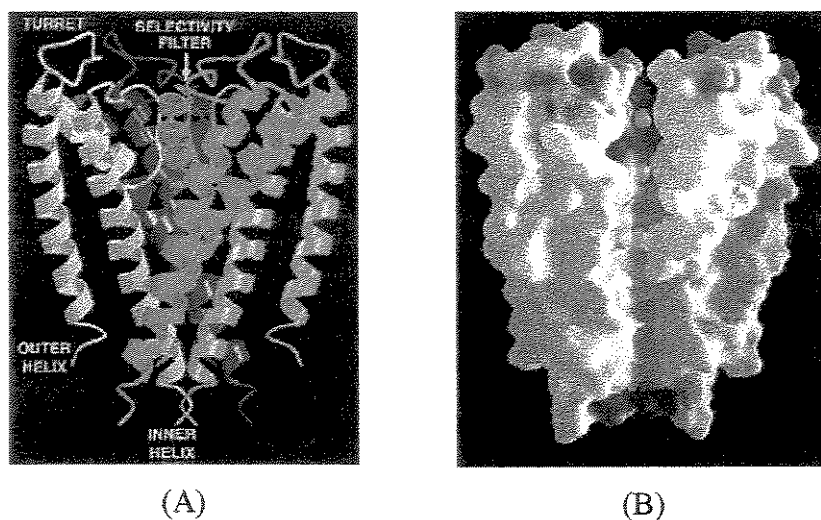


Figura 1: Estrutura do canal de potássio. (A) Vista tridimensional do tetrâmero do canal de potássio; (B) Ilustração do poro iônico do canal (de acordo com Doyle *et al.*, 1998).

Evidências da interação de AL com o canal de sódio de axônios vêm sendo publicadas há vários anos. Frazier e colaboradores (1970) verificaram que análogos quaternários de AL bloqueavam a condução nervosa quando aplicados por perfusão aos

axônios gigantes de lula perfundidos, porém eram relativamente ineficazes quando aplicados externamente (Frazier *et al.*, 1970; Narahashi *et al.*, 1969; 1970). Mas foi somente na década de 90 que estudos de mutação sítio dirigida detectaram a existência de um sítio hidrofóbico para ligação de AL localizado na alfa-hélice S6 do domínio IV da subunidade α do canal de sódio de cérebro de rato. (Ragsdale *et al.*, 1994 e 1996), reforçando a importância da interação AL-lipídio como facilitadora do acesso do AL ao seu sítio na proteína canal de Na^+ (Mason *et al.*, 1991), cuja inativação é responsável pela inibição da condução do estímulo nervoso.

A interação direta da proteína com moléculas com ação anestésica só foi comprovada para venenos como a tetrodotoxina e saxitoxina (Kao & Nishiyama, 1965; Hille, 1971), α e γ peptídeo-toxinas de escorpião (Strichartz *et al.*, 1987). Elas ligam-se na interface interna da membrana, bloqueando o canal da Na^+ (Frazier *et al.*, 1970; Narahashi *et al.*, 1969; 1970; Butterworth & Strichartz, 1990).

Em princípio os anestésicos locais poderiam agir sobre várias etapas da excitação neuronal: sobre a diminuição do potencial de repouso, o aumento do potencial de ação, ou modificando as velocidades de despolarização ou repolarização. Experimentos realizados com nervos isolados mostraram não haver uma alteração significativa no potencial de repouso nem no potencial de ação (Covino e Vassalo, 1976) na presença do AL. Há, porém, uma diminuição na velocidade de repolarização quando aumenta-se a concentração da maioria dos anestésicos locais. Em quantidade suficiente ocorre o bloqueio do impulso nervoso e o potencial de ação não é atingido.

Atualmente existem duas grandes hipóteses a respeito da ação dos AL sobre os canais de Na^+ . A primeira propõe um bloqueio da abertura destes canais diretamente pelos AL ou ligação destes em sítios receptores específicos da proteína, mudando sua conformação. A segunda hipótese, também conhecida como hipótese do lipídio, considera uma influência dos AL sobre a camada lipídica. A alteração das propriedades físico-químicas da membrana levaria a mudanças conformacionais do canal de sódio, tornando-o inativo.

Dibucaína

A dibucaína (DBC) apresenta estrutura bastante diferenciada dos demais AL de uso clínico (**Figura 2**). Em consequência ao grande anel quinolínico, e ao grupamento butila ligado ao anel pelo oxigênio o coeficiente de partição da DBC para a membrana é alto (de Paula & Schreier, 1995 e 1996) em relação aos demais AL. Seu anel rígido e volumoso, impõe restrições à molécula e deve modular sua intercalação em membranas. A localização da forma desprotonada da DBC em membranas lipídicas é mais superficial que a da TTC, como revelado por ^2H e ^{31}P -RMN (Browning & Akutsu, 1982), e depende bastante de interações eletrostáticas com a cabeça polar dos fosfolipídios (Eftink *et al.*, 1985).

Através da calorimetria, Papahadjopoulos e colaboradores (1975) mostraram que a DBC protonada interage com fosfolipídios carregados negativamente diminuindo a temperatura de transição de fases de bicamadas de PS. Cullis & Verkleij (1979) mostraram que a DBC protonada compete com o Ca^{2+} pela interação com grupamentos fosfato da cabeça polar e, por esse mecanismo estabilizaria a fase lamelar lipídica, já que o Ca^{2+} induz a formação de fase hexagonal (Hornby & Cullis, 1981) em lipossomas.

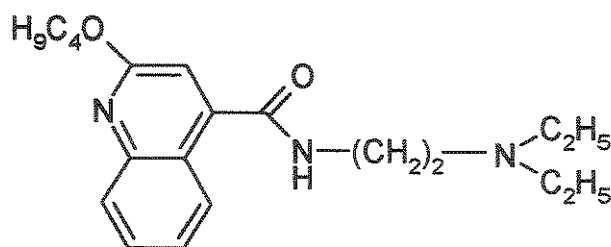


Figura 2 : Representação da molécula de DBC em sua forma desprotonada.

A DBC², assim como outros AL que tem um grupamento amina terciário, existe tanto na forma não protonada como na forma de cátions de amônio, que se ionizam

² O nitrogênio do anel quinolínico tem pK_a de 1,77 (Vanderkooi, 1984) e, portanto, sua ionização não é importante em condições fisiológicas. importante em condições fisiológicas. importante em condições fisiológicas.

fracamente. De uma maneira geral, os pK_a dos AL do tipo amino-amidas como a DBC são ligeiramente menores que o dos AL do tipo amino-ésteres (Gupta, 1991; Strichartz *et al.*, 1990).



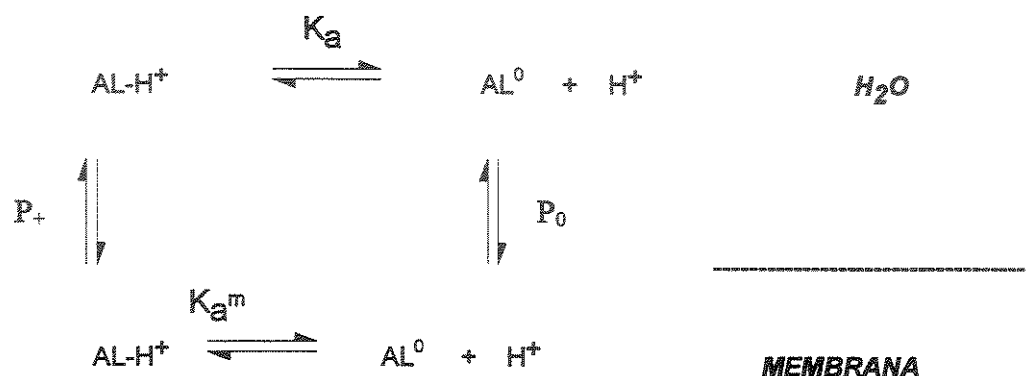
A constante de dissociação (K_a) da amina terciária faz com que em pH fisiológico encontrem-se presentes ambas as formas: carregada (DBC^+) e neutra (DBC^0). O pK_a aparente do grupamento amina terciário da DBC está em torno de 8,3 (Agin *et al.*, 1965).

A interação das formas ionizada e neutra dos AL com membranas é diferente. Moléculas anfifílicas como os AL tendem a interagir com a fase lipídica em função de sua hidrofobicidade. Quanto maior a razão hidrofóbica/hidrofílica da molécula, maior a interação desta na fase membranar. Por isso AL desprotonados tem maior afinidade por membranas lipídicas (Boulanger *et al.*, 1980) e biológicas (Strichartz & Ritchie, 1987).

Também a potência anestésica está diretamente relacionada à hidrofobicidade dos AL (Gupta, 1991) que, como já foi dito, é maior para a forma desprotonada. Por essa razão, é fundamental que se considere a real concentração da droga desprotonada (que particiona mais no axônio) em pH 7,4; caso contrário um AL amino-amida parecerá mais potente que um amino-éster similar, simplesmente porque estará presente em maior quantidade do que este, na forma desprotonada (Wildsmith *et al.*, 1987).

A fração protonada dos AL interage menos com a membrana, porém tem maior solubilidade em água. A solubilidade aquosa é um fator limitante da distribuição dos AL e é tão importante quanto a hidrofobicidade para a farmacodinâmica (Kubinyi, 1979) destes. A velocidade de transferência do AL entre membranas é mediada pela solubilidade dos mesmos nos compartimentos aquosos intermediários. Essas características das formas neutra e protonada são muito importantes para que o AL alcance a membrana das células nervosas, atravessando barreiras membranares, e restabelecendo sua concentração (e equilíbrio de ionização) no compartimento aquoso subsequente (de Paula & Schreier, 1995 e 1996).

A interação dos AL com a membrana pode ser descrita pelo seu coeficiente de partição, que é um parâmetro dependente da hidrofobicidade molecular (Kubinyi, 1979). Define-se o coeficiente de partição (P) de um soluto entre duas fases, como a razão das concentrações desse nas fases. O esquema abaixo (Schreier *et al.*, 1984a) mostra a partição de um AL ionizável entre a fase aquosa e membranar. Na distribuição dos AL entre membrana e água temos um equilíbrio das contribuições da dissociação em água (K_a) e em membrana (K_a^m) e da partição (P) diferencial das formas protonada e desprotonada dos AL (P_+ , P_0), representado por :



Quando os valores de P são muito diferentes entre a forma protonada e neutra, pode haver um deslocamento no equilíbrio de ionização, como demonstrado para a tetracaína (Schreier *et al.*, 1984a). No caso da DBC os valores de P não são diferentes o bastante para alterar significativamente o valor de pKa, como mostrado recentemente (Malheiros *et al.*, 2000).

Anestésicos locais e domínios lipídicos

Em nosso laboratório tem-se estudado a interação de famílias de AL com membranas fosfolipídicas através de técnicas espectroscópicas como Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE) e fluorescência (Lissi *et al*, 1990; de Paula & Schreier, 1995) e Ressonância Magnética Nuclear (RMN) (de Paula, 1993) e fotometria (Pinto *et al*, 2000; Malheiros *et al*, 2000). Investigou-se a correlação entre parâmetros físico-químicos de hidrofobicidade (partição, solubilidade aquosa) da forma desprotonada dos AL e alterações estruturais e dinâmicas - parâmetro de ordem e tempos de correlação rotacional - da fase lipídica (de Paula & Schreier, 1995, 1996) e encontrou-se dados indicativos de que efeitos estéricos dos AL influenciam sua *localização* na membrana, determinando o grau de perturbação da fase lipídica (Pinto *et al*, 2000).

Como a DBC é capaz de deslocar íons Ca^{2+} da cabeça polar de fosfolipídios (Carbon, 1972; Cullis & Verkleij, 1979), revertendo a indução de fases hexagonais em membranas modelo compostas de fosfatidiletanolamina e fosfatidilserina, propusemo-nos verificar o efeito deste AL na segregação lateral de fases de membranas modelo e de eritrócito, utilizando medidas de microscopia de fluorescência digitalizada e RPE, correlacionando esses dados com as alterações estruturais e dinâmicas da DBC em membranas. Como o efeito de um anestésico local na indução de domínios lipídios em membranas biológicas ainda não foi descrito, a demonstração desse efeito, em concentrações de AL iguais as usadas clinicamente fortaleceria a hipótese do papel fisiológico da formação de domínios na resposta celular, além de prover nova evidência da relevância de interações com a fase lipídica para o mecanismo de anestesia.

Ressonância paramagnética eletrônica

A ressonância paramagnética eletrônica (RPE) é uma técnica espectroscópica que opera na região de microondas (GHz) e detecta transições de estados de *spin* eletrônicos. A energia correspondente a essas transições corresponde a movimentos translacionais, rotacionais e segmentares das moléculas, o que permite a análise desses movimentos através dos espectros obtidos. A ressonância ocorre em moléculas ou íons paramagnéticos, na presença de um campo magnético (Carrington & McLauchlan, 1967; Wertz & Bolton, 1972).

Elétrons desemparelhados tem momento magnético de *spin* e se orientam quando submetidas a um campo magnético externo (H_0) que separa os subníveis de energia do momento magnético de *spin* eletrônico. Se a energia adequada (de ressonância) for fornecida ao sistema pode haver absorção e transição entre os subníveis energéticos, de acordo com:

$$h \cdot \nu = g \cdot \beta_e \cdot H_0 \quad (1)$$

onde h é a constante de Planck ($6,62620 \cdot 10^{-34} \text{ J s}^{-1}$), ν é a frequência da radiação incidente, g é um fator característico do elétron (próximo a 2) e β_e é o magneton de Bohr ($\beta_e = 9,27408 \cdot 10^{-28} \text{ J G}^{-1}$).

A não ser em proteínas contendo íons metálicos (como ferro e cobre) e radicais livres provenientes de reações de óxido-redução, moléculas paramagnéticas não são comuns em sistemas biológicos. A técnica de marcador de *spin* (Ohnishi & McConnell, 1965) veio solucionar esse problema, pois radicais paramagnéticos podem ser incorporados às proteínas, ácidos nucleicos e lipídios de membranas (Kosman, 1984), covalente ou fisicamente (como no caso da intercalação entre as moléculas componentes de membranas). Em membranas, a incorporação de moléculas repórter (marcadores de *spin*), permitiu a obtenção de informações estruturais e dinâmicas (movimento das moléculas) da bicamada, promovendo um grande avanço no conhecimento desses sistemas, nas últimas três décadas (Schreier *et al*, 1978).

O marcador de *spin* mais utilizado é o radical nitróxido MeSL (Figura 5) devido à sua estabilidade decorrente da presença dos grupamentos metílicos nos carbonos vizinhos ao nitrogênio. O núcleo do nitrogênio, que possui *spin* nuclear $I = 1$, gera uma interação entre os *spin* nuclear e o *spin* eletrônico (interação hiperfina) que resulta em um desdobramento da absorção em $2I+1$ ($=3$) linhas, correspondentes às três possíveis orientações do *spin* nuclear do nitrogênio ($m_I = +1, 0, -1$). Na ausência de outras interações ($\hat{H}_{\text{troca}}$ e $\hat{H}_{\text{dipolar}}$), o espectro resultante mostra três transições possíveis, separadas por A , a constante de desdobramento hiperfino. Na espectroscopia de RPE, em geral, é registrada a primeira derivada do espectro de absorção.

A Hamiltoniana de *spin*, descrevendo a energética das transições de *spin*, pode ser representada por (Carrington & McLachlan, 1967):

$$\hat{H} = \beta_e \bar{H}_0 \bar{g} \hat{S} + \hat{S} \bar{A} \hat{I} + \beta_N \bar{H}_0 \bar{g}_N \cdot I + \hat{H}_{\text{troca}} + \hat{H}_{\text{dipolar}} \quad (2)$$

onde β_e e β_N são os magnetons eletrônico e nuclear, respectivamente, $\bar{g}_N$ é o fator Zeeman de desdobramento nuclear, $\hat{S}$ é o operador do momento angular de *spin* do elétron, $\hat{I}$ é o operador de momento angular do *spin* do núcleo e $\bar{A}$ o tensor de desdobramento hiperfino. Na equação, o primeiro termo da soma representa as interações eletrônicas de Zeeman; o segundo termo as interações hiperfinas (entre *spin* eletrônico e *spin* nuclear), o terceiro termo representa a interação entre o *spin* nuclear e o campo magnético (termo nuclear de Zeeman), que é desprezível nas condições usuais de uso do marcador de *spin* em RPE (Schreier *et al.*, 1978); e os termos $\hat{H}_{\text{troca}}$ e $\hat{H}_{\text{dipolar}}$ referem-se a interações *spin* eletrônico/*spin* eletrônico, intermoleculares, que acontecem em altas concentrações de radicais ou em polirradicais, respectivamente. Como em membranas os marcadores de *spin* são incorporados em baixa concentração (1-2 mol %), as contribuições desses dois últimos termos costumam ser desprezíveis. Porém elas podem ser usadas para estudar a proximidade entre moléculas marcadas (em alta concentração),

como no caso da difusão lateral de lipídios (Devaux & McConnell, 1972; Träuble & Sackmann, 1972; Marsh & Smith, 1972) que estudaremos neste trabalho.

O desdobramento hiperfino, $\bar{A}$, e o fator $\bar{g}$ do elétron são propriedades tensoriais e, portanto, anisotrópicas dependendo da orientação da amostra em relação ao campo H_0 . Assim, os espectros de RPE dependem da orientação dos eixos principais da molécula em relação ao campo magnético externo. No caso dos radicais nitróxido, definindo um sistema de coordenadas x, y, z, em que o eixo x é a direção da ligação N-O e o eixo z corresponde à direção do orbital $2p_z$ (onde é mais provável a presença do elétron desemparelhado), esse sistema concide com a direção dos principais componentes dos tensores $\bar{g}$ e $\bar{A}$ ($\bar{g}_{xx}$, $\bar{g}_{yy}$, $\bar{g}_{zz}$ e $\bar{A}_{xx}$, $\bar{A}_{yy}$ e $\bar{A}_{zz}$, Wertz & Bolton, 1972). Para a maioria dos radicais nitróxidos, os valores de $\bar{g}$ e $\bar{A}$ (determinados dopando-se monocristais de um composto diamagnético com o marcador de *spin*) estão em torno de: $\bar{g}_{xx} \approx 2,009$, $\bar{g}_{yy} \approx 2,006$, $\bar{g}_{zz} \approx 2,002$; $\bar{A}_{xx} \approx \bar{A}_{yy} \approx 6 \text{ G}$ e $\bar{A}_{zz} \approx 32 \text{ G}$ (Griffith *et al.*, 1965; Schreier *et al.*, 1978).

Efeito da orientação molecular no espectro de RPE (parâmetro de ordem)

Os marcadores do tipo ácido doxil-esteárico orientam-se com o eixo z aproximadamente paralelo à normal da bicamada (Griffith & Jost, 1976). A anisotropia de $\bar{g}$ e $\bar{A}$ é a base do cálculo de parâmetros de ordem em membranas. O parâmetro de ordem (S), uma medida da orientação da molécula em relação ao eixo diretor (normal à bicamada) varia de 0, em sistemas isotrópicos, até 1, para uma molécula perfeitamente orientada. S reflete a amplitude angular do movimento anisotrópico da molécula. Descrevendo um movimento anisotrópico em que o eixo longo molecular do marcador de *spin* precessa rapidamente dentro de um cone orientado perpendicularmente à superfície da bicamada, define-se S por (Jost *et al.*, 1971):

$$S = \frac{1}{2}(\cos \gamma + \cos^2 \gamma) \quad (3)$$

onde γ é o ângulo do cone, dentro do qual o eixo longo molecular executa um caminho ao acaso.

Neste caso, S pode ser obtido de:

$$S = \frac{A_{//} - A_{\perp}}{A_{zz} - (A_{xx} + A_{yy})/2} \quad (4)$$

onde $A_{//}, A_{\perp}$ referem-se aos desdobramentos hiperfinos correspondentes aos marcadores orientados com seus eixos longos moleculares paralela e perpendicularmente, em relação ao campo magnético externo, respectivamente. Esses valores representam as médias do movimento em relação ao eixo longo molecular, considerando-se uma simetria cilíndrica ao redor desse eixo.

No caso dos marcadores nitróxido, cujo eixo z é paralelo ao eixo longo molecular, o espectro apresenta características importantes (extremos internos e extremos externos, $2A_{//}, 2A_{\perp}$), que podem ser usadas para determinação de $A_{//}$ e $A_{\perp}$ (Hubbel &

McConnell, 1971). A resultante é um espectro de pó, i.e. a soma dos espectros de todas as orientações possíveis, porque a partícula onde se encontra o marcador está tombando lentamente, na escala de tempo do experimento.

Se o grau de ordem na membrana é pequeno, os extremos externos não são resolvidos e o parâmetro de ordem não pode ser medido diretamente. É o que acontece com os espectros de marcadores do tipo ácido doxil esteárico quando o radical nitróxido é incorporado em carbonos mais próximos ao interior lipídico (próximos a metila terminal) e com os ésteres metílicos destes. Os metil estearatos não interagem fortemente com a interface aquosa da membrana (Ernandes *et al.*, 1977; Schreier *et al.*, 1978) por não possuírem um grupamento carregado para ancorar-se ao nível da cabeça polar dos lipídios. Pela falta de uma forte interação, o espectro mostra um baixo grau de anisotropia, o que impede tanto a medida do parâmetro de ordem, como o cálculo preciso dos tempos de correlação rotacional da molécula empregando a teoria desenvolvida para sistemas isotrópicos (Wertz & Bolton, 1972). Nesse caso pode-se usar o parâmetro empírico (h_{+1}/h_0), isto é. a razão das alturas dos picos de campo baixo, h_{+1} , e médio, h_0 , como uma medida do grau de organização da membrana, compreendendo com isso efeitos de ordem e mobilidade das moléculas na bicamada (Schreier *et al.*, 1978, 1984a). Quanto mais anisotrópico o movimento do marcador na membrana, mais alargadas as linhas espectrais e maior a diferença entre os picos de campo baixo (h_{+1}) e médio (h_0).

Monitoramento de formação de domínios por RPE

O acompanhamento da formação de domínios por RPE baseia-se na utilização consistente de parâmetros que descrevam as mudanças do perfil espectral associadas a interações de troca, isto é, entre os *spins* eletrônicos de duas moléculas paramagnéticas vizinhas. Em geral, marca-se os lipídios zwitteriônicos (Ohnishi & Ito, 1974), que são incorporados às membranas em proporções maiores que 5 mol %. A **Figura 3** mostra um espectro de troca de estados de *spin* do marcador 5-metil estearato em uma membrana composta por DOPC: DOPA: 5-MeSL 75: 10: 15, que exemplifica os espectros obtidos no estudo de domínios lipídicos.

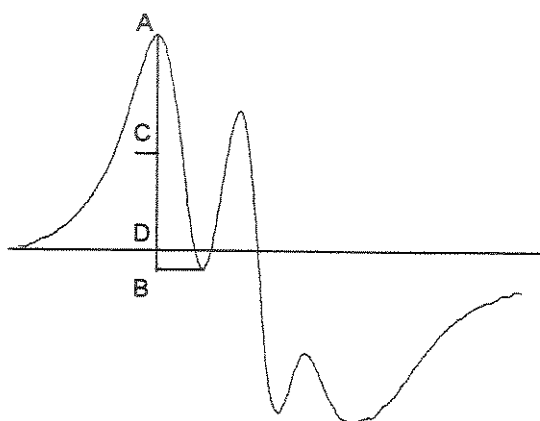


Figura 3: Espectro de "troca" de RPE com o marcador 5- MeSL, obtido de membranas compostas por membranas compostas por DOPC: POPA: 5-MeSL nas proporções molares de 75:10:15, em tampão Tris 20 mM, pH 7,4. Os pontos indicados referem-se a medidas usadas na avaliação da formação de domínios lipídicos, pelo parâmetro α .

Para quantificar as mudanças espectrais utilizamos o parâmetro α (Devaux & McConnell, 1972), definido como:

$$\alpha = 0,5 (AB/CD) \quad (5)$$

onde A , B , C , D são indicados na **Figura 3**. AB indica o comprimento do segmento de reta do ponto A ao ponto B , o mesmo valendo para CD . Tomamos o ponto D como zero, por corresponder a linha de base espectral. Note que em um espectro padronizado, dividindo-se o espectro obtido pelo valor de máxima intensidade encontrado neste (que corresponde ao valor em A), temos que $A = 1$, e C é igual a $AB / 2$ (que é o ponto médio do pico de campo baixo). Assim, o parâmetro α depende inteiramente da altura de B em um espectro padronizado.

Este parâmetro descreve o formato do espectro de ressonância e é proporcional ao maior encontro de marcadores de *spin*, como foi notado por Devaux & McConnell (1972).

Adotamos um parâmetro de formação de domínios para uma mesma concentração de marcador, α/α_0 , onde α é o valor medido no experimento e α_0 corresponde a medida de α para o controle, que normaliza os dados.

Microscopia de fluorescência

A microscopia de fluorescência baseia-se na propriedade de emissão de certos compostos quando excitados em um determinado comprimento de onda. Esta técnica, tal qual a microscopia óptica, permite identificar substâncias e estruturas, selecionando-se nesse caso, as capazes de fluorescer (White *et al.*, 1991).

Um dos maiores usos dessa técnica é no uso de anticorpos monoclonais marcados com grupamentos fluorescentes. O princípio subjacente a esta aplicação é a mesma de outros métodos que utilizam colorações: o uso de reagentes que podem revelar moléculas ou estruturas com relativa especificidade.

Esta metodologia encontra aplicação imediata no estudo de membranas, especialmente no estudo da distribuição lipídica em membranas. Pudemos acompanhar a formação de domínios induzidos por cálcio e a observação da reversão do efeito do cálcio por esta técnica, junto ao lab. do Dr. Michael Glaser, na University of Illinois at Urbana-Champaign, utilizando diferentes lipídios marcados com grupamentos NBD.

Neste trabalho, visou-se a continuidade do trabalho de microscopia de fluorescência, usando-se um processamento de imagens e estatístico.

Objetivo

O objetivo deste trabalho é o de estudar propriedades espectrofotométricas e o efeito da DBC na *formação de domínios lipídicos* induzidos por Ca^{2+} , em vesículas lipídicas e eritrócitos, utilizando:

- Absorciometria
- Medidas de Fluorescência, com marcadores membranares.
- Ressonância Paramagnética Eletrônica
- Microscopia de fluorescência digitalizada

Materiais e Métodos

Lipídios

Os lipídios usados nos diferentes experimentos foram a dioleilfosfatidilcolina (DOPC), a fosfatidilcolina de ovo (EPC) da Sigma Chem. Co.; a dioleilfosfatidilserina (DOPS), o dioleil ácido fosfatídico (DOPA) e o 1-palmitoil-2 oleil ácido fosfatídico (POPA), da Avanti Polar Lipids, Inc. Os lipídios com marcadores fluorescentes foram o 2-(12-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diol-4-il)amino) dodecanoil – 1 – hexadecanoil *sn*-glicero 3-fosfocolina (NBD-PA) ou 3-fosfoserina (NBD-PS) da Avanti Polar Lipids Inc, e 1-hexadecanoil-2-(1-pirenododecanoil)-*sn*-glicero-3-fosfocolina (PyPC) da Molecular Probes. Os marcadores de *spin* foram o 5-doxil estearato de metila (5-MeSL, mostrado na **Figura 5**) e o 7-PCSL da Sigma Chem. Co. Usou-se também colesterol no preparo de vesículas doadoras. A **Figura 6** mostra o marcador de fluorescência Hoescht 33342, usado nos experimentos de correção da fluorescência da DBC.

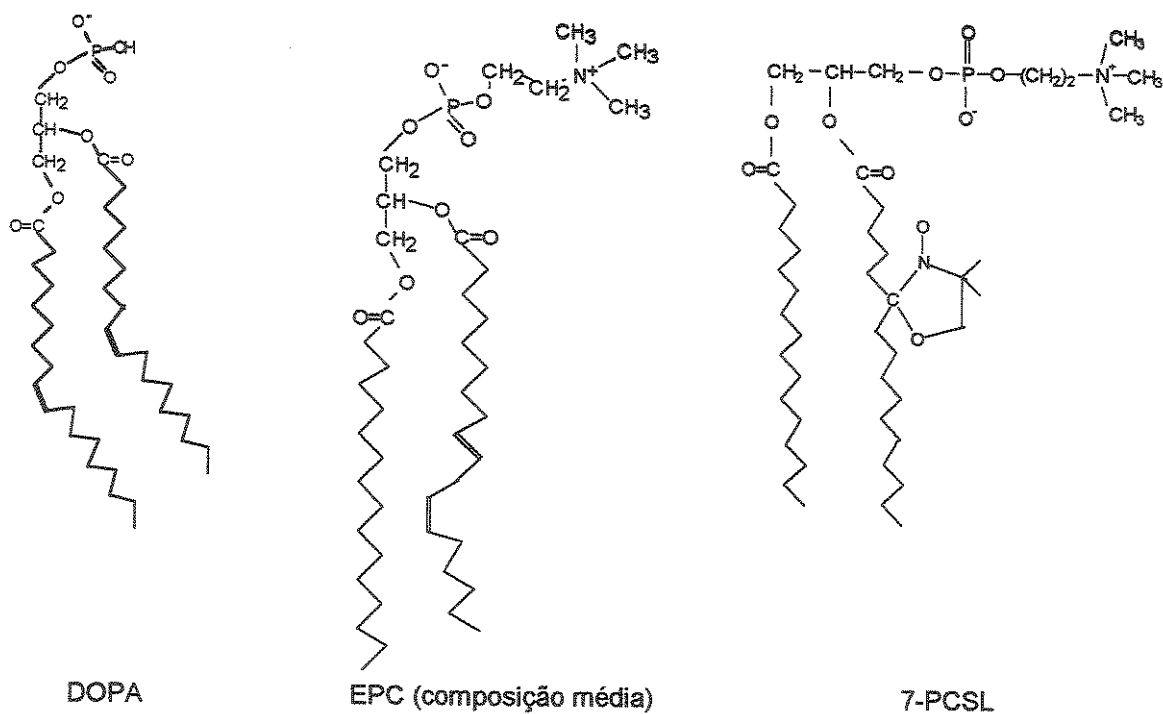


Figura 4: Estrutura de lipídios e marcadores de membrana utilizados.

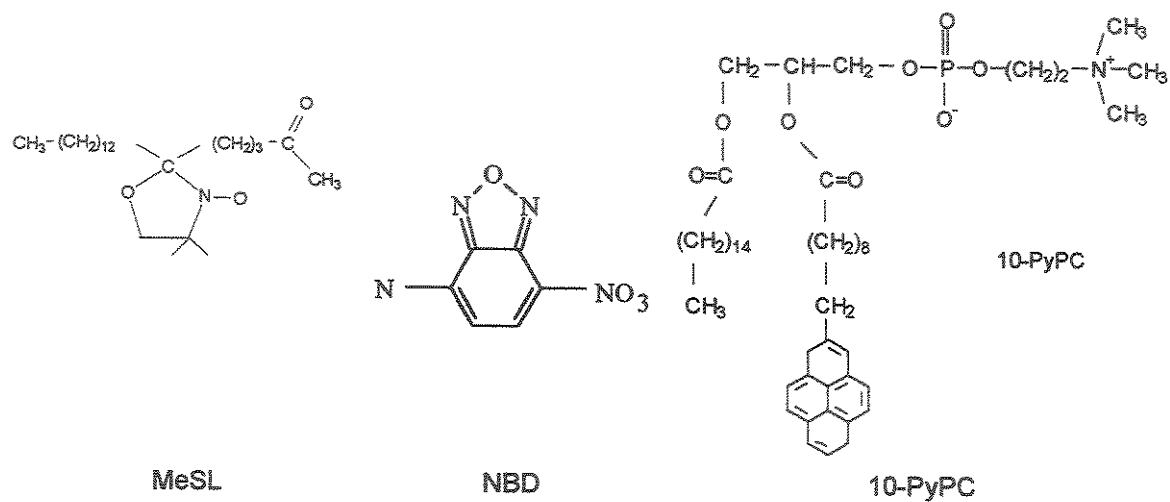


Figura 5: Estrutura do MeSL e dos marcadores de membrana.

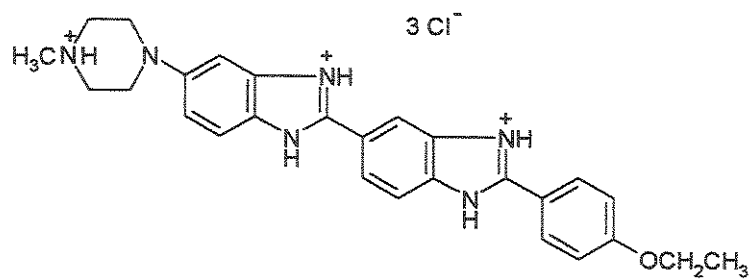


Figura 6: Estrutura do fluoróforo Hoescht 33342.

Soluções

As soluções estoque e tampões foram preparadas analiticamente, com reagentes de pureza analítica.

Os tampões usados foram o carbonato/bicarbonato 20 mM, pH 10,2 (0,02 M Na_2CO_3 e 0,02 M NaHCO_3 , na proporção 9:1), o tampão acetato 20 mM, pH 5,5 (0,02 M acetato de sódio e 0,02 M de ácido acético, na proporção 86:14), o tampão Tris 20 mM, pH 7,4, e o tampão PBS 5 mM, pH 7,4 (5 mM Na_2HPO_4 + NaCl 145 mM). Todos os pH foram ajustados com adição de HCl e/ou NaOH, com leitura concomitante do pH.

Os estoques de iodeto de sódio (NaI) 1 M e de DBC 50 mM foram conservados protegidos da luz. Todas as soluções estoque usadas em medidas de fluorescência foram preparados em água destilada.

Dosagem de lipídios

A dosagem de lipídios foi feita com as soluções estoque de lipídios e com a suspensão de lipossomos, após extrusão. O método (Rouser *et al.*, 1970) consiste no preparo de soluções-padrão de Na_2HPO_4 , contendo de 0,01 a 0,6 μmoles de PO_4^{3-} por tubo que reagem com molibdato de amônio, em meio redutor, formando fosfomolibdato, de coloração azul intensa. No ensaio os volumes das alíquotas das soluções a serem quantificadas foram calculados a partir da suposta concentração de lipídio de cada amostra para obter-se uma leitura compatível com a concentração de lipídio da curva padrão construída.

Preparou-se uma solução reagente contendo 126 mg $\text{Mo}(\text{NH}_4)_2$, 28,5 mL de água, 825 μL de H_2SO_4 concentrado e 495 mg de ácido ascórbico, dissolvido em água para concentração final de 10% de molibdênio, adicionados na ordem indicada.

Secou-se os tubos com as amostras previamente secas com N_2 em estufa por mais de duas horas, adicionando-se em seguida 50 μL de HClO_4 . A digestão seguiu-se por mais uma hora a 180°C , com os tubos fechados com bolas de gude para impedir refluxo do material.

Adicionou-se em cada tubo (branco, padrões e amostras) 900 μL da solução reagente e aqueceu-se os tubos a 45°C por mais 20 min. A absorvância das soluções de cada tubo foi medida a 795 nm em um espectrofotômetro Beckman DU-70. As concentrações das amostras foram obtidas comparando-se as respectivas leituras com a curva padrão construída por regressão linear a partir dos padrões.

Preparo de membranas

As membranas utilizadas foram as vesículas multilamelares (MLV), vesículas unilamelares pequenas (SUV), vesículas unilamelares grandes (LUV), vesículas unilamelares gigantes (GUV) e membranas de *ghosts* de eritrócitos.

Todas as membranas, com exceção de *ghosts*, foram preparadas a partir de quantidades adequadas de lipídios de estoques em clorofórmio, depositadas por evaporação sob fluxo de N₂. As amostras foram deixadas posteriormente submetidas a vácuo por pelo menos duas horas para que não houvesse clorofórmio residual.

Lipossomos do tipo MLV foram obtidos por agitação dos tubos contendo o filme lipídico no tampão escolhido por cerca de 30 seg, ou por sucessivos congelamentos, aquecimentos e agitação, à temperatura ambiente.

As **SUV** foram preparadas por sonicação, por cerca de 40 min. até que a amostra ficasse translúcida. Utilizamos o sonicador Sonics & Materials Inc. (modelo VC50, frequência 20 kHz, potência 50 W). Nessa potência, o tempo total de sonicação e o ciclo de agitação e repouso para evitar aquecimento da amostra foram determinados como sendo: 40 min e 1 min para 1 min, respectivamente. As amostras eram mantidas sob refrigeração (5°C) durante a sonicação.

Vesículas produzidas por extrusão foram obtidas passando-se amostras de MLV por filtros de 0,1 µm (Poretics) cerca de dez vezes consecutivas, para garantir o tamanho e a homogeneidade dos lipossomos. O extrusor utilizado foi da marca Lipex.

Vesículas unilamelares gigantes foram preparadas adicionando-se 250 nmoles de lipídios desejados (estocados em clorofórmio) em tubos de vidro com fundo plano com cerca de 15 x 45 mm. Após a secagem dos lipídios como descrito, colocou-se muito gentilmente 700 µL do tampão a ser usado sobre o filme de lipídio. Guardou-se a seguir o tubo fechado em repouso por 24 horas em banho-maria a 37°C. Sob esta temperatura as vesículas formadas são maiores que as obtidas à temperatura ambiente. Estas vesículas foram preparadas para microscopia confocal.

Ghosts foram obtidos de estoques congelados. Tais membranas foram preparadas a partir de suspensão de eritrócitos humanos (Dodge *et al.*, 1963), obtidos de bolsas de sangue do Hemocentro da Unicamp. A suspensão de eritrócitos foi separada em 8 tubos,

cada um contendo aproximadamente 1 mL de suspensão de hemácias. Os tubos foram completados para aproximadamente 20 mL com tampão fosfato 5 mM pH 8,0 e submetidos a centrifugação de 8000 x g por 20 min. em centrífuga Beckman J2-21. Após cada centrifugação, o sobrenadante contendo hemoglobina foi descartado e o precipitado foi novamente ressuspensão com o mesmo tampão. Repetiu-se esse procedimento até que fossem obtidas as membranas livres de hemoglobina (controle feito pela observação, a olho nu, das membranas esbranquiçadas).

Para a última centrifugação foram adicionados volumes aproximadamente iguais de tampão e água destilada para a retirada de qualquer hemoglobina contaminante que ainda não tivesse sido removido. Para a estocagem dos *ghosts*, estes foram submetidos a uma última centrifugação nas mesmas condições realizadas para a retirada dos contaminantes, utilizando-se PBS, que corresponde ao tampão utilizado nos experimentos de fluorescência. Os *ghosts* obtidos foram estocados em tubos tipo *Eppendorf* (contendo aproximadamente 1ml cada) no congelador, a -65°C.

A preparação de *ghosts* para microscopia de fluorescência foi feita a partir da lise de sangue total usando-se 10 vezes o volume inicial de Na_3PO_4 5 mM, pH 7,0 (5P7,4) a 4°C. Centrifugou-se a amostra a 10000 x g por 10 min. O precipitado foi então suspenso em Tris 10 mM contendo NaCl 150 mM livre de Ca^{+2} e Mg^{+2} (tampão TBS), a 4°C. Realizou-se uma ou duas centrifugações adicionais a 10000 x g, seguida de ressuspensão do precipitado, como anteriormente descrito. Esta solução foi então agitada, gentilmente, por cerca de 15 min. Para maior conservação da amostra, adicionou-se azida sódica para uma concentração total de 0,02 %. Tais *ghosts* também foram preparados pela lavagem de eritrócitos até que o sobrenadante estivesse claro - normalmente de 2 a 3 vezes - com TBS e então suspensos em tampão de lise (5P7,4) e agitados por 5 min. A lise e as lavagens foram feitas em banho de gelo. Em seguida, os *ghosts* são lavados em TBS e mantidos a 37°C, sob leve agitação, por cerca de 15 min, e subsequente adição de azida sódica a 0,02%.

Eritrócitos humanos foram obtidos da coleta de sangue total, conservado em solução citrato/dextrose a 20% no volume final, seguido de imediata agitação. O sangue foi centrifugado a 160 x g por 15 min., e em seguida ressuspensão em solução citrato/

dextrose a 20% no volume final. Foi adicionada azida sódica (0,02% concentração final) para conservação de amostras por mais de 1 dia.

Marcação de eritrócitos

A marcação de eritrócitos para microscopia confocal foi feita incubando-se em banho a 37°C uma suspensão de hematócrito 10% com o marcador para que este tivesse a concentração final de 2 mol% em relação a membrana, por períodos de 30, 60 e 90 min, sob agitação branda. Cada alíquota foi então levada diretamente para ser observada ao microscópio, em uma lâmina com 5 µL de amostra.

Os eritrócitos e *ghosts* usados em microscopia de fluorescência foram marcados com lipídios fluorescentes por transferência monomérica de vesículas doadoras preparadas por injeção etanólica: vesículas unilamelares pequenas foram preparadas por meio de injeção etanólica. Os lipídios, em clorofórmio, foram primeiramente secos em um tubo de vidro sob N₂ a 25°C, seguido de 1,5 horas em vácuo, para remover-se traços do solvente. Os lipídios foram suspendidos em cerca de 15 µL de etanol, seguidos de injeção em 0,5-2,0 mL de TBS, sob agitação rápida, com auxílio de uma pipeta Pasteur. A concentração final de lipídio foi de cerca de 1 mM. As vesículas doadoras tinham uma composição de lipídio:colesterol de 10:9, onde o lipídio marcado correspondia a uma fração de 20 a 35% do lipídio total, sendo a fração restante composta por DOPC.

Para eritrócitos intactos, as células foram lavadas com TBS por duas vezes e suspendidas a um hematócrito de 3%. Ghosts foram suspendidos em 10 vezes o volume do respectivo precipitado em TBS. Adicionou-se 0,4 nM de lipídio por 100 µL de suspensão de eritrócito/ghost e a amostra foi protegida da luz e agitada por cerca de 20 min.. Após esta etapa a amostra foi lavada três vezes com TBS. Todas as lavagens foram feitas em banho de gelo.

Microscopia de fluorescência e processamento de imagens

O microscópio usado foi um Leitz Orthoplan de fluorescência epiluminescente com sistema ótico de quartzo. A fonte de luz era de xenônio e o detector era um CCD ITT-Fairchild com resolução de 580 x 330 pixels. O sistema era acoplado a um microcomputador MacIntosh pertencente ao Lab. 312 RAL do Departamento de Bioquímica da University de Illinois em Urbana, IL, Estados Unidos³.

A excitação foi feita entre 420 e 460 nm com um sistema de filtros Leitz G, com um filtro 'cutoff' 3-72 ou 3-73 Corning no caminho óptico de excitação.

A excitação dos NBD covalentemente ligados aos fosfolipídios foi feita entre 420 e 460 nm, com um sistema de filtros Leitz G, com um filtro 'cutoff' 3-72 ou 3-73 (Corning) no caminho óptico de excitação.

A subtração do sinal do fundo foi feita a partir de uma região na lâmina que não contivesse fluorescência visível.

Através do *Scion Image*, diminuímos o ruído da imagem pelo uso de um filtro (*Median*) que atribuía a um determinado *pixel* o valor da mediana dos seus nove *pixels* vizinhos. Em seguida, medimos a área e intensidade média de cada "célula" para normalizar a intensidade média para 100 ± 4 . Estabelecemos um limiar de 150 em diante para definirmos regiões de domínios lipídicos.

A **Figura 7** mostra imagens de microscopia de fluorescência, processamento e a identificação de domínios lipídicos.

³ Pertencente ao grupo do Dr. Michael Glaser.

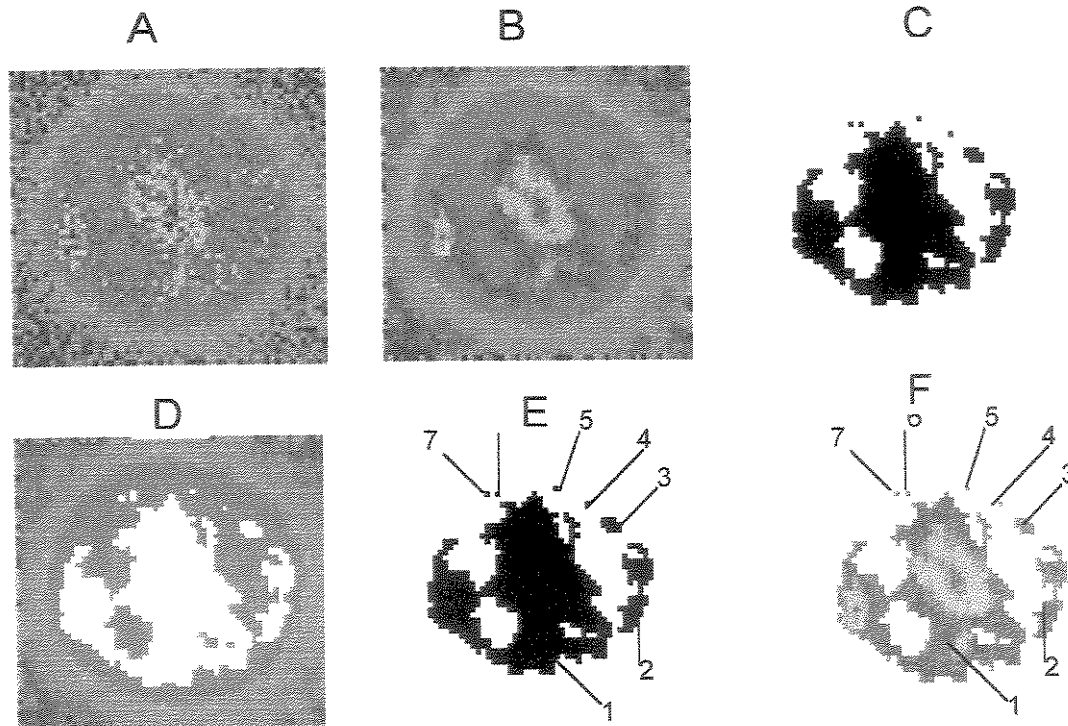


Figura 7: Processamento de imagens de eritrócito marcado com NBD antes (A) e após tratamento com filtro *Median* (B). Em C, filtro selecionando *pixels* da imagem B de intensidade acima de 150, e em D região selecionada C correspondente a estes pixels (em branco). As imagens E e F mostram os domínios identificados após o processamento em P&B e em pseudocoloração, respectivamente.

Os parâmetros medidos e suas definições são mostrados na **Tabela 2**.

Tabela 2: Parâmetros utilizados na análise de imagens de 'células' e de domínios lipídicos obtidos microscopia de fluorescência.

Parâmetro	Definição
Número de domínios	Número de domínios presentes em uma mesma 'célula'
Área da célula	Área de toda a 'célula' em <i>pixels</i>
SD	Desvio padrão da intensidade dos <i>pixels</i> de toda a célula
Enriquecimento	Intensidade total em domínios/Intensidade total da célula
Intensidade máxima	Intensidade máxima de um <i>pixel</i> média dos domínios em uma mesma célula
Perímetro	Perímetro médio dos domínios em uma mesma célula
SDMedioDomCel	Desvio padrão da intensidade médio dos domínios em uma mesma 'célula'
MediaMediaDomCel	Média da intensidade média dos domínios em uma mesma 'célula'
MediaAreaDomCel	Área média dos domínios em uma mesma 'célula'
MediaAreaRelativa	Média da área relativa (área em domínio/área da 'célula') média dos domínios em uma mesma 'célula'
AreaRelativaTotal	Área total em domínios/Área total da célula

Para comparar conjuntos de dados de diferentes tratamentos, fizemos o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, uma vez que nenhum dos conjuntos obedecia uma distribuição normal.

Preparo de lâminas

As amostras para microscopia de fluorescência foram preparadas pipetando-se 5 μL da suspensão de membranas sobre a lâmina, seguindo-se a adição de 5 μL de solução de agarose 0,25% e cobrindo-se rapidamente com a lamínula. Sobre a lamínula colocou-se uma gota de glicerol para observação em objetiva de 100 vezes.

Medidas de espectrofotometria

As medidas de fotometria foram realizadas em um espectrofotômetro Hitashi U-2010, entre 280 e 360 nm ou DU-70, da Beckman. Foram utilizadas cubetas convencionais, com 1 cm de caminho óptico.

Medidas de fluorescência

As leituras de fluorescência foram feitas em um espectrofluorímetro Hitashi F-4500. As amostras foram excitadas a 324 nm, e a leitura de emissão foi realizada de 360 a 600 nm, com abertura de fendas de excitação e de emissão de 5 nm. Todos os espectros foram automaticamente corrigidos pelo fluorímetro. A voltagem utilizada foi de 400V, exceto quando indicado. Os intervalos de leitura foram de 0,2 nm e em geral com velocidade de 1200 nm por minuto.

As cubetas eram lavadas em solução sulfonítrica (HNO_3 : H_2SO_4 1:1), e durante as leituras, as cubetas eram lavadas exaustivamente com água, etanol e clorofórmio do solvente mais polar ao menos polar e voltando-se à água.

Usamos cubetas convencionais de 1 cm de caminho óptico e também testamos cubetas triangulares, com ângulos de 45° para reduzir o efeito da dispersão de luz sobre a amostra. Estas últimas apresentaram problemas de interferência na leitura e de redução significativa da intensidade de fluorescência. Todas as medidas de fluorescência aqui relatadas referem-se, portanto, a medidas feitas com as cubetas convencionais, quadradas.

As adições de DBC para dada condição foram feitas em uma mesma cubeta. Medidas em que as adições superaram em mais de 1,2% ao volume da solução contida na cubeta sofreram correções de diluição correspondentes às adições extras, em todos os principais solutos.

As amostras de DBC incubadas com Nal em pH básico para medidas de supressão por este agente foram lidas em cerca de 1, 3, 5 min. (até 10 min. em alguns casos) para garantir-se a leitura em situação de equilíbrio químico.

Medidas fluorimétricas da DBC em diferentes constantes dielétricas

Medimos a fluorescência da DBC 20 μM em soluções de dioxano e tampão carbonato (0,02M, pH 10,5), nas concentrações de 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 e 80% dioxano/tampão v/v. A partir de uma tabela contendo concentrações de dioxano em água e respectivas densidades, converteu-se as concentrações em v/v para m/m, tomando-se a densidade do tampão igual a da água ($d = 1\text{g/mL}$).

Conhecendo-se a constante dielétrica da misturas de dioxano/água m/m (Harned & Owen, 1958, Desai *et al.*, 1994), construiu-se uma curva-padrão relacionando-se λ_{em} da DBC com a constante dielétrica da respectiva solução de dioxano em que a DBC foi colocada. A constante dielétrica do ambiente ocupado pela DBC na membrana foi obtida conhecendo-se o λ de máxima emissão da DBC particionada na membrana. Obtém-se a respectiva constante dielétrica a partir da curva-padrão construída como na **Figura 28**.

Medidas de RPE

O espectrômetro usado foi um Bruker ER-200D-SRC (Banda X), numa frequência de incidência de 9,68 GHz, com o campo centrado em 3440 Gauss e varrendo-o de ± 50 Gauss. As medidas foram feitas a 22°C, no laboratório da Profª Shirley Schreier (Departamento de Bioquímica, Instituto de Química / USP, São Paulo).

A perturbação da membrana foi calculada a partir da seguinte fórmula:

$$\text{Efeito} = \frac{(h+1/h_0)_{\text{amostra}} - (h+1/h_0)_{\text{controle}}}{(h+1/h_0)_{\text{controle}}} \cdot 100 \% \quad (6)$$

onde h_1 e h_0 correspondem às diferenças de altura entre o primeiro pico e o primeiro vale e o segundo pico e o segundo vale, respectivamente, como mostrado na **Figura 8**.

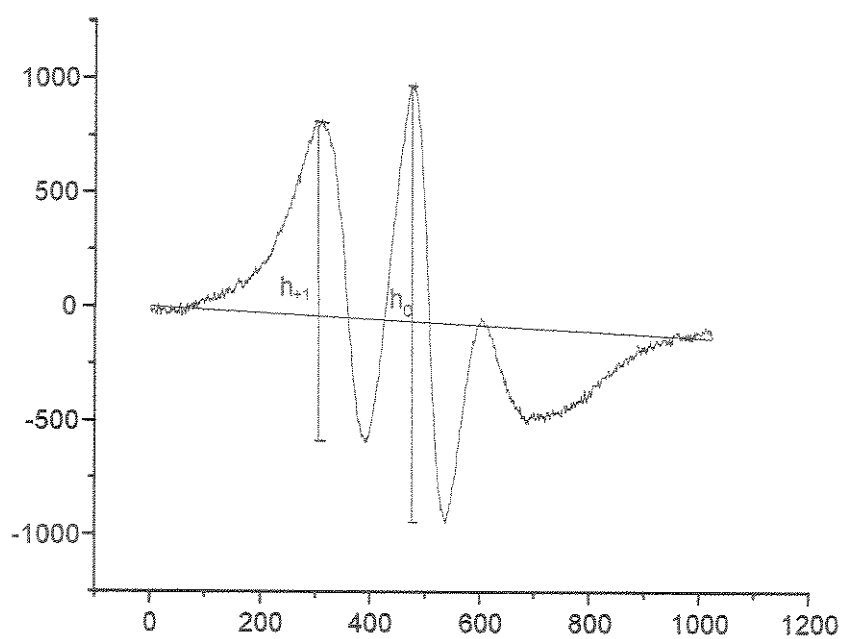


Figura 8: Espectro de RPE do marcador 5-MeSL em lipossomas compostos por EPC:DOPA:5-MeSL na razão molar de 75: 10: 15.

Processamento dos espectros de fluorescência

Os espectros registrados eram gravados em arquivos no formato ASCII para serem utilizados nos diferentes programas para tratamento dos dados.

O processamento destes espectros foi feito no programa Origin 6.0, 5.0 ou 4.1, onde realizou-se subtração de controles, redução de ruídos tirando-se a média de 30 pontos vizinhos, integração de picos e ajuste de equações aos dados obtidos.

Os espectros da DBC foram ajustados à uma curva log-normal (Ladokhin & Holloway, 1995; Burstein & Emelyanenko, 1996), que permite aferição acurada dos parâmetros espectrais dada pela fórmula:

$$I_{\text{máx}} \exp \{-\ln 2 [\ln(\rho)^{-2}] [\ln(1 + (\lambda - \lambda_{\text{máx}})(\rho^2 - 1)(\rho\Gamma)^{-1})]^2\} \quad (7)$$

onde $I_{\text{máx}}$ é a intensidade no comprimento de onda de emissão máxima ($\lambda_{\text{máx}}$), Γ é a largura do espectro a meia altura de $I_{\text{máx}}$, e ρ é o parâmetro de assimetria do espectro.

Em alguns casos, fizemos a transformação da escala de comprimento de onda (λ) para a de número de onda (Ψ), tomando-se o recíproco de λ na abcissa e multiplicando-se a intensidade $I(\lambda)$ por λ^2 para calcular-se $I(\Psi)$ (Lakowicz, 1983).

Procuramos também minimizar interferências do espalhamento de luz através do uso de polarizador no ângulo mágico e emprego da função empírica (Lakowicz, 1983) para correção (equação 7):

$$I_{\text{corr}} \approx I_{\text{obs}} \text{ antilog } [1/2(OD_{\text{ex}} + OD_{\text{em}})] \quad (8),$$

onde OD_{ex} e OD_{em} são as densidades ópticas no λ de excitação e no λ de emissão respectivamente enquanto I_{corr} e I_{obs} correspondem às intensidades de fluorescência corrigida e observada, respectivamente.

Outra forma de correção testada é o método de diluições sucessivas (Eisinger & Flores, 1985). Basicamente exige como pressuposto que a fração de intensidade perdida é proporcional a concentração de partículas espalhadoras e/ou absorventes de luz e ao caminho óptico dz , como mostrado abaixo:

$$dI/I = - (\alpha_a + \alpha_s) h dz \quad (9)$$

Integrando-se a **Equação 9**, temos:

$$I(z) = I_{ex} \exp [(-\alpha_a - \alpha_s) h z] \quad (10)$$

No nosso caso, a diluição foi feita adicionando-se volumes de uma solução concentrada de membrana a uma solução inicial de fluoróforo. Após a correção da diluição da amostra inicial sem considerar-se efeitos de turbidez, a expressão final torna-se:

$$\ln I = \ln J - \alpha h \quad (11)$$

onde J é uma constante e α é um coeficiente de atenuação para perdas de absorção e espalhamento.

Tratamento dos dados de fluorescência

As constantes de ligação foram obtidas diretamente da **Equação 12**:

$$I = \frac{I_0 + I_{\text{máx}} \times K_b \times [\text{DOPC}]}{1 + K_b \times [\text{DOPC}]} \quad (12)$$

onde I , I_0 e $I_{\text{máx}}$ correspondem a intensidade de fluorescência observada, da DBC em tampão e da DBC totalmente particionada para a membrana, respectivamente, $[\text{DOPC}]$ é a concentração de DOPC correspondente a I e K_b à constante de ligação da DBC à membrana de DOPC, pelo ajuste por regressão não-linear (método de Levenberg-Marquadt) executada pelo programa *Mathematica* 3.0. O desenvolvimento algébrico de várias equações também foi realizado neste software.

As propriedades do anestésico incorporado à membrana foram obtidas extrapolando-se as funções de ajuste utilizadas para concentrações teóricas de infinitos molares de membrana também no *Mathematica*. Outros parâmetros foram obtidos no Origin 6.0, 5.0 ou 4.1.

Interconversão de valores de constante de ligação e de partição

Para comparar valores de K_b da DBC com outros valores de literatura, precisamos convertê-lo para o coeficiente de partição P , que pode ser determinado pela seguinte equação:

$$P = \frac{n_m(s)/V_m}{n_w(s)/V_w} \quad (13)$$

onde s corresponde ao soluto, n é o número de moles do soluto, V é o volume e os índices m e w correspondem à fase membrana e aquosa, respectivamente.

K_b (M^{-1}) é uma medida de ligação onde a membrana é tratada como uma macromolécula contendo sítios onde o soluto irá ligar-se:

$$K_b = \frac{[sm]}{[s][m]} \quad (14)$$

onde m e sm correspondem a membrana e ao soluto ligado à membrana, respectivamente. A constante de ligação (K_b) e o coeficiente de partição (P) são relacionados através do volume molar parcial, $\bar{V}$ (L/mol) da fase lipídica (Bianconi & Schreier, 1991; de Paula & Schreier, 1996).

$$K_b = P \cdot \bar{V} \quad (15)$$

Tabela 3: Volume molar parcial ($\bar{V}$) dos principais lipídios usados neste trabalho.

Lipídio	$\bar{V}$ (L/mol)
DOPC	0,786
DOPA	0,701
POPA	0,696
NBD-PC	0,856
5-MeSL	0,399

Resultados e Discussão

Espectrofotometria

A **Figura 9** mostra-nos o comportamento óptico da forma protonada da DBC. Nesta série de espectros da DBC em pH 5,5, pode ser percebido um perfil de absorção bem estruturado, mostrando que há mais de uma transição no anel quinolínico. O comprimento de onda para o qual a absorção de luz é máxima mantém-se constante em 325,6 nm com o aumento da concentração de DBC.

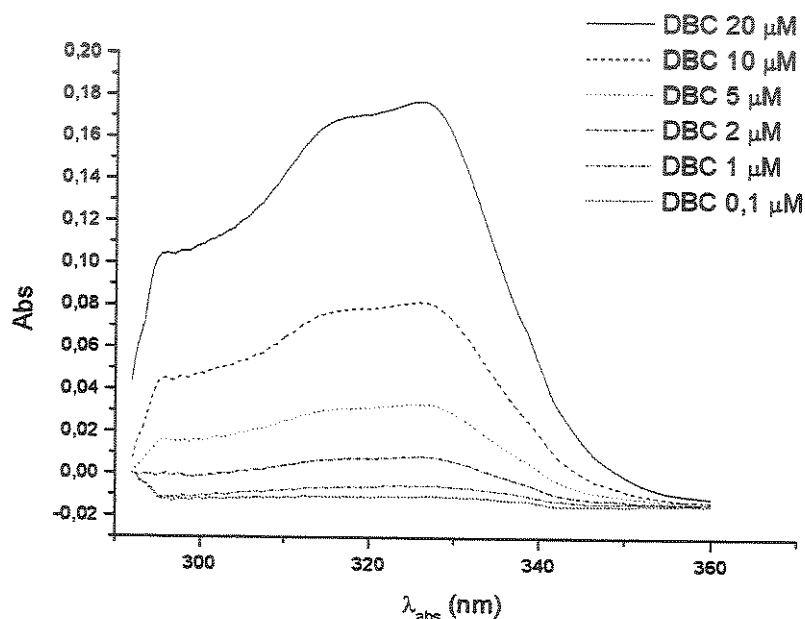


Figura 9: Espectros de absorção da DBC protonada (0,1 a 20 μM). Tampão acetato 20 mM, pH 5,5.

O gráfico de absorvância a 325,6 nm versus a concentração de DBC, de onde podemos obter o coeficiente de extinção, é mostrado na **Figura 10**.

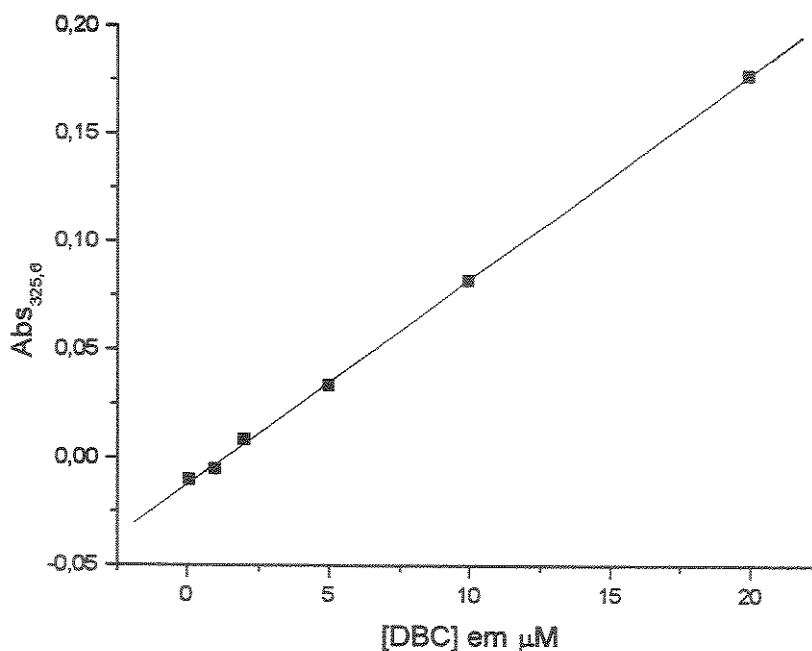


Figura 10: Determinação do coeficiente de extinção molar da DBC protonada. Variação da absorvância a 325,6 nm, com diferentes concentrações de DBC. Tampão acetato 20 mM, pH 5,5.

A partir da **Figura 10** encontramos um coeficiente de extinção igual a $9470 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para a DBC⁺, próximo ao descrito por He & Nicholls (1993), i.e., $7800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ em 330 nm.

Experimentos semelhantes, conduzidos em tampão borato 20 mM pH 10,2 revelaram um coeficiente de extinção para a DBC neutra de $(4,16 \pm 0,60) 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, bastante comparável ao valor encontrado por Vanderkooi (1986), de $4400 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ em 326 nm.

Fluorescência

As medidas de fluorescência visaram conduzir-nos à compreensão mais clara da ligação, conformação, posição das formas de DBC e organização de lipídios marcados com grupamentos fluoróforos em membranas. Tal caracterização é fundamental para o entendimento detalhado da ligação da DBC a membranas compostas por lipídios zwitteriônicos e por misturas destes com lipídios aniônicos e, conseqüentemente, para levar a compreensão dos mecanismos de competição de DBC com o cálcio e de ação da DBC sobre a microheterogeneidade de membranas artificiais e biológicas.

Fluorescência em tampão

Inicialmente caracterizamos a fluorescência da DBC em meio ácido (pH 5,5), básico (pH 10,2) e fisiológico, onde temos, respectivamente grande prevalência da forma protonada, grande prevalência da forma neutra, e a mistura de ambas as formas. A **Figura 11** mostra-nos o espectro de emissão de amostras de DBC 20 μ M excitadas a 324 nm nestes diferentes pH.

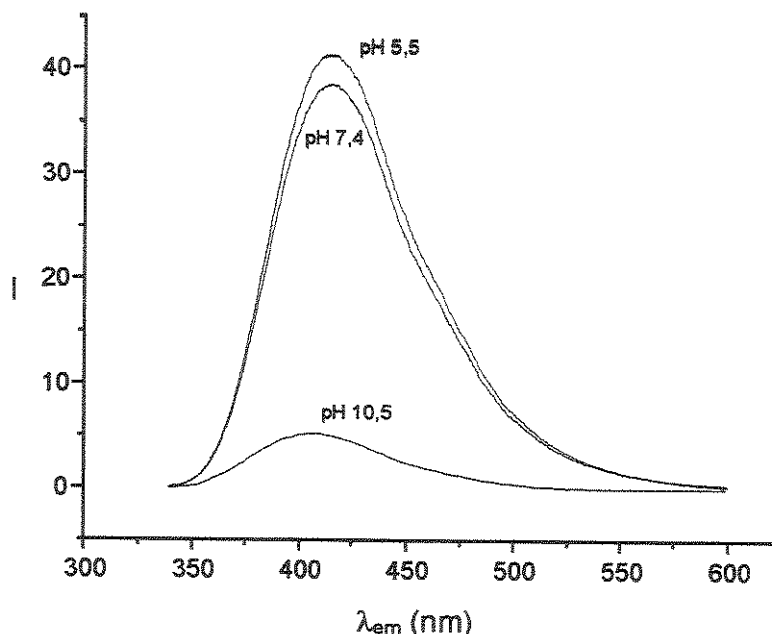


Figura 11: Espectros de emissão da DBC 20 μ M em pH 5,5 (tampão acetato 20 mM), 7,4 (tampão Tris 20 mM) e 10,2 (tampão carbonato 20 mM). Excitação em 324 nm.

Verificamos aqui a maior intensidade de emissão para a DBC na forma protonada, em relação a DBC neutra, de acordo com observações anteriores, relatadas na literatura (Louro, 1994a). Também o comprimento de onda de máxima emissão da DBC varia com a protonação, sendo maior para a forma protonada. A fluorescência da DBC a pH 7,4 é intermediária, condizente com a coexistência das formas de protonação de DBC e prevalência da forma protonada neste pH.

Medimos a seguir a intensidade molar da DBC nestes diferentes pH. A intensidade molar foi determinada em unidades arbitrárias, mas de forma consistente para todas as observações.

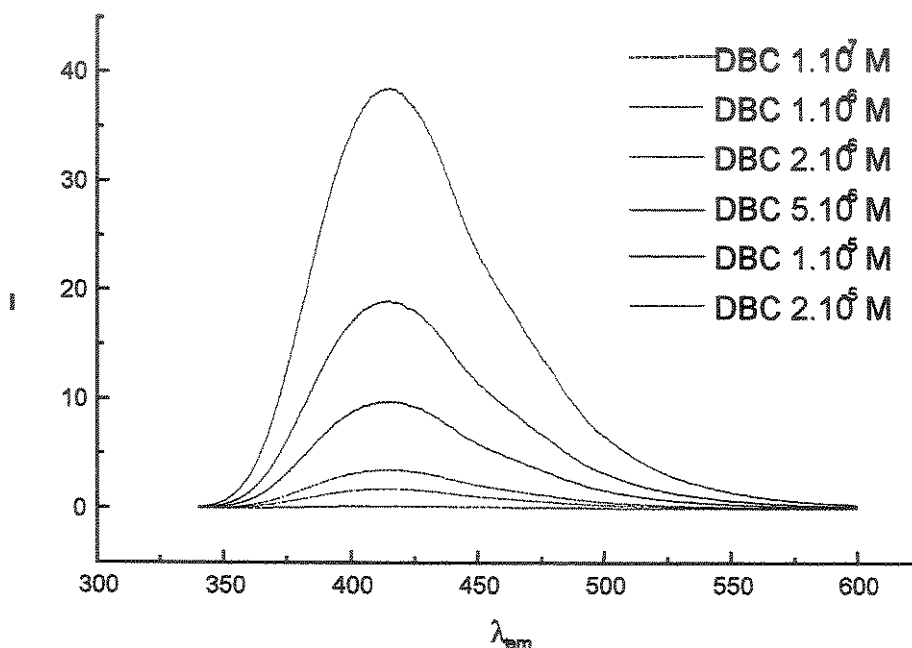


Figura 12: Espectros de fluorescência de soluções de DBC em concentrações crescentes. Tampão Tris 20 mM a pH 7,4. Excitação em 324 nm.

A **Figura 12** mostra, como exemplo, o espectro de fluorescência em pH 7,4 em concentrações crescentes de DBC. Nota-se que o comprimento de onda de máxima emissão ($\lambda_{m\acute{a}x}$) manteve-se estável com a concentração, sendo um indício de que a DBC,

se inicialmente apresenta-se como um monômero⁴ em solução, permanece desta mesma forma dentro de toda esta faixa de concentração. Resultados semelhantes foram obtidos em pH 5,5 e 10,2.

Para obter com precisão parâmetros como intensidade e $\lambda_{\text{máx}}$, processamos os espectros a fim de limpar os ruídos, que atrapalhavam especialmente as medidas de $\lambda_{\text{máx}}$. Utilizamos o processo de *smoothing* de espectros, baseado na avaliação de valores para um determinado valor no eixo x (no caso, comprimento de onda) levando-se em conta uma vizinhança de n pontos. A escolha de n é empírica.

A avaliação é feita de forma a eliminar-se o máximo de ruído do espectro sem subtrair informação contida neste, i. e., o resíduo deve ter a maior amplitude possível sem deixar de estar aleatoriamente distribuído em torno do valor zero. Percebemos este caráter até valores de $n = 30$, onde a variação dos pontos é máxima dentro desta faixa. Ao utilizarmos o valor de $n = 50$, aumentamos a faixa de variação, mas já percebemos um comportamento não-aleatório subjacente ao ruído, o que significa perda de informações reais, ao usar-se este n . Adotamos desta forma o valor de $n = 30$ para o processamento dos espectros obtidos.

Após este processamento, obtivemos a intensidade máxima do pico, que acompanha com grande proximidade a área de integração do pico, quando multiplicado por uma constante de proporcionalidade (no aumento da concentração de DBC em tampão PBS 5 mM, a pH 7,4, obtivemos valores de proporcionalidade de $87,06 \pm 0,04$, com $R = 1$, a partir da regressão linear com o coeficiente linear igualado a zero, sem corrigirmos o espectro). Utilizamos ao longo do trabalho valores de intensidade máxima, ao invés da área de integração.

A seguir, medimos a intensidade molar relativa a partir da inclinação de regressão linear feita em cada um dos três pH.

⁴ Essa observação refere-se à proposição de Wakita *et al.* (1992) de que a DBC formaria dímeros em solução ou na interação com membranas de fosfatidilcolina de ovo. A DBC protonada forma micelas a partir de 10,7 mM (Malheiros *et al.*, 2000) i.e., nas concentrações aqui estudadas esperaríamos mesmo encontrar apenas monômeros.

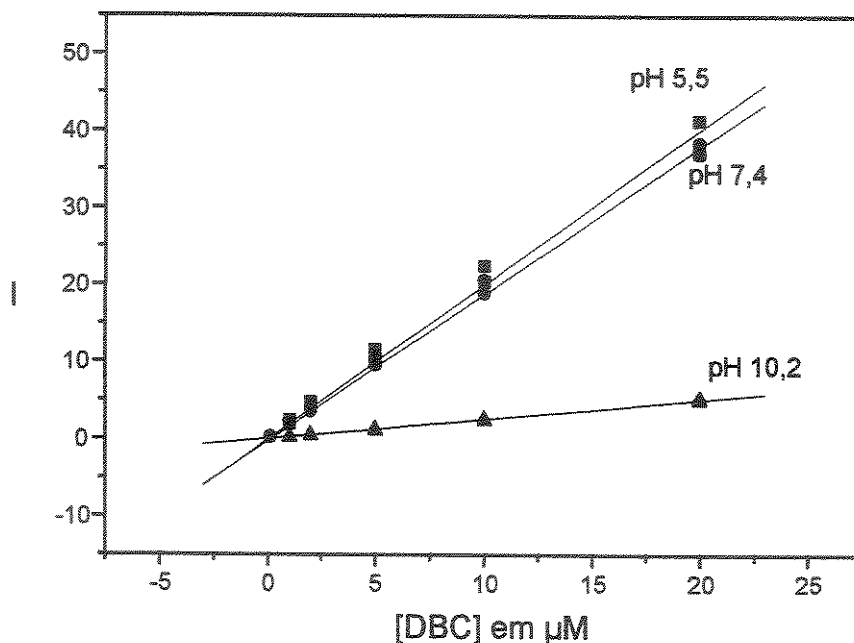


Figura 13: Variação da intensidade de fluorescência com a concentração de DBC variando de 1 a 20 μM , em pH 5,5 (quadrado), 7,4 (círculo) e 10,2 (triângulo). As linhas são obtidas a partir da regressão linear dos valores experimentais.

Os valores das inclinações para a DBC nos tampões usados a pH 5,5, 7,4 e 10,2 correspondem a intensidade, em unidades arbitrárias, em 1 M de DBC nos respectivos pH, e são mostrados na **Tabela 4**. Note que a forma protonada de DBC tem intensidade molar oito vezes maior que o da forma neutra, como também observado por Louro *et al.* (1994a). De acordo com a Equação de Henderson-Hasselbach, as concentrações das formas neutra e protonada são dadas por:

$$\text{pH} = \text{pK}_a + \log [\text{DBC}] [\text{DBC}^+]^{-1} \quad (16)$$

A intensidade molar da forma protonada é visivelmente maior (8x) que a DBC na forma neutra, como também observado por outros autores (Vanderkooi, 1984; Louro *et al.*, 1993). Entende-se que a transferência de carga de um elétron não ligante do N da amina

terciária para o anel quinolínico no estado excitado da DBC seja responsável pelas diferenças de emissão da forma protonada e neutra (Lin *et al.*, 1988).

Dentro de toda esta faixa de concentração, o comportamento da intensidade de fluorescência da DBC é linear com o aumento de sua concentração, indicando também a inexistência de formas exciméricas em solução, neste intervalo. O $\lambda_{\max}$ para os pH 5,5, 7,4 e 10,2 são também mostrados na **Tabela 4**.

Tabela 4: Características fluorimétricas de DBC 20 μM em diferentes tampões.

Tampão	Intensidade molar (10^3 M^{-1})	$\lambda_{\max}$ (nm)	DBC ⁺ : DBC ⁰
Acetato 20 mM, pH 5,5	2008 ± 44	$414,70 \pm 0,25$	794: 1
Tris 20 mM, pH 7,4	1907 ± 17	$414,65 \pm 0,22$	10: 1
Carbonato 20 mM, pH 10,2	$251,3 \pm 2,3$	$407,19 \pm 0,69$	1: 63

A intensidade de cada espectro de DBC em pH 7,4, assim como nos demais pH, é proporcional à respectiva concentração de DBC (**Figura 13**).

Em termos de absorção, isso significa que a Lei de Lambert-Beer aplica-se nesta faixa de concentração. Este comportamento também revela que a soma das contribuições das formas de DBC presentes em solução ao espectro de fluorescência é proporcional à concentração de DBC total em solução.

Determinação do pK_a

Usando as diferentes intensidades molares da fluorescência da DBC protonada e neutra, determinamos o pK_a da DBC pela variação da intensidade de fluorescência, com o pH, conforme gráfico abaixo:

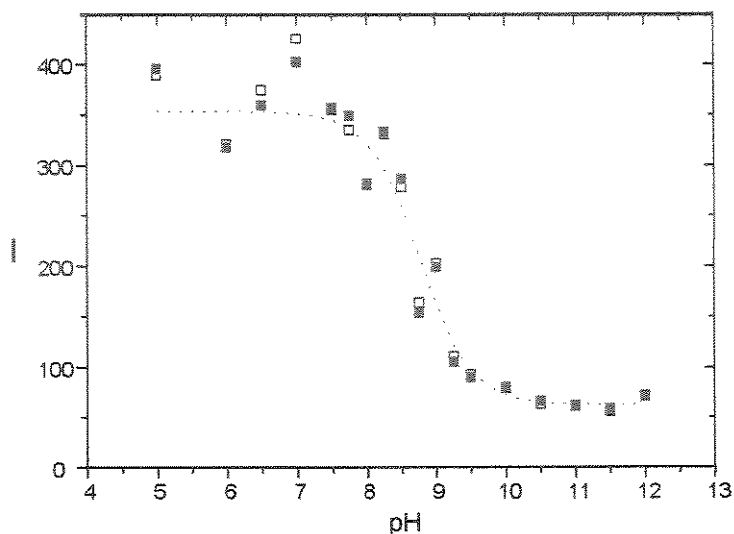


Figura 14: Curva de titulação de DBC, representada pela intensidade de fluorescência da DBC em soluções aquosas com diferentes pH, ajustados com HCl ou NaOH. Excitação a 324 nm.

O valor de pK_a determinado para a DBC foi de 8,4 (**Figura 14**), indicando que em água, a pH fisiológico - 7,4 - prevalece a forma carregada do AL. Na literatura encontramos valores diferentes de pK_a como: 8,3 (Agin *et al.*, 1965), 8,8 (Eftink *et al.*, 1985; Van Osdol *et al.*, 1992), 7,5 (Kuroda & Fujiwara, 1987) e 9,1 (Louro *et al.*, 1994a).

Supressão da fluorescência da Dibucaína

Para investigarmos a localização da DBC e seus possíveis sítios na membrana, estudamos a supressão da fluorescência da DBC em solução por iodeto. A **Figura 15** mostra os espectros de emissão de fluorescência de DBC em concentrações crescentes de NaI a pH 5,5.

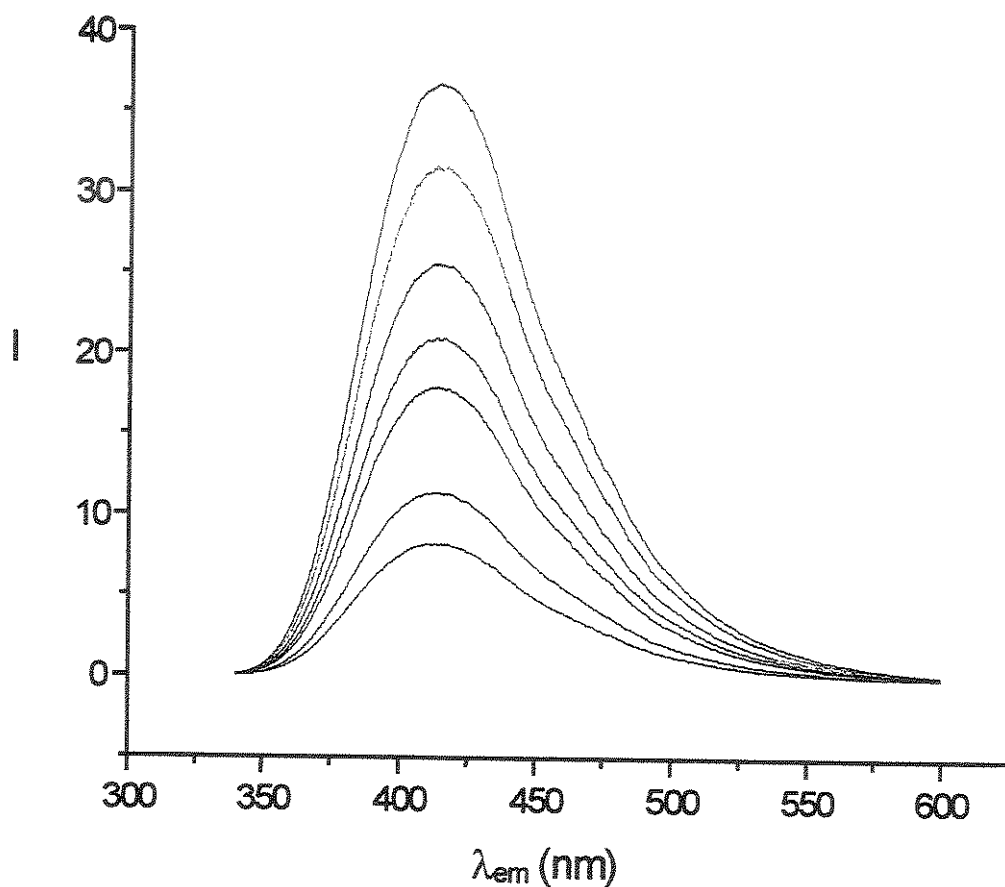


Figura 15: Espectros de DBC protonada (20 μM) em concentrações crescentes de NaI. Do espectro maior para o menor, as concentrações de NaI usadas foram de 0; 2,5; 5; 10; 15; 20; 30 e 40 mM. Tampão acetato 20 mM, pH 5,5.

O $\lambda_{\text{máx}}$ na presença de diversas concentrações de NaI é de $414,0 \pm 0,2$ nm, que é bem próximo do $\lambda_{\text{máx}}$ da DBC no mesmo tampão acetato 20 mM na ausência de NaI. O gráfico da **Figura 16** mostra o comportamento das intensidades de fluorescência da DBC

em presença de concentrações de NaI nos diferentes pH, já se descontando as diluições resultantes das adições de NaI.

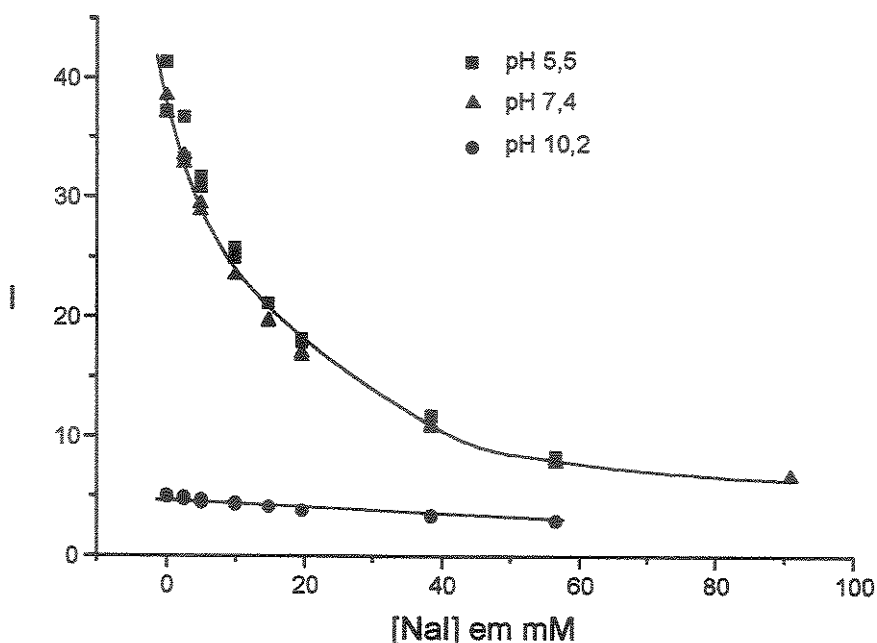


Figura 16: Variação da Intensidade de fluorescência da DBC (20 μ M) na presença de NaI. Tampão acetato 20, mM pH 5,5 (quadrado), tampão Tris 20 mM pH 7,4 (triângulo) e tampão carbonato 20 mM pH 10,2 (círculo).

Na **Figura 16** é aparente uma maior eficiência de supressão do iodeto sobre a fluorescência da DBC nos tampões acetato 20 mM pH 5,5 e Tris 20 mM pH 7,4, apesar das diferenças de intensidade molar da DBC nos diferentes tampões usados. Nos três casos consegue-se alcançar uma saturação em concentrações de iodeto menores que 100 mM. Para obter a constante de Stern-Vomer, K_{sv} , que é a constante relativa a supressão de fluorescência por determinado agente, fizemos um gráfico recíproco ao da **Figura 16**, mostrado a seguir.

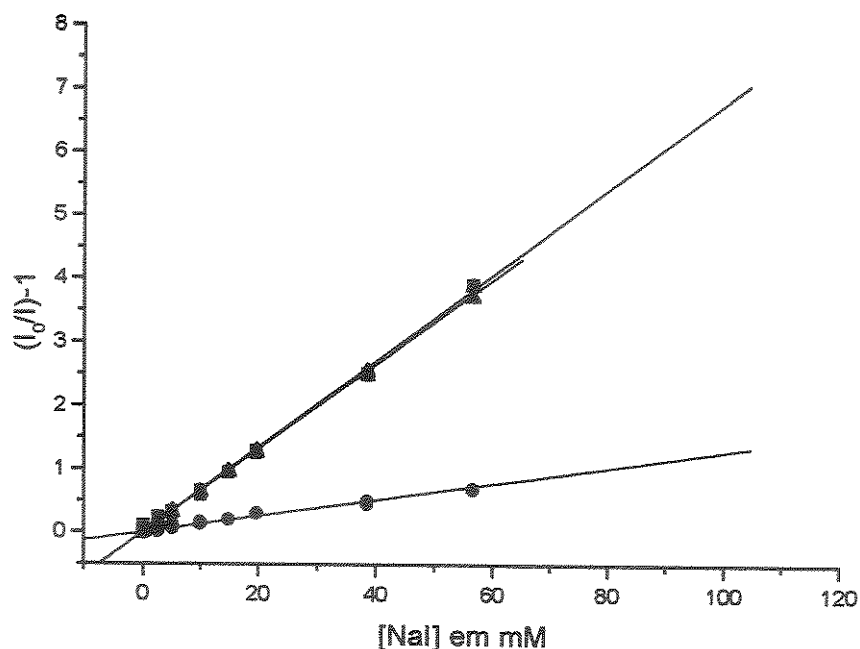


Figura 17: Supressão da fluorescência da DBC por Nal em pH 5,5 (quadrado), pH 7,4 (triângulo) e pH 10,2 (círculo); I_0 (I) refere-se a emissão de DBC em ausência (presença) de iodeto.

Os valores de K_{SV} , obtidos da inclinação das retas, são apresentados na **Tabela 5**.

Tabela 5: Constantes de Stern-Volmer (K_{SV}) para a a supressão do NAI sobre a DBC em diferentes pH.

Tampão	$K_{SV} (M^{-1})$
Acetato 20 mM (pH 5,5)	$67,68 \pm 0,64$
Tris 20 mM (pH 7,4)	$60,37 \pm 0,17$
Carbonato 20 mM (pH 10,2)	$12,92 \pm 0,35$

Na **Tabela 5** torna-se clara a maior eficiência de supressão da fluorescência da DBC por iodeto em pH 5,5 e 7,4 , chegando a ser aproximadamente cinco vezes mais eficiente em pH 5,5 que em pH 10,2.

O K_{SV} maior de supressão de fluorescência da DBC^+ por iodeto deve refletir a grande contribuição de interações eletrostáticas no fenômeno. As colisões entre estas substâncias devem tornar-se mais frequentes, e com isso a perda de energia da DBC^+ no estado excitado com o choque com íons I^- é maior. Vale observar que o grupamento ionizável da DBC, a amina terciária, localiza-se próxima ao anel quinolínico, que é o responsável pela fluorescência da DBC, e que portanto favorece o encontro deste íon com o próprio anel fluoróforo.

Fluorescência em membranas

Analizamos a seguir a interação da DBC com membranas lipídicas compostas por DOPC por fluorescência, e medimos a partição da DBC a pH 5,5 e a pH 10,2. A **Figura 18** mostra o comportamento da intensidade de fluorescência da DBC em concentrações crescentes de DOPC (vesículas extrudadas), em tampão carbonato a pH 10,2.

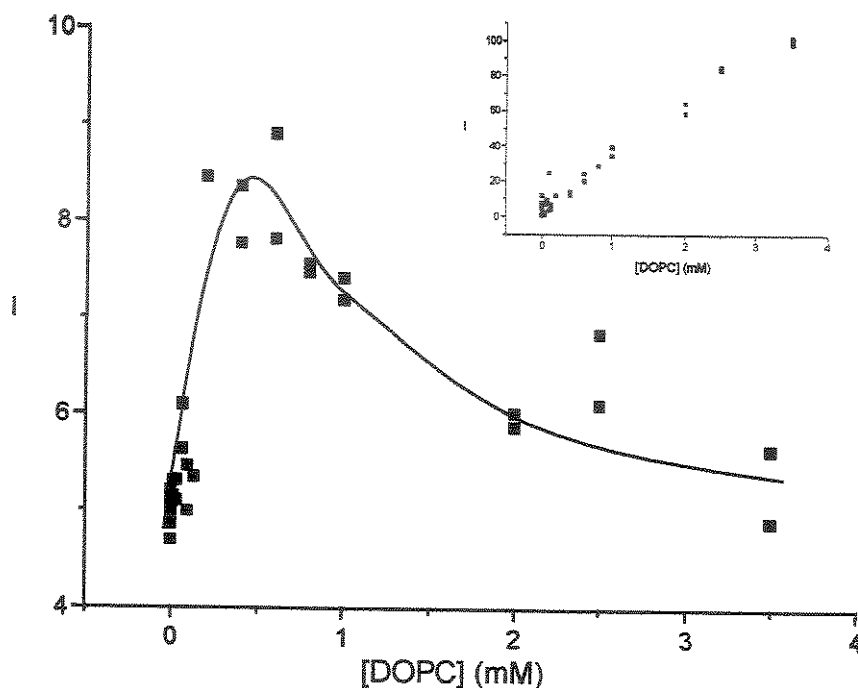


Figura 18: Intensidade de emissão da DBC (20 μ M) em função da concentração de DOPC em tampão carbonato 20 mM a pH 10,2. O gráfico menor representa a dispersão de luz (área de integração espectral) dos controles com diferentes concentrações de DOPC. Os dados apresentados acumulam três experimentos.

A **Figura 18** mostra-nos um comportamento inesperado da intensidade da fluorescência da DBC. A intensidade de emissão cresce com o aumento da concentração de DOPC até cerca de 0,2 mM, aonde inicia-se o decréscimo da emissão. O crescimento da dispersão com o aumento da concentração de DOPC (gráfico menor) deve afetar os

espectros correspondentes a concentrações maiores de DOPC, explicando o decaimento da fluorescência.

Tentamos utilizar cubetas triangulares, que minimizam o efeito da dispersão de luz sobre os espectros obtidos, mas tivemos sérios problemas como a redução apreciável da intensidade de fluorescência e presença de um possível interferente que não era eliminado com solventes ou solução sulfonítrica.

Embora não tenha sido possível descartar completamente o efeito da dispersão de luz, concentramo-nos na fase inicial do espectro, em que a intensidade de fluorescência da DBC neutra aumenta a medida que a molécula transfere-se para o meio membranar, até as concentrações de DOPC de cerca de 0,2 mM.

Esperaríamos que o espectro de emissão da DBC, como o de outros fluoróforos, fosse sensível à variação da polaridade do meio mostrando uma maior intensidade molar e desvio para o azul, ao trocar o meio aquoso pela membrana (Lakowicz, 1983). Na **Figura 19** analisamos a variação do $\lambda_{\text{máx}}$ da DBC com o aumento da concentração de DOPC.

estável com o aumento de DOPC, e que a partição dá-se segundo uma constante de equilíbrio (K_b), de acordo com (Eftink *et al.*, 1985) :

$$K_b = \frac{[DBC]_{mb}}{[DBC]_{\text{água}}[DOPC]} \quad (14)$$

onde [DOPC] corresponde à concentração total de DOPC, e $[DBC]_{mb}$ e $[DBC]_{\text{água}}$ correspondem à concentração em relação ao volume total de solução de DBC em membrana e em solução, respectivamente.

Obteve-se como resultado K_b de $(1,5 \pm 1,0) 10^3 \text{ M}^{-1}$ para a ligação de DBC^0 nestas vesículas, e $\lambda_{\text{máx}}$ de $392,0 \pm 3,3 \text{ nm}$ para a DBC tornando-se o limite da concentração de DOPC tendendo ao infinito, i.e., de incorporação total de DBC à membrana.

Em seguida, fizemos medidas análogas de fluorescência de DBC em pH 5,5, em que prevalece sua forma protonada.

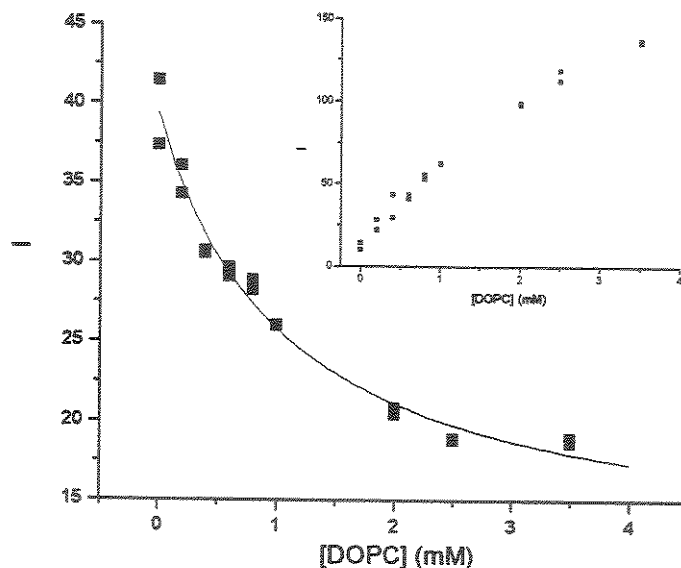


Figura 20: Intensidade de fluorescência da DBC em presença de concentrações crescentes de DOPC e dispersão de luz (área) dos controles (gráfico menor). A linha é um ajuste do modelo de partição adotado (Equação 11) aos dados obtidos. Tampão acetato 20 mM, pH 5,5.

Ao contrário do que acontece a pH 10,2, a intensidade de fluorescência da DBC apresenta um decréscimo contínuo com o aumento da concentração de DOPC. Este fenômeno não é comum entre fluoróforos que particionam em membranas (Lakowicz, 1983) e poderia estar sendo causado por: (1) um rendimento de fluorescência da DBC^+ em membrana inferior ao da DBC^+ em água ou (2) um deslocamento do equilíbrio de ionização, com boa parte da DBC^+ transformando-se em DBC^0 na presença de membrana, considerando-se que o rendimento desta última é 8 vezes menor que o da DBC^+ , em água ou membrana e, (3) um artefato da dispersão de luz que encobriria as variações da fluorescência da DBC^+ em água e em membrana.

A hipótese 1 tem como suporte a observação de que a intensidade da DBC (protonada e neutra) diminui na presença de dioxano, que é um solvente apolar e que não apresenta turbidez. Adiante discutiremos se a redução da intensidade da fluorescência da DBC em presença de dioxano é devida somente à redução da polaridade da solução.

A hipótese 2 considera que a alteração do pK_a aparente da DBC na presença de membrana é grande o suficiente para que uma fração significativa da DBC^0 contribua para a redução de fluorescência observada. Isto ocorre por uma afinidade diferencial da membrana com as formas neutra e protonada da DBC, que irá alterar a proporção dessas formas na solução aquosa. Um esquema dos equilíbrios das formas de DBC em presença de membrana é mostrada na Introdução seção Dibucaína. Variações no pK aparente (medido em água, na presença de membranas) de até -1,0 unidade foram descritas para anestésicos locais como a tetracaína (Schreier *et al.*, 1984a). Eftink e colaboradores (1985) relataram um deslocamento de -1,35 unidades de pH ($pK = 7,45$) para a DBC, na partição entre DMPC e água. No entanto, resultados recentes de nosso laboratório (Malheiros *et al.*, 2000) não demonstraram variação significativa no pK_a da DBC, quando particionada em membranas de fosfatidilcolina.

O efeito da turbidez (terceira hipótese) proposto como explicação para este fenômeno é razoável, como veremos adiante, mas não é suficiente para explicar satisfatoriamente o decréscimo de fluorescência observado (ver **Figura 33**).

Note-se no gráfico menor da **Figura 20** que a dispersão de luz aumenta bastante com a concentração de DOPC e é maior que a observada em pH 10,2 (gráfico menor da **Figura 18**). Ainda assim, tentamos extrair a constante de ligação da DBC a membranas de DOPC a pH 5,5 por meio de regressão não-linear da Equação 7, aos dados de intensidade de fluorescência da DBC nestas condições, chegando a um K_b de $930 \pm 370 \text{ M}^{-1}$, e uma intensidade relativa a toda DBC na membrana de $11,4 \pm 3,6$. Esta última informação é obtida extrapolando-se a **Equação 7**, obtida com o ajuste para uma concentração de DOPC tendendo ao infinito.

As regressões lineares utilizadas sobre os dados possuem um ajuste muito bom, indicando-nos que podemos descartar efeitos de potenciais de membrana como fatores que influenciariam a partição de DBC protonada nas concentrações de DBC e DOPC utilizadas.

A **Figura 21** mostra a variação do $\lambda_{\text{máx}}$ da fluorescência da DBC em diferentes concentrações de DOPC, que pode também fornecer informações a respeito da constante de ligação da DBC a estas membranas, em pH ácido.

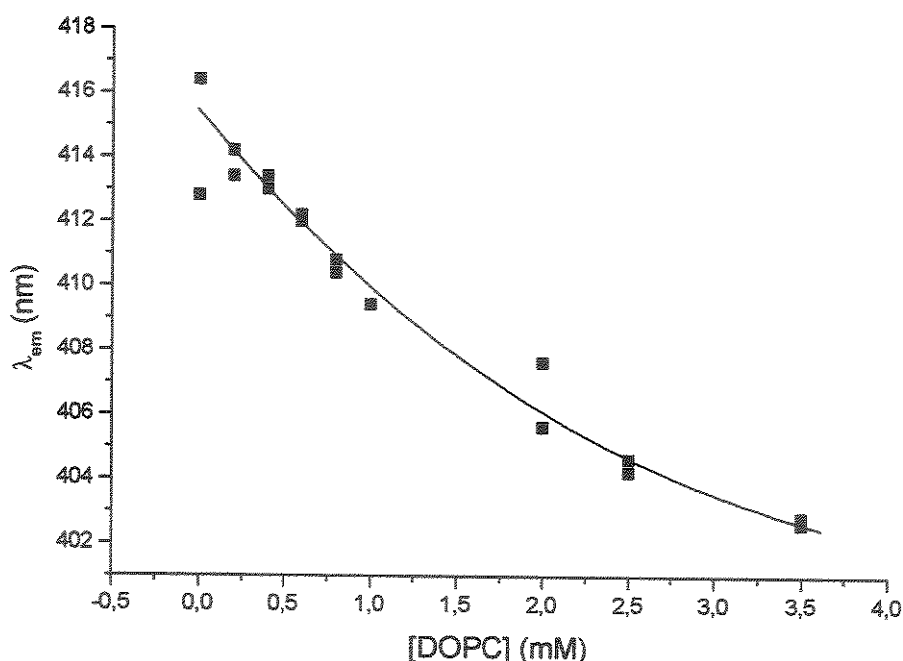


Figura 21: Variação do $\lambda_{m\acute{a}x}$ de emissão de fluorescência da DBC 20 μ M em concentrações crescentes de DOPC em tampão acetato 20 mM a pH 5,5.

A **Figura 21** revela uma variação do $\lambda_{m\acute{a}x}$ da emissão da DBC para comprimentos de onda menores quando em presença de concentrações crescentes de DOPC. Tal fenômeno já havia sido observado para a forma neutra da DBC (**Figura 19**).

Como os intervalos de confiança são muito grandes tanto para o K_b obtido de intensidade como de $\lambda_{m\acute{a}x}$, consideramos o valor de K_b obtido pela intensidade de fluorescência (**Figura 20**) como a constante de ligação da DBC em membranas de DOPC, neste pH. A pouca precisão dos dados conseguidos a partir da variação de $\lambda_{m\acute{a}x}$ dificultou a determinação do $\lambda_{m\acute{a}x}$ da DBC⁺ em membrana.

Percebemos claramente que o $\lambda_{m\acute{a}x}$ decresce monotonicamente com a concentração de DOPC, o que nos indica que a DBC⁺ está ocupando um ambiente cada vez mais hidrofóbico com o aumento da concentração de membrana. O decréscimo mas lento do $\lambda_{m\acute{a}x}$ com o aumento progressivo de membrana pode ser reflexo de uma menor partição da DBC⁺ em relação a DBC⁰. Através de um ajuste da **Equação 7** ao gráfico da

Figura 21, obtivemos um valor de 384 ± 10 nm para uma concentração infinita de DOPC, que deve corresponder ao seu $\lambda_{\text{máx}}$ quando incluída na membrana.

Investigamos também a partição da DBC em pH 7,4, com os dados de intensidade e os espectros de DBC em presença de concentrações crescentes de DOPC.

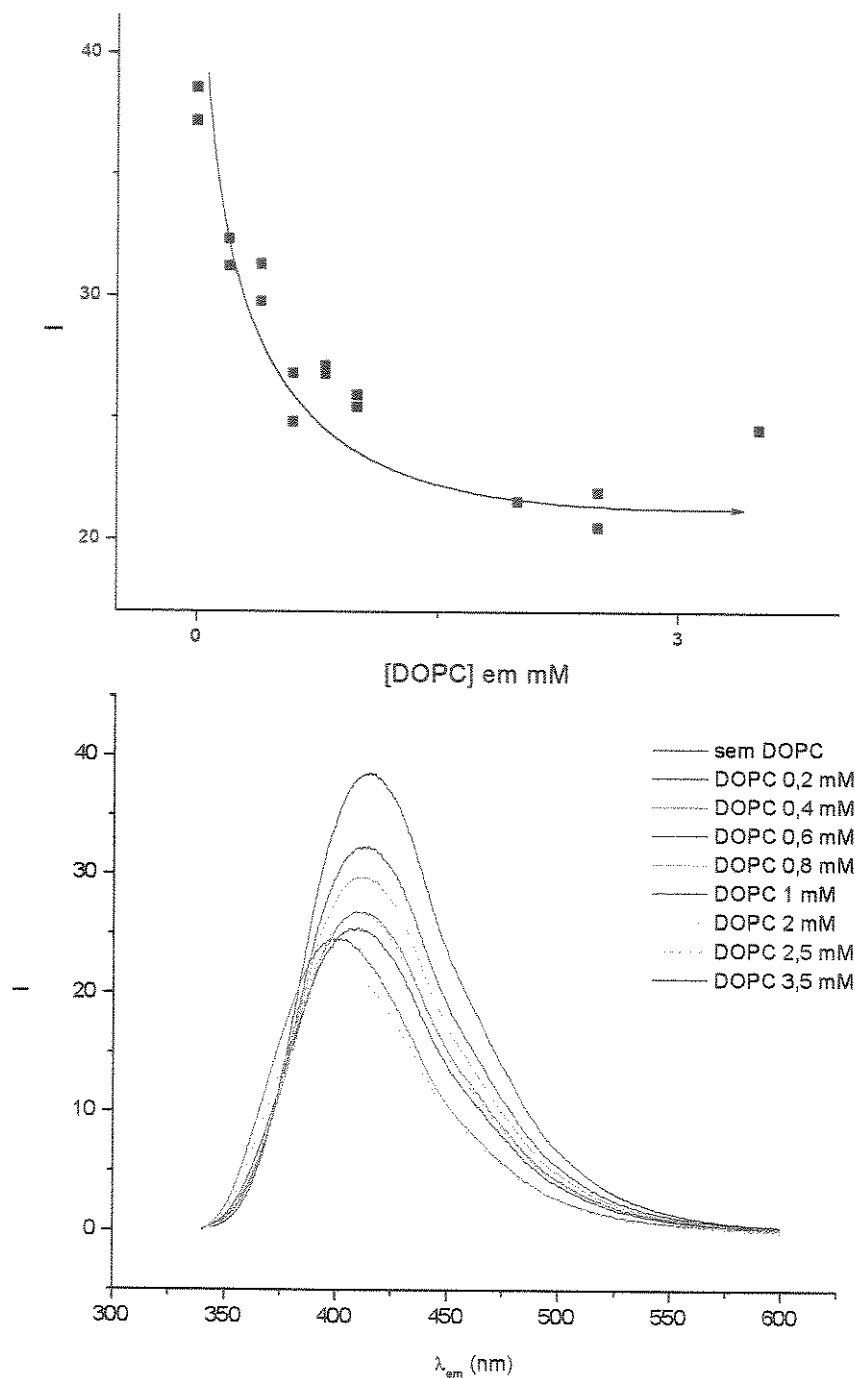


Figura 22: Intensidade de emissão de DBC 20 μ M em presença de concentrações crescentes de DOPC (acima) e espectros de emissão de DBC 20 μ M nas respectivas concentrações de DOPC. Tampão Tris 20 mM, pH 7,4.

Como é mostrado na **Figura 22**, a intensidade da DBC diminui com o aumento de DOPC, como já visto para os outros pH. A fluorescência na concentração de DOPC de 3,5 mM parece aumentar, que pode ser resultado de um aumento expressivo da dispersão de luz. O $\lambda_{\text{máx}}$ no entanto sempre decresce com o aumento da concentração de DOPC.

O $\lambda_{\text{máx}}$ de fluorescência de DBC versus concentração de DOPC é mostrado na **Figura 23**.

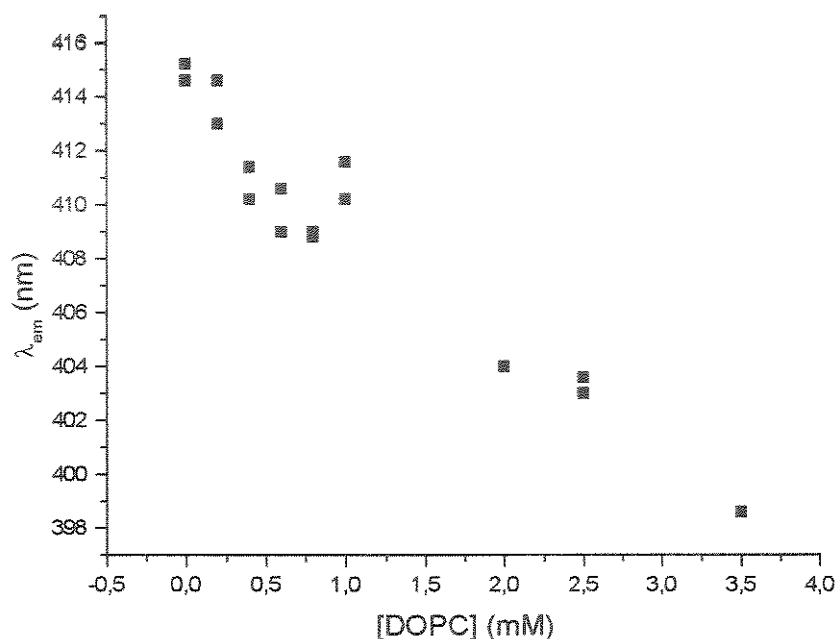


Figura 23: Variação do $\lambda_{\text{máx}}$ de DBC 20 μM em presença de concentrações crescentes de DOPC. Tampão Tris 20 mM, pH 7,4.

O $\lambda_{\text{máx}}$ da DBC na membrana não pode ser medido com uma boa precisão, mas podemos determiná-lo por extrapolação de membrana a concentrações infinitas como sendo de 362 ± 38 nm. A **Tabela 6** resume os parâmetros de fluorescência e interação da DBC com membranas de DOPC em diferentes pH.

Tabela 6: Constantes de ligação (K_b), intensidade de fluorescência de DBC incorporada à membrana composta por DOPC (I_{mb}), $\lambda_{m\acute{a}x}$ de fluorescência de DBC incorporada à membrana ($\lambda_{m\acute{a}x\ mb}$) e constante dielétrica do microambiente da DBC na membrana (ϵ), em diferentes tampões.

Tampão	K_b (M^{-1})	I_{mb}	$\lambda_{m\acute{a}x\ mb}$ (nm)
Acetato, pH 5,5	$(0,93 \pm 0,37) 10^2$	$11,4 \pm 3,6$	384 ± 10
Tris, pH 7,4	n.a.	$19,7 \pm 2,9$	362 ± 38
Carbonato, pH 10,2	$(1,5 \pm 1,0) 10^2$	n.a.	392 ± 3

Estes valores da constante de ligação são compatíveis com os descritos na literatura. Em membranas de DMPC, Eftink *et al* (1985) encontraram valores iguais a 932 e 1902 M^{-1} , respectivamente para as formas protonada e neutra da DBC. Malheiros *et al.* (2000) encontraram valores de K_b iguais a 1178 M^{-1} para DBC⁺ e de 1720 M^{-1} para DBC⁰ em membranas de PC de ovo.

Tendo em mãos os valores de K_b para a DBC, fizemos várias simulações de espectros de fluorescência de DBC, como descrito em Materiais e Métodos, para entendermos o seu comportamento em membrana. Simulamos espectros de DBC em solução, obtendo a intensidade molar para cada λ_{em} e então subtraímos o espectro simulado da DBC calculada em solução, pela equação 6, do espectro obtido em presença de membrana. A **Figura 24** mostra a variação do espectro de DBC em membrana, a partir de espectros em presença de membrana e espectros simulados, em pH 5,5.

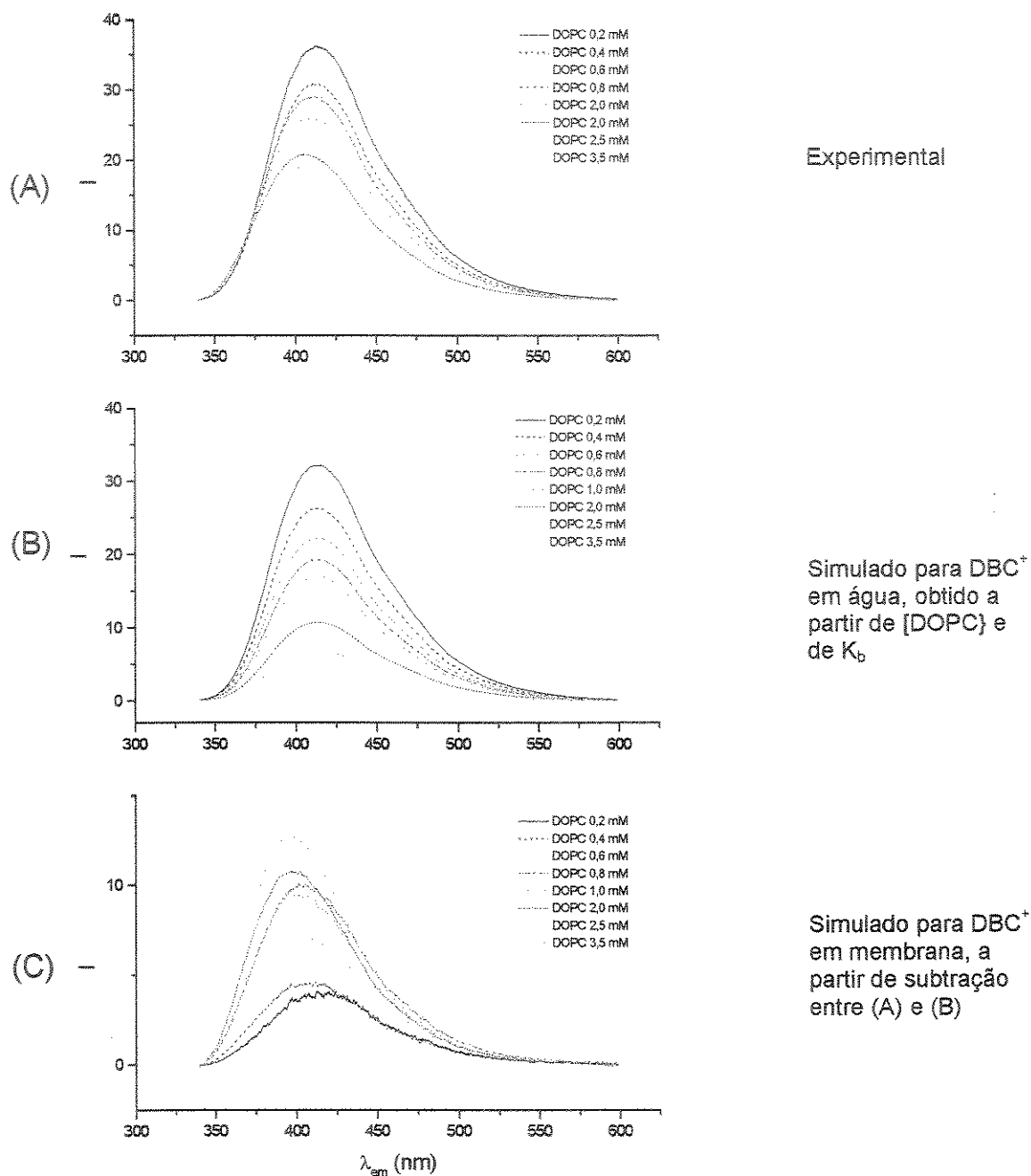


Figura 24: Espectros de emissão de DBC^+ ($20 \mu\text{M}$) em presença de concentrações crescentes de DOPC (A), simulados de $\text{DBC}_{\text{água}}$ para as mesmas concentrações de DOPC (B) e obtidos por subtração entre o primeiro e o segundo (C). A escala do último gráfico foi expandida para ressaltar o resultado das subtrações. Tampão acetato, 20 mM , $\text{pH } 5,5$.

Os espectros obtidos revelam um pequeno aumento na intensidade detectada, que corresponde ao aumento da concentração de DBC⁺ em membrana (**Figura 24C**). Neste gráfico podemos observar a incorporação da DBC à membrana de forma destacada, sem a contribuição da fluorescência da DBC aquosa. No entanto, levando-se em conta as escalas dos gráficos da **Figura 24**, vemos que essa maior intensidade molar da DBC protonada dentro de membranas de DOPC é pequena, em relação a DBC⁺ em solução aquosa e, possivelmente, seja encoberto pela dispersão de luz, com o aumento da concentração de membrana.

Não é possível asseverar nada a respeito da variação do $\lambda_{\text{máx}}$ porque este não varia com o aumento da concentração de membrana da mesma forma que a intensidade. Dessa forma, um parâmetro pode continuar a mudar significativamente enquanto o outro já estabilizou para uma determinada concentração de membrana.

A **Figura 25** mostra os resultados da simulação de variação da intensidade de fluorescência e $\lambda_{\text{máx}}$ da DBC⁺ na presença de concentrações crescentes de DOPC.

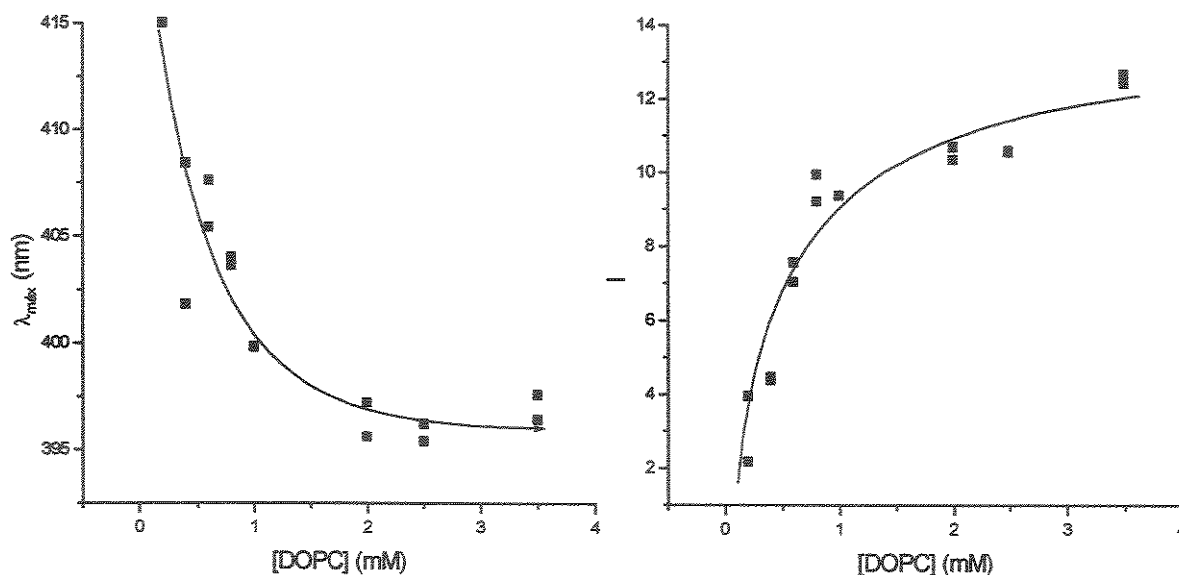


Figura 25: Variação simulada do $\lambda_{\text{máx}}$ (esquerda) e da intensidade de fluorescência (direita) da DBC incorporada à membrana. Tampão acetato 20 mM, pH 5,5.

É importante notar que o aumento de intensidade observado na Figura 25 equivale somente ao aumento da DBC ligada à membrana, e desconsidera a intensidade da DBC em solução. O aumento de I , portanto, é somente um indicador de que a DBC está progressivamente incorporando-se à membrana.

Os valores de I e de $\lambda_{\text{máx}}$ devem ser correspondentes aos valores da DBC particionada. No caso da DBC incorporada a membranas de DOPC a pH 5,5, os valores de I e de $\lambda_{\text{máx}}$ calculados da simulação foram de 11 e 395 nm, respectivamente.

A intensidade condiz bem com os valores apresentados na Tabela 6. No entanto, o valor de $\lambda_{\text{máx}}$ calculado na membrana difere em mais de 10 nm. O $\lambda_{\text{máx}}$ também apresentou variação coerente com o modelo de ligação usado para a intensidade, mas o K_b determinado a partir de $\lambda_{\text{máx}}$ foi bem menor que o valor descrito na Tabela 6.

Não pudemos conduzir o mesmo tipo de análise para a forma neutra da DBC, uma vez que a intensidade varia de forma inexplicada pelo modelo de ligação que foi usado agora para a forma protonada.

Ajustes de log-normal a espectros

O ajuste de espectros de fluorescência por uma função log-normal de quatro parâmetros descreve muito bem a forma de diversos compostos em diferentes soluções (Burstein & Emelyanenko, 1996). Os parâmetros obtidos imediatamente ao ajuste são o comprimento de onda de emissão máxima ($\lambda_{\text{máx}}$), intensidade máxima ($I_{\text{máx}}$), largura a meia altura de $I_{\text{máx}}$ (Γ) e assimetria do espectro (ρ) e a função é mostrada na **Equação 7**.

A **Figura 26** ilustra o ajuste desta função a um espectro de fluorescência da DBC protonada.

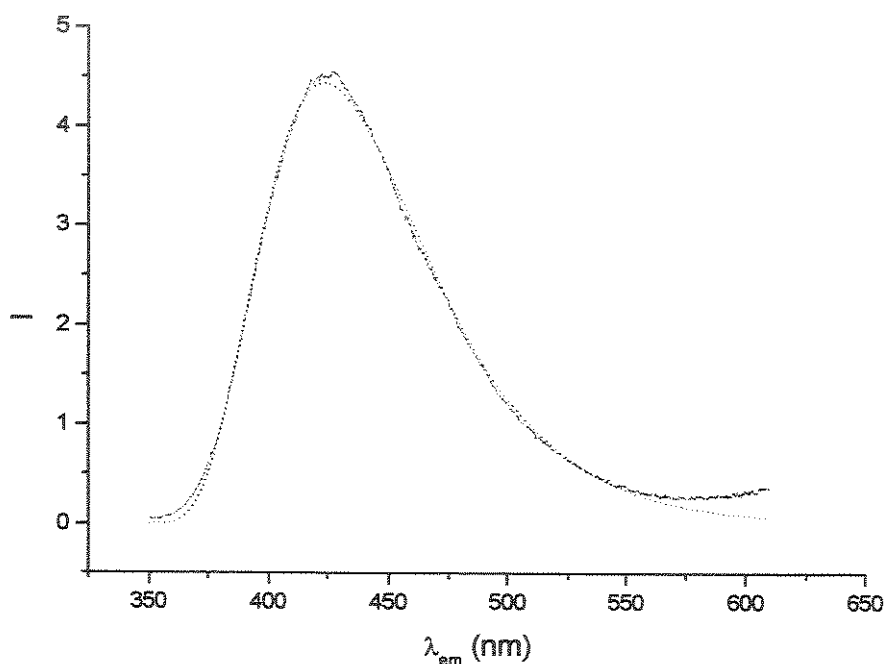


Figura 26: Ajuste de função log-normal (tracejado, em preto) ao espectro de DBC 20 μM (linha contínua, em cinza) em tampão acetato 20 mM, pH 5,5. O λ_{ex} foi de 324 nm, em presença de filtro de polarização em ângulo mágico.

Este ajuste evidencia-se como uma ótima ferramenta para a obtenção de parâmetros da forma dos espectros de fluorescência. Apesar de ser um método de caráter empírico, apresenta-se aplicável para uma série de compostos orgânicos, podendo ser

utilizado para simulação de espectros. Para a fluorescência do triptofano (Trp) não é sequer necessária a obtenção de todos os parâmetros para recuperar-se um espectro, o que nos anima ainda mais na aplicação deste método (Burstein & Emelyanenko, 1996).

Passamos a usar também filtros de polarização em ângulo mágico (filtro para excitação em 90° e de emissão a 54° em relação ao de excitação), ao invés da disposição anterior (filtro para excitação em 90° e de emissão a 54°). A disposição utilizada anteriormente de fato atenuava efeitos de espalhamento de luz, mas tinha contra si a não proporcionalidade entre seu espectro e o espectro sem polarização, além de o espectro obtido estar sujeito a mudança de anisotropia do fluoróforo. As medidas de partição feitas até então permanecem válidas exceto pela caracterização fluorimétrica da DBC em membrana, porque o modelo de partição usado assumia uma única forma de DBC em membrana, de forma que a anisotropia associada ao espectro era consistente com a partição. No entanto não poderíamos saber o perfil espectral e anisotropia da DBC em membrana. A turbidez de amostras de membranas para algumas concentrações mais altas pode ter afetado os resultados.

Fluorescência da DBC em dioxano

Caracterizamos a fluorescência da DBC em meios de diferentes polaridades, a saber, soluções de dioxano a diferentes concentrações, como descrito por Desai e colaboradores (1994), para a fluorescência da tetracaína e outros anestésicos. A **Figura 27** mostra espectros de DBC em meios de diferentes constantes dielétricas (**Tabela 8**), obtidas com soluções de dioxano/água, em pH 5,5 e 10,2.

Os espectros referentes às formas protonada e neutra da DBC, sugerem a ocorrência de uma redução de intensidade de fluorescência concomitante a redução da polaridade do meio e diminuição do λ_{max} em meios de concentração mais alta de dioxano.

A variação do λ_{max} com a polaridade da solução (**Tabela 8**) pode ser vista na **Figura 28** para as formas protonada e neutra da DBC. Os valores de polaridade foram obtidos a partir de curvas-padrão de dioxano:água (Harned & Owen, 1958).

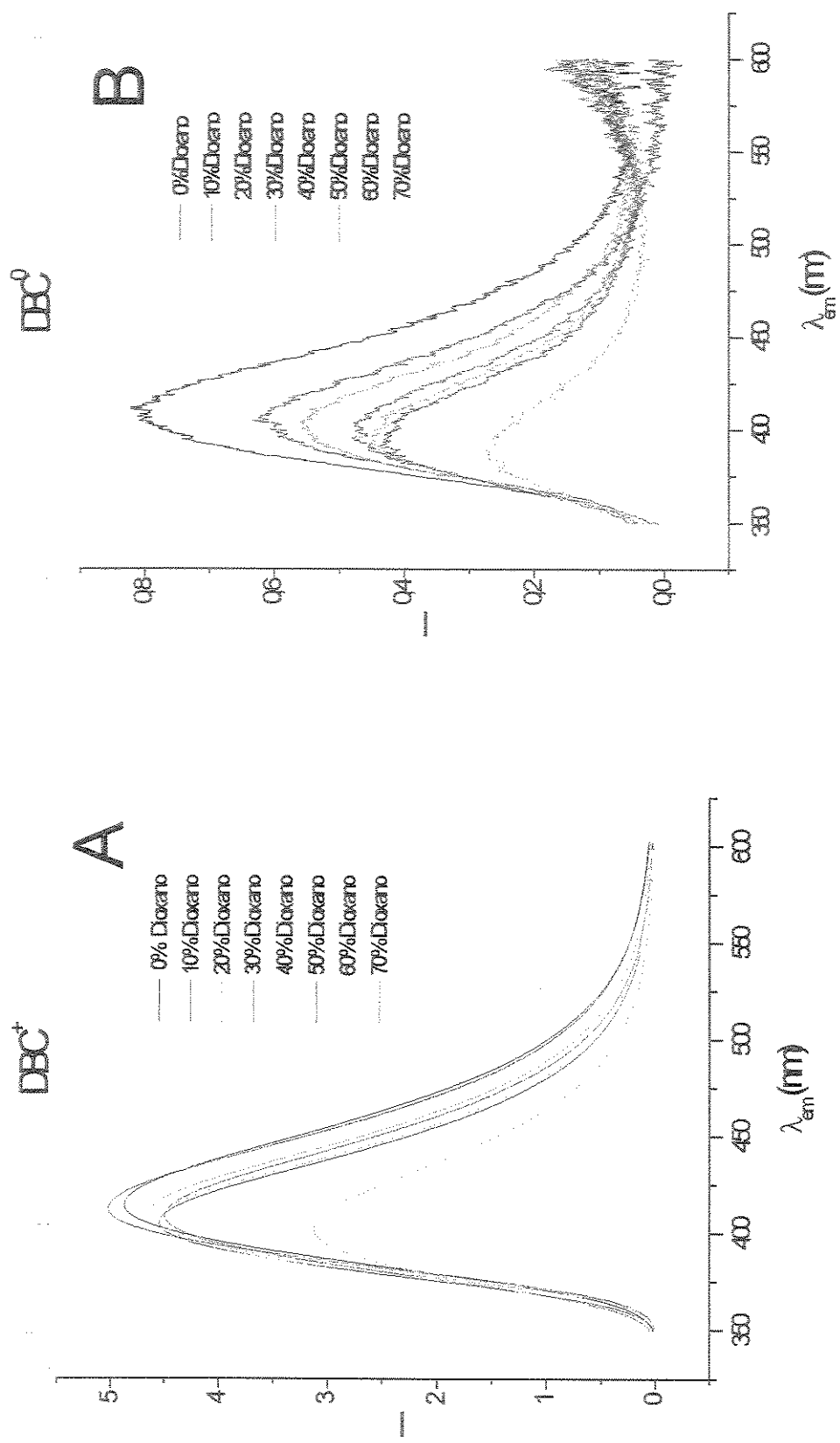


Figura 27: Espectros de DBC (20 μM) em soluções de diferentes concentrações de dioxano (0 a 70% v/v), em pH 5,5 (A) e 10,2 (B).

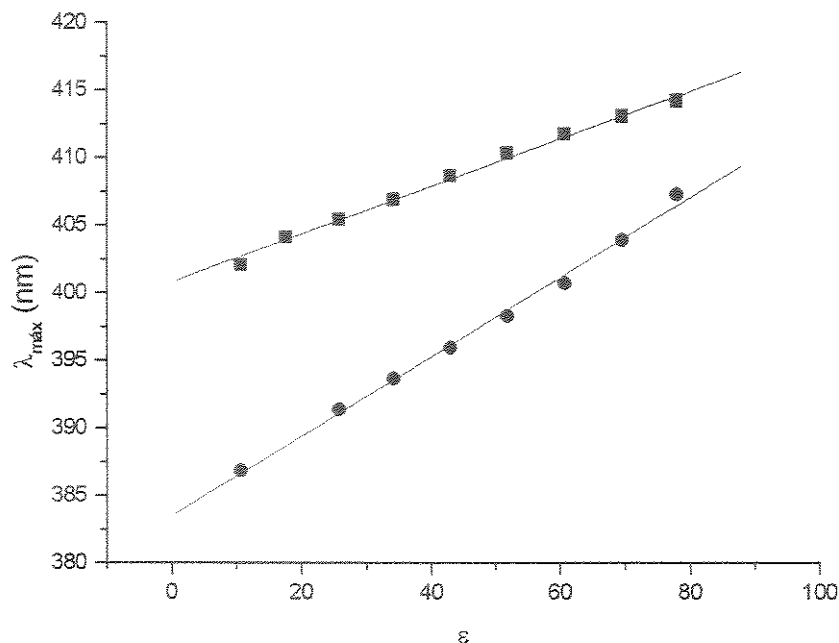


Figura 28: Variação do $\lambda_{\text{máx}}$ da DBC com a variação da constante dielétrica do meio. As soluções usadas foram de dioxano em água destilada pH <6 (quadrado) ou em tampão borato 20 mM pH 10,5 (círculo). λ_{ex} de 324 nm.

Como podemos observar, o $\lambda_{\text{máx}}$ da fluorescência da DBC varia linearmente com a constante dielétrica, conforme observado por Desai *et al.* (1994) para a tetracaína. A **Tabela 7** resume as informações da **Figura 28**.

Tabela 7: Parâmetros da regressão linear ($\lambda_{\text{máx}} = A + B \varepsilon$) entre $\lambda_{\text{máx}}$ da DBC e a constante dielétrica do meio, obtidos de dados da **Figura 28**.

pH	Parâmetro	Valor
<6,0	A	$400,78 \pm 0,23$
<6,0	B	$0,1763 \pm 0,0043$
10,5	A	$383,50 \pm 0,43$
10,5	B	$0,2939 \pm 0,0084$

A partir dessa curva-padrão da fluorescência da DBC em dioxano, procuramos determinar os valores das constantes dielétricas correspondentes a fluorescência da DBC em membrana, como descrito por Desai *et al* (1994). Flewelling & Hubbell (1986a) mostraram que a constante dielétrica de bicamadas lipídicas varia de 78 (na interface com a água) a 32 (na região da carbonila) e 2 (no "interior" lipídico). Para a DBC neutra, $\lambda_{\text{máx}}$ de 392 nm em membrana indica um microambiente de polaridade intermediária entre a da água e do interior hidrofóbico = 38, isto é, a região de interface cabeça-polar/cauda hidrofóbica. Já para a DBC protonada o $\lambda_{\text{máx}}$ de 384 nm está fora da curva, indicando haver interação específica da forma protonada da DBC com a membrana fosfolipídica.

Em seguida averiguamos se os efeitos observados eram devidos a alguma interação específica com o solvente, utilizando a equação de Lippert:

$$v_a - v_f \approx [2/(h c)] \{[(\epsilon - 1)/(2\epsilon + 1)] - [(\eta^2 - 1)/(2\eta^2 + 1)](\mu^* - \mu)/a^3\} + \text{constante} \quad (18)$$

onde v_a e v_f são nos números de onda de absorção e emissão, respectivamente, h é a constante de Plank, c é a velocidade da luz no vácuo, ϵ é a constante dielétrica da solução, η é o índice de refração do meio, $\mu^* - \mu$ é a diferença do momento dipolo do fluoróforo no estado excitado e fundamental, respectivamente e a é o raio da cavidade onde situa-se o fluoróforo. O termo entre chaves na **Equação 18** é designado como Δf .

Para isso, medimos o índice de refração das diferentes soluções de dioxano. A **Tabela 8** mostra estes valores.

Tabela 8: Valores de constante dielétrica (ϵ) de soluções de dioxano (segundo Harned & Owen, 1958) e valores experimentais do índice de refração das soluções de dioxano em água destilada, pH<6 (η_a) e em tampão borato 20 mM pH 10,5 (η_b).

[Dioxano] v/v (%)	ϵ	η_a	η_b
0	78	1,333	1,3331
10	69,69	1,3429	1,3433
20	60,79	1,3524	1,3534
30	51,9	1,3622	1,3632
40	42,98	1,3714	1,3729
50	34,26	1,3814	1,3821
60	25,85	1,3897	1,3903
70	17,69	1,3979	1,3983
80	10,71	1,4050	1,4060

A fim de verificar se o efeito observado deve-se somente a interações não-específicas com o solvente, fizemos o gráfico de Lippert, conforme mostrado na **Figura 29**.

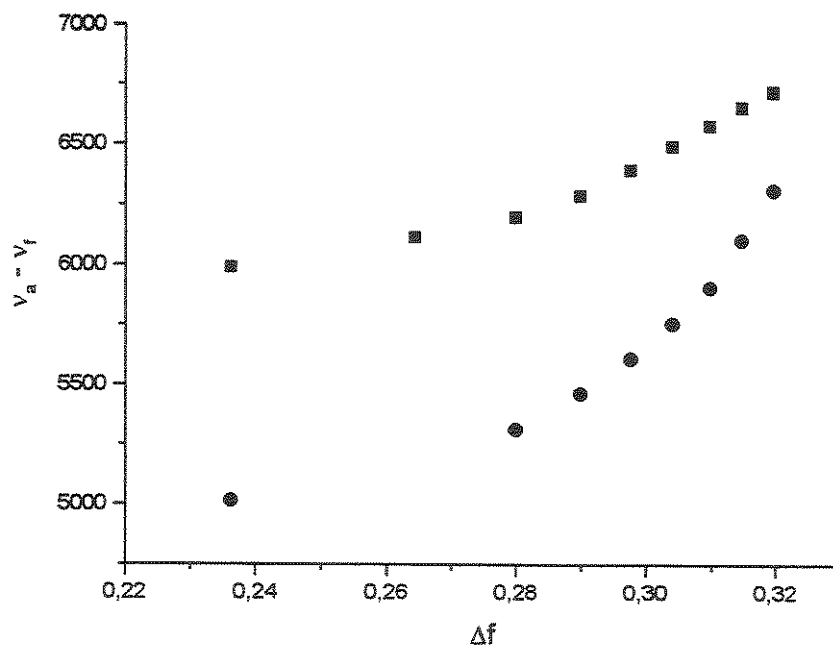


Figura 29: Gráfico de Lippert para DBC em soluções de dioxano com diferentes polarizabilidades (Δf), em água destilada pH <6 (quadrado) e em tampão borato 20 mM pH 10,5 (círculo).

A ausência de linearidade na **Figura 29** indica-nos a existência de interação específica entre a DBC e o solvente usado. Porém, para concentrações de dioxano até 50% (Δf maior que 0,28), o gráfico de Lippert é aproximadamente linear, permitindo a estimativa da polaridade do micro-ambiente de inserção preferencial da DBC na membrana, pela variação de seu $\lambda_{\text{máx}}$.

Isto pode significar que a desprotonação da DBC facilite a interação específica com o solvente, e que a *DBC⁺* não apresente interações específicas com o solvente para concentrações de dioxano até 50%. A atribuição de polaridade ao microambiente em que a *DBC⁺* se insira a partir do $\lambda_{\text{máx}}$ é portanto válida.

Vemos também que a presença de interação específica entre a DBC e seu microambiente pode provocar redução da intensidade de fluorescência. No caso descrito no parágrafo anterior, a redução de intensidade não é causada por qualquer interação específica. A redução também presente com o aumento de membrana pode assim ser facilmente justificada pela ocorrência de interações específicas entre a DBC e a membrana.

A avaliação precisa da polaridade do microambiente em que a DBC está inserida torna-se menos fácil de executar-se, tanto por problemas de interação específica entre a DBC e o dioxano para a construção de uma curva-padrão como pela forte possibilidade de interações específicas decorrentes da interação DBC e membrana.

Desai *et al.* (1994) usaram solventes orgânicos para conferir a inexistência de efeitos específicos do solvente. Como vimos, a construção de uma curva de Lippert pode ser uma forma muito sensível para detecção de interações específicas e pode ser necessária para garantir-se a isenção de outros efeitos que não são facilmente vistos com uma curva padrão $\lambda_{\text{máx}} \times \epsilon$ ou testando-se outros solventes.

Procuramos então observar se havia alguma correlação entre os parâmetros da função usada no ajuste espectral. A **Tabela 9** mostra os valores destas correlações.

Tabela 9: Correlação entre parâmetros de fluorescência da DBC em meios de diferentes constantes dielétricas. Parâmetros obtidos a partir de ajuste espectral a curva log-normal (Burstein & Emelyanenko, 1996). Espectros correspondentes a DBC em soluções de dioxano em água destilada, mantidas a pH menor que 6,0 e em tampão borato 20 mM pH 10,5.

pH		Intensidade	Rho	Lambda	Largura
<6	Intensidade	1			
	Rho	0,092298377	1		
	Lambda	0,736833154	-0,22408	1	
	Largura	0,428563906	-0,51732	0,903207	1
10,5	Intensidade	1			
	Rho	-0,13775	1		
	Lambda	-0,147	0,549336	1	
	Largura	-0,07656	0,227935	0,159777	1

A tabela acima mostra que a correlação entre os parâmetros espectrais de emissão da DBC em meios de diferentes constantes dielétricas é muito baixa, em contraste com o observado para a fluorescência do Trp (Burstein & Emelyanenko, 1996). Com isso, não poderemos reduzir o número de parâmetros para análise de partição e fluorescência da DBC em sistemas de membranas.

Correção de turbidez de suspensões de membranas

Quando estudamos a fluorescência da DBC na presença de membranas lipídicas, encontramos interferências indesejáveis de turbidez das amostras, a ponto de comprometer os resultados. Buscamos formas de contornar estes problemas usando ajustes de espectros, filtros de polarização em ângulo mágico (cerca de $54,7^\circ$), funções que envolviam medidas de densidade óptica das amostras e o método de diluições sucessivas (Eisinger & Flores, 1985), como apresentado na seção Tratamento de espectros.

Passamos a utilizar sistematicamente filtros de polarização para evitar a interferência da luz espalhada, usando um filtro de polarização da forma descrita anteriormente. Cabe registrar que este recurso reduz drasticamente a intensidade de emissão detectada.

Para efetuar uma correção adequada, deveríamos encontrar uma molécula que absorvesse no mesmo λ_{ex} da DBC e que emitisse na mesma faixa de emissão da DBC

com um sinal significativo. Testamos três compostos: o triptofano (Trp), Hoescht 33342 e o pireno (PyPC).

Testamos a estabilidade do Trp, ao saber que poderia se degradado em meio alcalino. A **Figura 30** mostra a variação da fluorescência do Trp em pH 5,5 e 10,5.

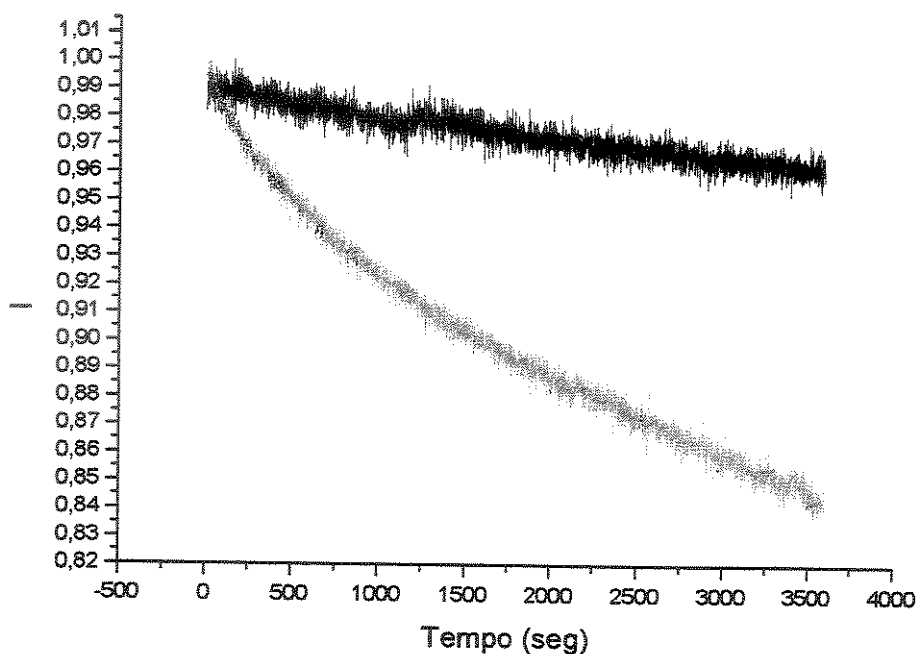


Figura 30: Variação da intensidade normalizada de emissão do Trp 17,92 μM em tampão acetato 20 mM pH 5,50 (preto) e em tampão borato 20 mM pH 10,5 (cinza). O λ_{ex} foi de 280 nm e λ_{em} de 350 nm.

A degradação observada em pH alcalino levou-nos a buscar outro fluoróforo resistente aos pH usados. Testamos, após consulta técnica à empresa *Molecular Probes*, o composto Hoescht 33342 (**Figura 7**). Seu espectro é mostrado na **Figura 31**.

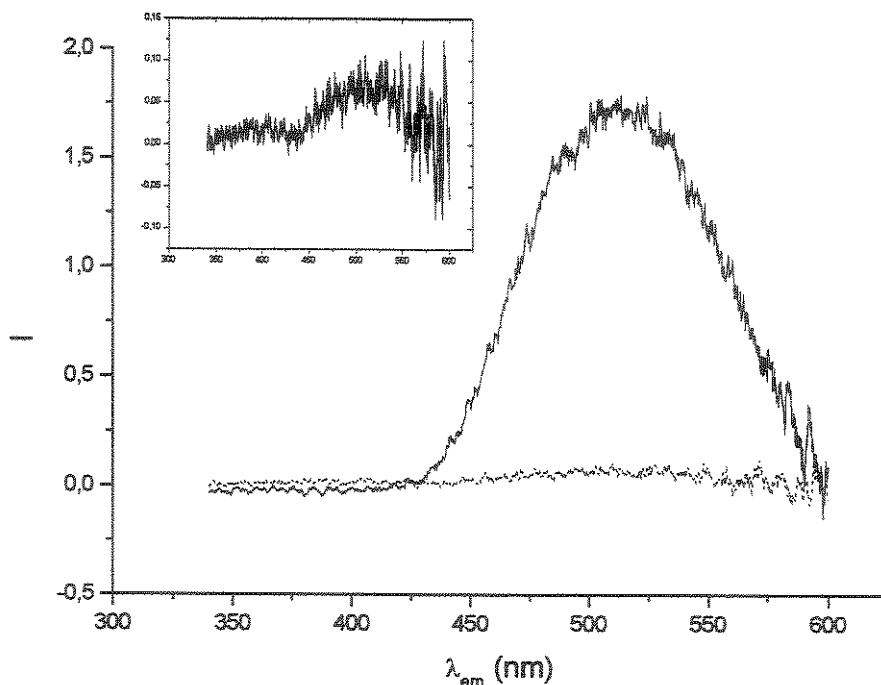


Figura 31: Espectros do composto Hoescht 33324 em tampão acetato 20 mM pH 5,5 (linha contínua) e em tampão HEPES 20 mM pH 7,4 (linha pontilhada). No gráfico menor, o espectro em tampão HEPES ampliado. λ_{ex} foi de 324 nm nos dois pH.

O espectro do Hoescht 33342 tem um espectro de emissão de 420 a 600nm, o que significa razoável sobreposição com a fluorescência da DBC. No entanto, notamos em pH 7,4 que a intensidade é ínfima, com grande ruído de fundo. Isso desestimula-nos a utilizarmos este fluoróforo como padrão de correção de turbidez a pH não-ácidos.

O PyPC, ao contrário do Trp e do Hoescht 33342, permanece ligado a membrana. A Figura 32 mostra uma sobreposição entre os espectros de DBC e PyPC em mesmas condições instrumentais.

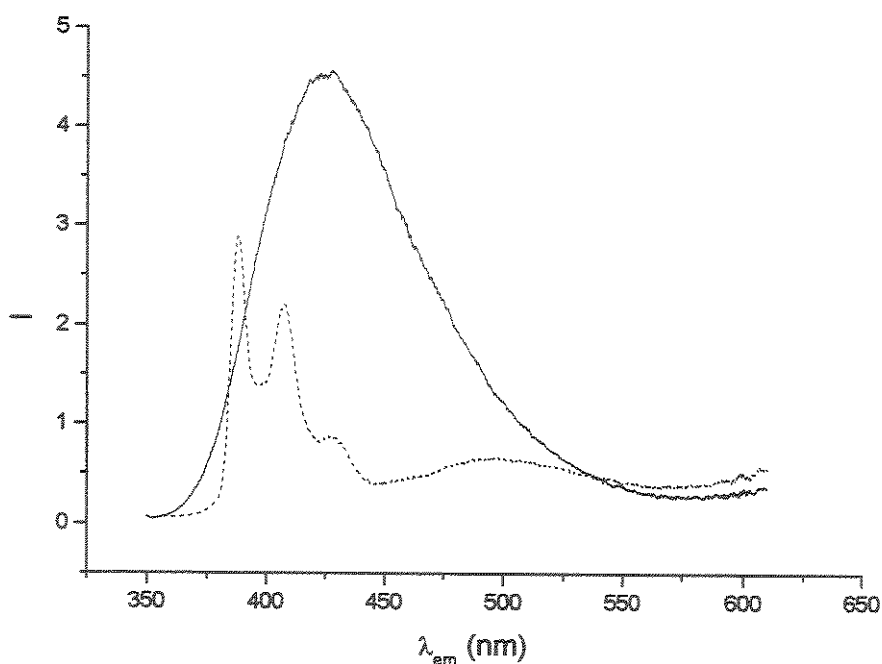


Figura 32: Espectros de DBC 20 μ M (linha contínua) e de PyPC: DOPC 3:97 em concentração final de 36 μ M (linha pontilhada) em tampão acetato 20 mM pH 5,50. As concentrações representam condições originais antes de medidas de partição (DBC) e de diluições sucessivas (PyPC).

Vimos que o PyPC possui uma intensidade razoável de fluorescência na faixa da DBC, além de não sofrer degradações nos pH utilizados. Realizamos inicialmente testes de correção compensando-se a atenuação da fluorescência da DBC pela fluorescência do pireno. A Figura 33 mostra a atenuação da fluorescência detectada devido a presença de DOPC.

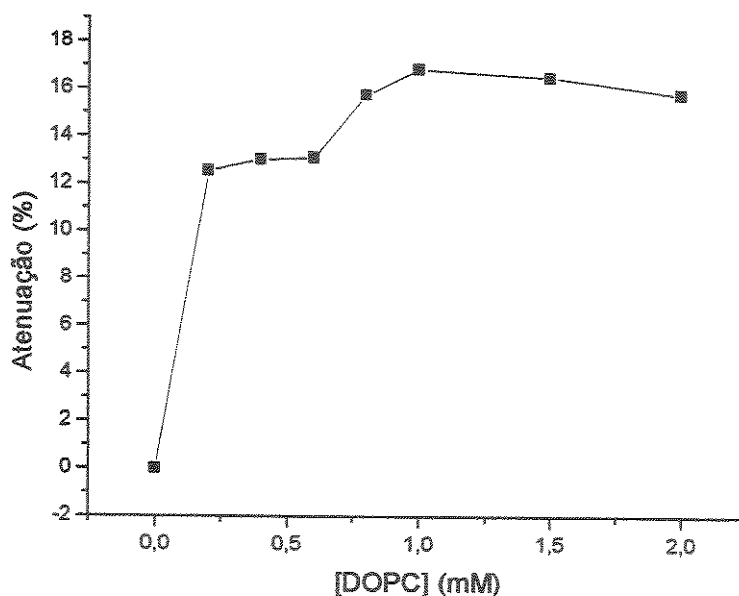


Figura 33: Atenuação da fluorescência de PyPC a 412 nm pela presença de SUV de $0,1 \mu\text{M}$ compostas por DOPC. A atenuação é calculada em relação a fluorescência do PyPC em tampão. Excitação a 324 nm. Tampão acetato 20 mM pH 5,5.

Como podemos notar, a atenuação cresce rapidamente entre 0 e 1 mM de SUV compostas de DOPC, aparentemente chegando a 17% da fluorescência que chega ao detector. Nesta Figura torna-se claro quão relevante é o efeito da turbidez sobre as medidas realizadas.

A fim de testar a utilidade da correção pela medição de densidade óptica das amostras, envolvendo a **Equação 8**, preparamos várias soluções com diferentes concentrações de sílica, que espalha eficientemente a luz. A **Figura 34** compara os dados originais e a correção apresentada.

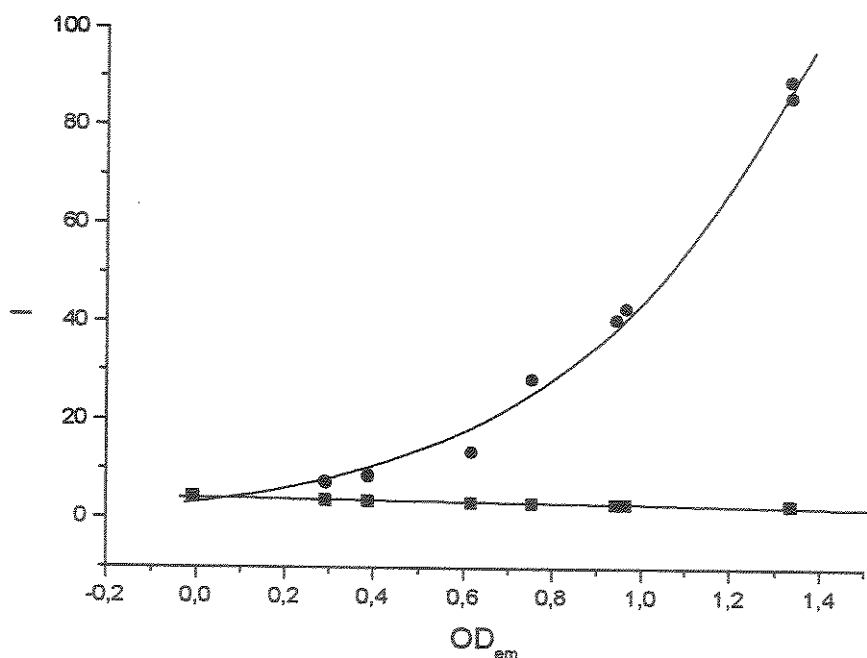


Figura 34: Comparação entre intensidade experimental (quadrado) e corrigida (círculo) a diferentes OD_{em} . As intensidades são medidas no λ_{ex} de 406 nm. DBC 20 μ M em tampão carbonato 20 mM. Compare a intensidade para OD_{em} nula (ausência de espalhamento) com as demais intensidades.

Pela **Figura 34** vemos que o ajuste pela **Equação 8** tem utilidade restrita a valores de OD_{em} muito pequenos, que não correspondem a turbidez de nossas amostras. Dessa forma, não iremos aplicar este método para corrigir a turbidez provocada por membranas.

Primeiramente mostramos o gráfico do logaritmo natural da intensidade de fluorescência do PyPC versus a concentração de partículas espalhadoras (h), que no caso corresponde a concentração de membrana a fim de verificarmos a aplicabilidade da **Equação 11**.

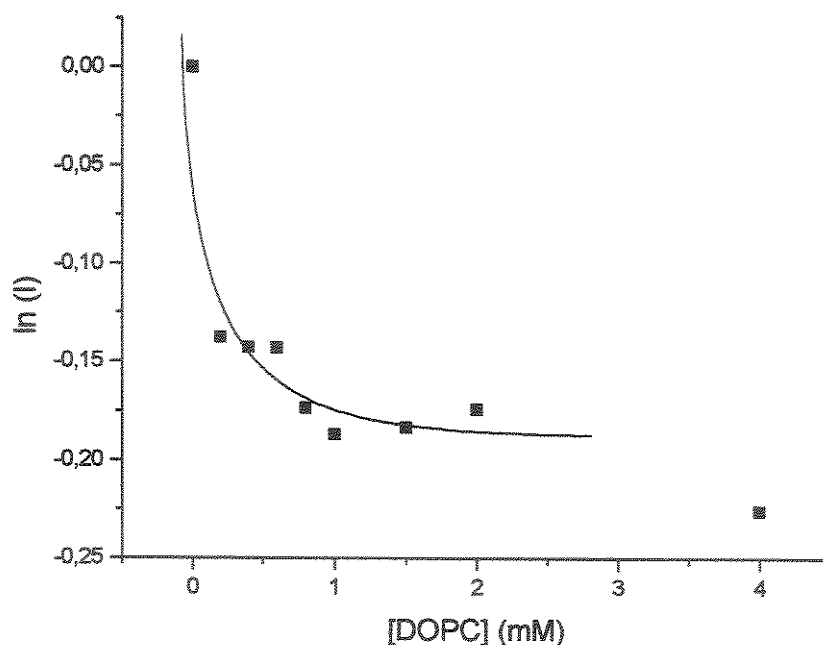
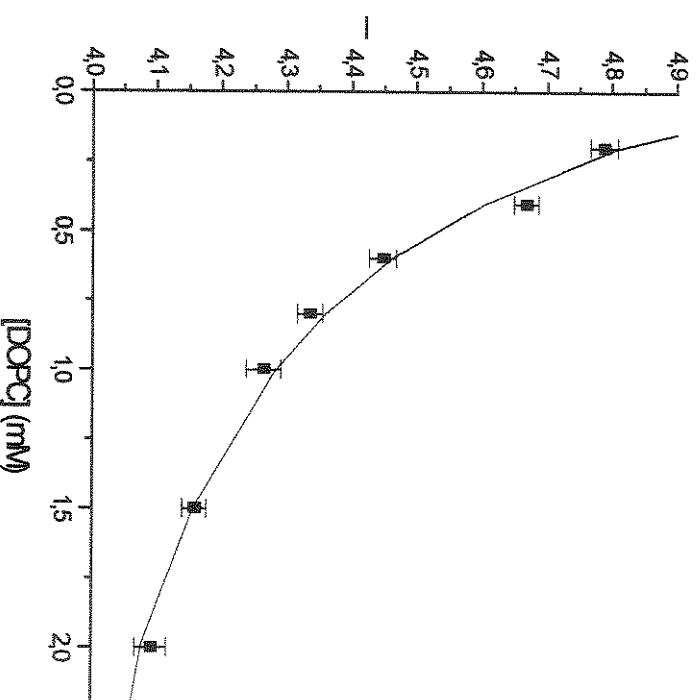
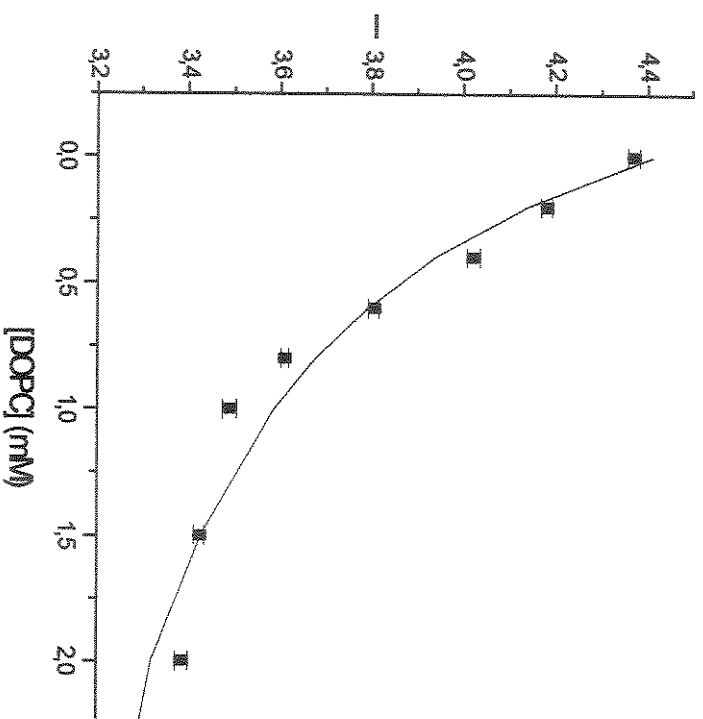


Figura 35: Gráfico de logaritmo natural da intensidade de fluorescência do PyPC versus concentração de vesículas de DOPC. Tampão acetato 20 mM pH 5,50. Para maiores detalhes, ver texto.

Não notamos na **Figura 35** qualquer indício de que o logaritmo natural da intensidade seja linear com a concentração de DOPC. Desta maneira, a correção da turbidez da amostra não é bem suscetível ao método das diluições sucessivas (ver Materiais e Métodos). O método também parece ser aplicável até 2 mM, enquanto valores próximos a 4 mM apresentam uma redução de fluorescência não prevista.

Basicamente calculou-se a razão intensidade em tampão/intensidade da medida do PyPC para cada λ_{em} e multiplicou-se este fator pela intensidade da DBC para o mesmo λ_{em} na mesma condição experimental. A partição da DBC, sem e com esta correção, é mostrada na **Figura 36**.



I_0	4.4119 ± 0.072	5.15 ± 0.13
$I_{m\acute{a}x}$	2.80 ± 0.25	3.74 ± 0.13
K_b	(1.05 ± 0.40) 10 ³ M ⁻¹	(1.60 ± 0.62) 10 ³ M ⁻¹
χ^2	0.006	0.00155

Figura 36: Ligação da DBC protonada em membranas, sem correção (esquerda) e com correção espectral relativamente ao PyPC (direita) em pH 5,5. Os parâmetros do ajuste da **Equação 12** aos respectivos gráficos são a intensidade em ausência I_0 , a intensidade para concentração de membrana extrapolada ao infinito $I_{m\acute{a}x}$, a constante de ligação K_b e o χ^2 do ajuste.

Vemos que o ajuste dos dados ao modelo de ligação é muito melhor se realizarmos esta correção, o que pode ser verificado pela distribuição dos pontos em relação ao ajuste e também pelo valor do χ^2 . Faz-se necessário agora aplicar este método para os experimentos com membranas nos demais pH.

Assim, chegamos a um método eficaz para eliminação de efeitos de espalhamento de luz por amostras turvas, como é o caso especial de suspensões de membranas. Como observado em outros trabalhos (Lentz *et al.*, 1979; Eisinger & Flores, 1985), os fatores de correção são particulares para a amostra, o que exige a aplicação deste método sempre que for realizada medida fluorimétrica com amostras turvas.

Domínios lipídicos observados por fluorescência

O estudo da interação da DBC com membranas artificiais também pode nos prover o entendimento de efeitos mais globais deste AL, sobre membranas artificiais e biológicas.

Anestésicos locais são moléculas anfifílicas, que interagem com bicamadas (de Paula & Schreier, 1996). Em pH fisiológico, anestésicos como a DBC apresentam carga positiva, enquanto entre os fosfolipídios encontrados em membranas biológicas encontramos alguns como a fosfatidilserina, fosfatidilinositol e ácido fosfatídico, com carga negativa. Medidas anteriores de nosso laboratório usando RPE (de Paula & Schreier, 1995) e os experimentos de RMN de prótons conduzidos por Wakita *et al.* (1992) além dos resultados de fluorescência aqui relatados sugerem que a DBC encontra-se preferencialmente localizada na superfície dos lipossomos de PC. Há também relatos na literatura sobre a interação eletrostática entre a DBC e lipídios aniônicos de membranas (Westman *et al.*, 1982; Cullis & Verkleij, 1979; Barghouthi *et al.*, 1993).

Esses achados suportam a proposição de que haja competição entre a DBC e os íons cálcio, os quais são capazes de interagir com grupamentos fosfato e cabeças polares de lipídios negativamente carregados. A nossa motivação para realizar experimentos de efeito da DBC sobre domínios lipídicos induzidos por cálcio baseia-se na capacidade já descrita de competição entre estes agentes (Lewartowski *et al.*, 1998) e pela observação de que a DBC pode reverter efeitos em membranas provocados pelo cálcio, como indução de fase hexagonal em membranas de PS (Cullis & Verkleij, 1979).

Passamos assim a estudar o efeito da DBC e do cálcio sobre a organização lipídica em bicamadas. Através de fluorescência, buscamos estudar este aspecto usando sondas membranares como lipídios marcados com pireno (que quando em alta concentração, formam excímeros).

Inicialmente, em membranas de DOPC: POPA: PyPC 87: 10: 3, verificamos um aumento da forma excimérica do PyPC com o aumento da concentração de cálcio, como mostrado na **Figura 37**.

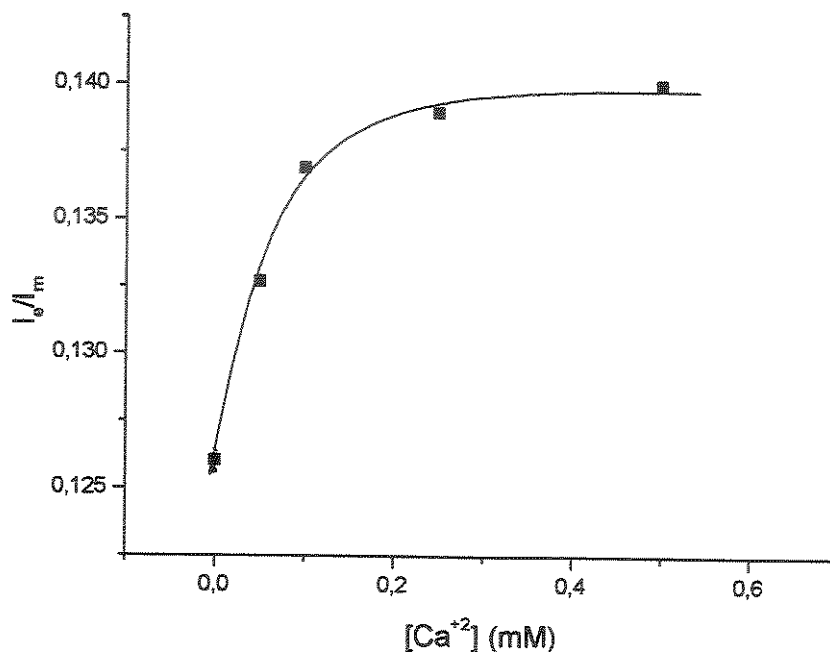


Figura 37: Variação da razão entre intensidade de fluorescência de excímeros (I_e) e monômeros (I_m) de PyPC incorporado em membranas de PyPC: POPA: DOPC 3: 10: 87 com a concentração de cálcio. Tampão acetato 20 mM, pH 5,5.

Este aumento de formação de excímero indica uma maior proximidade entre os PyPC, i.e., uma organização em domínios, destes lipídios. Não pudemos verificar essa distribuição dos lipídios em presença da DBC devido a sobreposição de fluorescência desta com a do lipídio marcado. Tentamos realizar subtrações espectrais e reconstrução espectral da DBC a partir de λ_{em} em que a PyPC não emitia, sem sucesso. A dificuldade para essas operações reside também no fato de que possíveis alterações na proporção I_e/I_m com a adição da DBC impossibilitariam este procedimento.

Ressonância Paramagnética Eletrônica

A técnica de RPE permite-nos observar a dinâmica de formação de domínios lipídicos através do acompanhamento de parâmetros espectrais, como descrito na Introdução, seção Monitoramento de domínios lipídicos por RPE. As diferenças espectrais do marcador em meio isotrópico e em membranas podem ser facilmente notadas entre os espectros mostrados na **Figura 38**. Na **Figura 38 C** vemos a distorção do espectro em membrana – com perda da linha de base espectral - causado pela interação *spin-spin*, em condições de alta concentração do marcador 5-MeSL (espectro de troca).

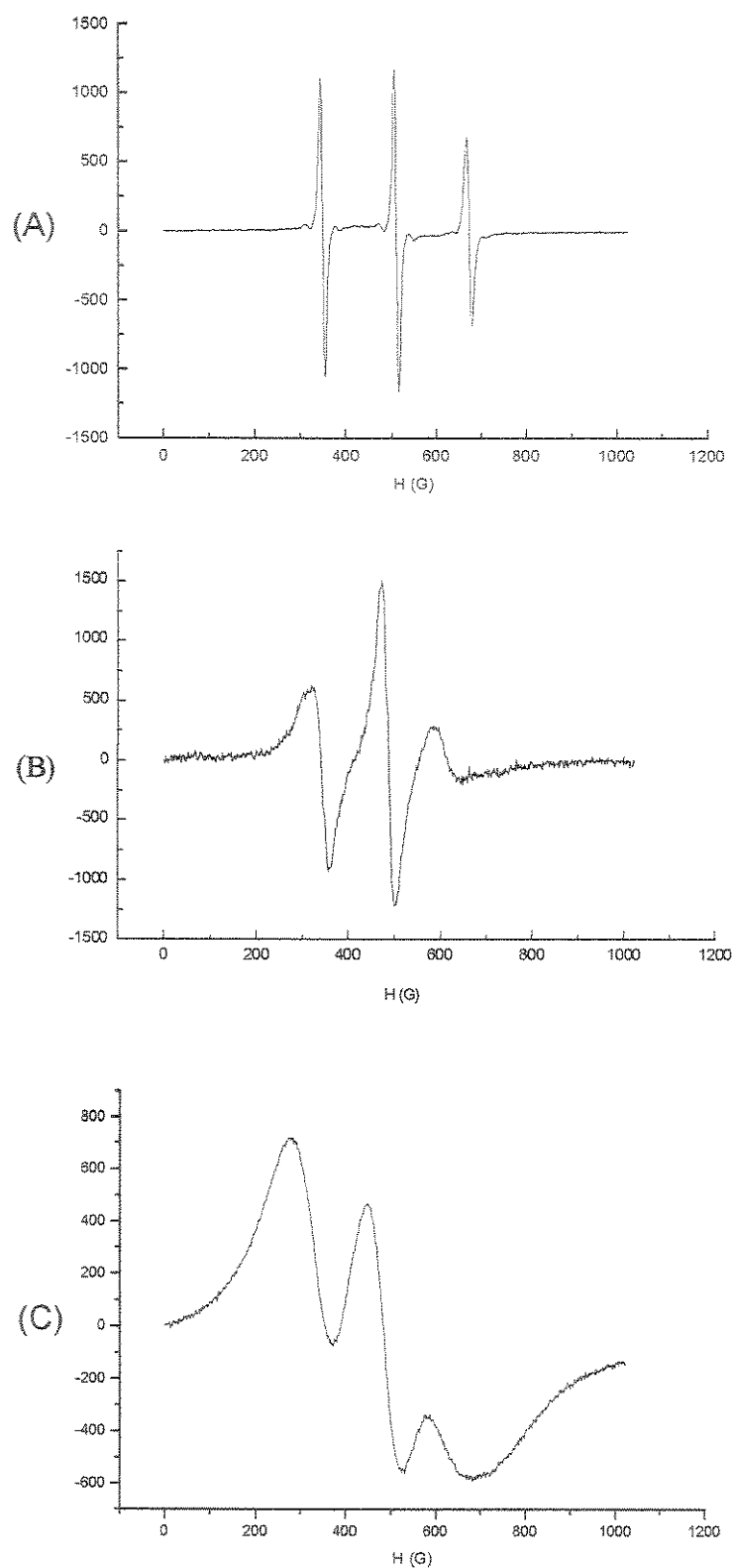


Figura 38: Espectro de RPE do marcador 5-MeSL em meio aquoso (A), incorporado a membranas de fosfatidilcolina de ovo, nas proporções de 1% (B) e 15 mol% (C).

Procuramos observar que tipo de mudanças o cálcio, a DBC e a adição concomitante de ambos causaria na membrana, observada por RPE. A **Figura 39** aponta alguma das mudanças espectrais observadas em membranas contendo 10% POPA na presença desses aditivos.

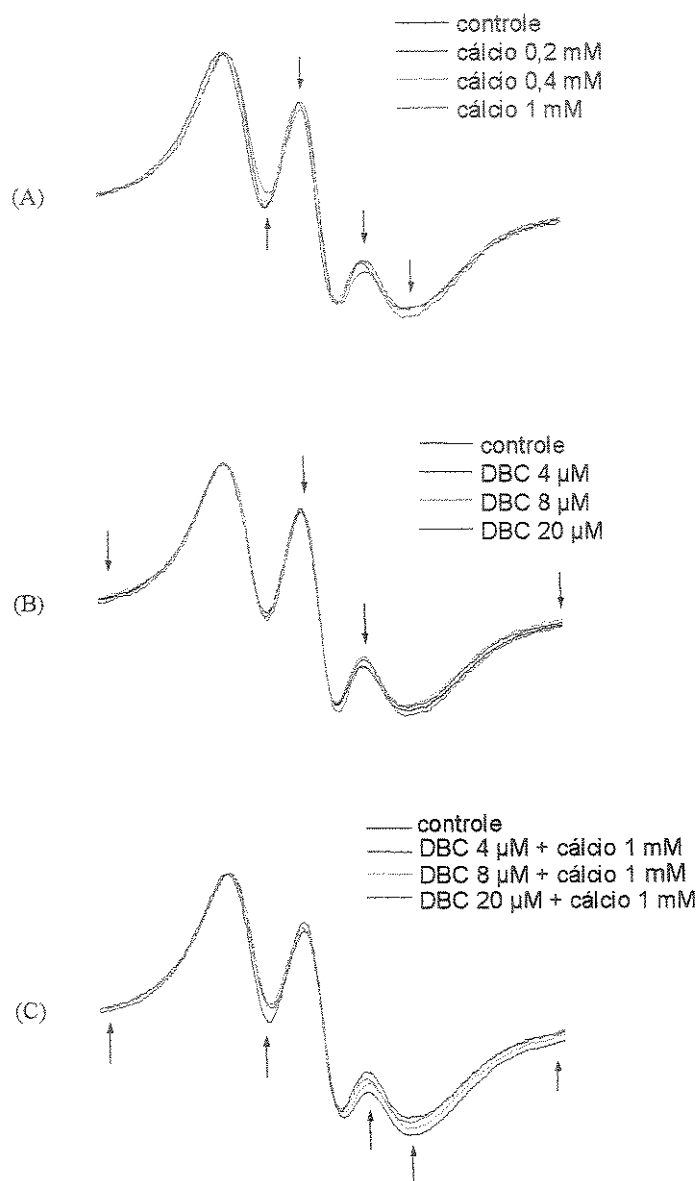


Figura 39: Espectro de RPE de membranas compostas por DOPC:POPA:5-MeSL nas proporções molares de 75:10:15 na presença de concentrações crescentes de cálcio (A), DBC (B) e de DBC em presença de cálcio 1 mM pré-incubado por pelo menos 1 h (C). As setas indicam a tendência do comportamento espectral com o aumento da respectiva adição. Tampão Tris 20 mM, pH 7,4.

O cálcio antagoniza as alterações espectrais devidas à partição da DBC e com isso temos a indicação de que podemos detectar a formação de domínios nestas faixas de concentração.

Apesar de estarmos utilizando altas concentrações de marcador em membrana, procuramos observar a perturbação causada pelos aditivos sobre a distribuição do marcador de *spin* 5-MeSL, usando o parâmetro h_{+1}/h_0 , apresentado e descrito na Equação 5. A Figura 40 mostra estes resultados.

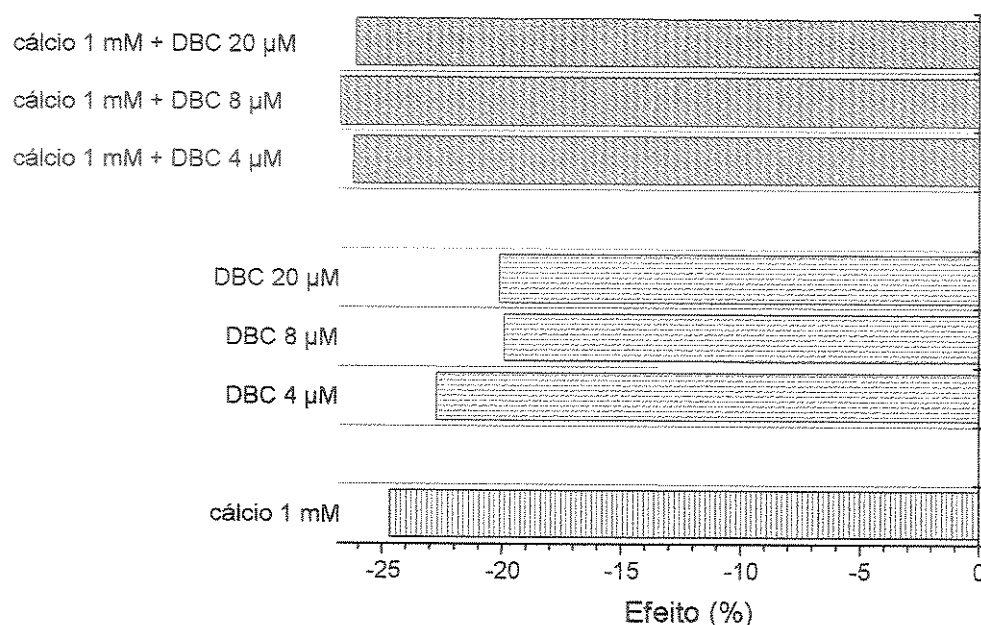


Figura 40: Efeito de perturbação do marcador de *spin* nitróxido em membranas ($\Delta h_{+1}/h_0$) compostas por DOPC: POPA: 5-MeSL nas proporções molares de 75:10:15 na presença de concentrações crescentes de cálcio (linhas verticais), DBC (linhas horizontais) e de DBC em presença de cálcio 1mM, pré-incubado por pelo menos 1 h (linhas em diagonal). Concentração total de lipídios de 4 mM.

Contrariamente ao que sugere a Figura 39, Todos os aditivos parecem perturbar de forma semelhante o marcador. Diferem, no entanto, na intensidade de perturbação. O cálcio parece causar um efeito maior (25%) que a DBC. No entanto, a combinação de DBC com membranas incubadas previamente com cálcio parece exercer um efeito maior que o cálcio ou a DBC isoladamente.

A análise de perturbação da membrana segundo $\Delta h_{+1}/h_0$ em concentrações tão altas de marcador em membrana como no nosso caso deve ser, no mínimo, cautelosa. Nas concentrações usadas, de 15% de MeSL, o perfil espectral das membranas é profundamente alterado, o que implica que podemos estar presenciando deformações significativas dos valores de h_{+1} e de h_0 , e consequentemente de $\Delta h_{+1}/h_0$. As modificações destes valores com as diferentes adições à amostra com membrana também não podem ser formalmente considerados para análise, uma vez que a própria distribuição do marcador é passível de alteração, e portanto de deformar diferencialmente h_{+1} e h_0 .

Utilizando $\Delta h_{+1}/h_0$ como um parâmetro inicial e já bem estabelecido para acompanhar mudanças do comportamento de lipídios, observamos a variação deste efeito. A alteração de 20 a 25% deste parâmetro, como indicado na **Figura 40**, é significativa e pode indicar alteração na distribuição do marcador de *spin* (domínios lipídicos).

Estudamos a formação de domínios lipídicos de forma mais acurada, utilizando o parâmetro α (Devaux & McConnell, 1971) obtido de medidas inerentes à forma do espectro, que são indicadas na Introdução, seção RPE. A princípio, assumimos que o controle correspondia a uma situação de homogeneidade da membrana, sem a organização dos lipídios em domínios. Este pressuposto é razoável, por estarmos trabalhando em um pH e temperatura que não produzem a formação de domínios e não estarmos utilizando íons indutores de segregação lateral na composição do tampão (Jacobson & Papahadjopoulos, 1975).

Inicialmente apresentamos a cinética de indução de domínios em diferentes concentrações de cálcio, como mostrado na **Figura 41**.

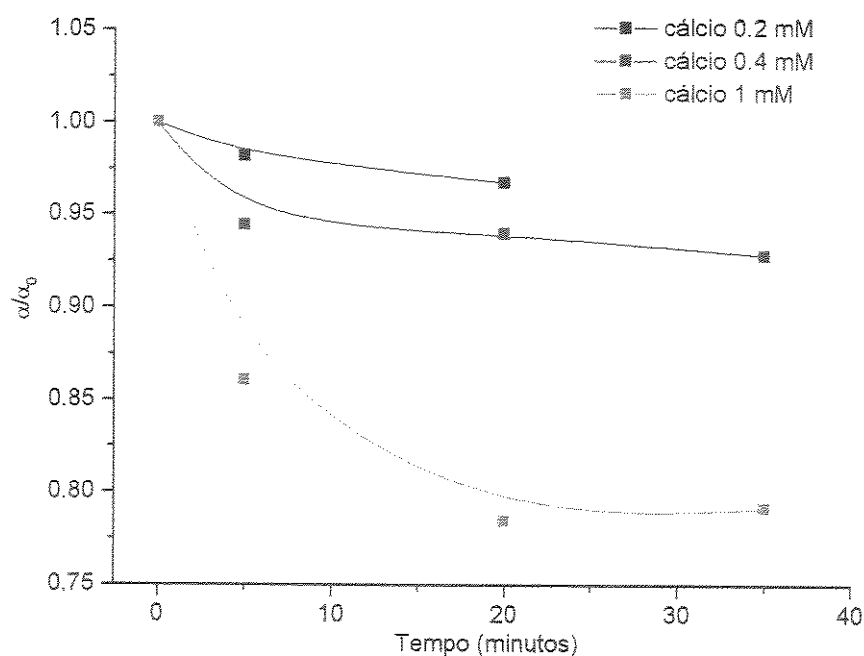


Figura 41: Parâmetro de alargamento espectral α/α_0 de membranas compostas por DOPC: POPA: 5-MeSL 75:10:15 em presença de cálcio 0,2 mM (preto), 0,4 mM (vermelho) e 1 mM (verde) acompanhado ao longo do tempo. Tampão Tris 20 mM, pH 7,4. Concentração total de lipídios de 4 mM.

A **Figura 41** mostra-nos que o efeito do cálcio alcança o equilíbrio com a concentração correspondente à usada. Apesar de ser difícil determinarmos exatamente o tempo onde o efeito máximo é alcançado para cada concentração de cálcio, podemos determiná-lo para a incubação com cálcio 1 mM, que é cerca de 20 min. A **Figura 42** mostra de maneira mais clara a contraposição de efeitos da DBC na presença e na ausência de cálcio, previamente incubado.

Esse efeito oposto da DBC deve refletir seu efeito desorganizador da bicamada, já observado quanto a variação de h_{+1}/h_0 (**Figura 40**).

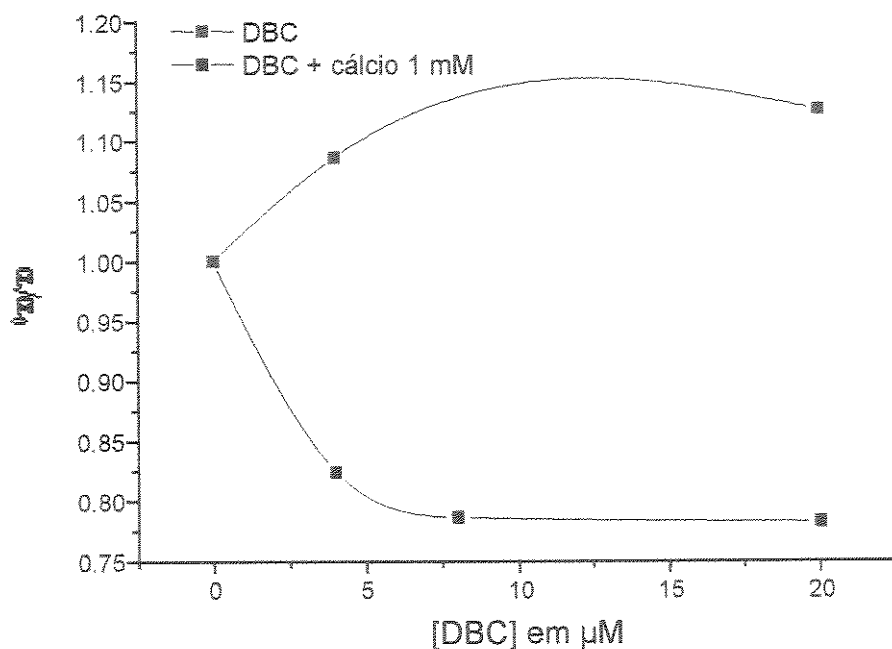


Figura 42: Parâmetro de alargamento espectral α/α_0 de membranas compostas por DOPC: POPA: 5-MeSL 75:10:15 em presença de concentrações crescentes de DBC com (preto) e sem cálcio 1 mM (vermelho). Tampão Tris 20 mM, pH 7,4. Concentração total de lipídios de 4 mM.

É claro na **Figura 42** o antagonismo de efeitos da DBC sozinha e na presença de cálcio previamente incubado com as membranas.

Averiguamos também qual o efeito máximo conseguido com adição de cálcio e qual a concentração mínima para tal. A **Figura 43** mostra-nos a variação do parâmetro α/α_0 com a adição de cálcio.

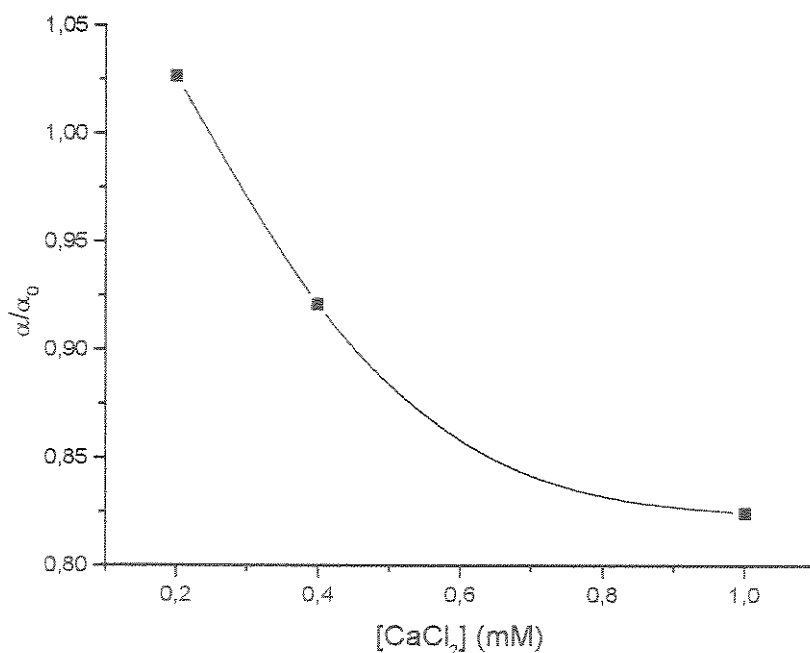


Figura 43: Parâmetro de alargamento espectral α/α_0 de membranas compostas por DOPC: POPA: 5-MeSL 75:10:15 em presença de concentrações crescentes de cálcio, lidas a 35 min. após adição. Tampão Tris 20 mM, pH 7,4. Concentração total de lipídios de 4 mM.

Temos, a partir da **Figura 43** que a concentração mínima de cálcio para alcançar-se o efeito mínimo é de 0,6 mM, e que o efeito mínimo obtido é de 0,82 (18%) para 4 mM de membrana. Note-se que temos 0,4 mM de lipídios aniônicos e que somente metade destes estão voltados para a solução contendo cálcio, Praticamente todos os grupamentos aniônicos dos lipídios estão ionizados neste pH.

A **Figura 44** mostra os valores do parâmetro α padronizado em relação ao controle (α/α_0) para as diferentes amostras.

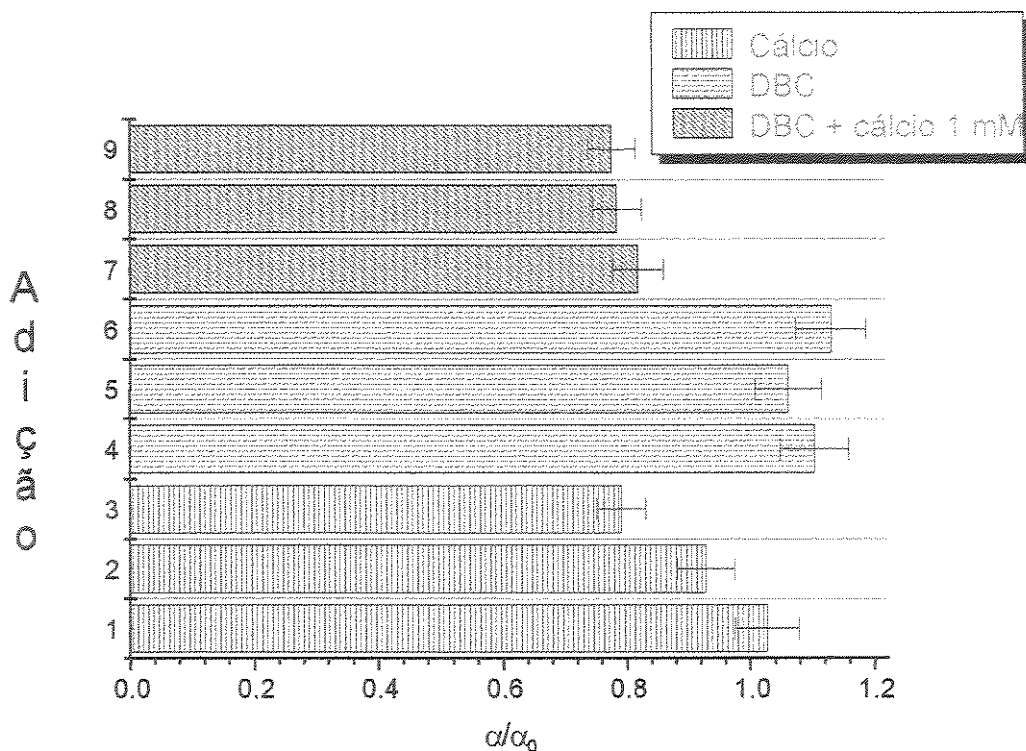


Figura 44: Parâmetro de alargamento espectral α/α_0 de membranas compostas por DOPC: POPA: 5-MeSL 75:10:15 em presença de cálcio 0,2 mM (1), 0,4 mM (2), 1 mM (3), DBC 4 μ M (4), 8 μ M (5) 20 μ M (6), DBC 4 μ M + 1mM cálcio (7), DBC 8 μ M + 1mM cálcio (8) e DBC 20 μ M + 1mM cálcio (9). Tampão Tris 20 mM, pH 7,4. Concentração total de lipídios de 4 mM.

Pela **Figura 44** a DBC e o cálcio têm efeitos antagônicos quanto a formação de domínios lipídicos, quando vistos isoladamente. A DBC parece diminuir o efeito de troca entre os marcadores, enquanto concentrações crescentes de cálcio implicam em aumento de encontro entre os marcadores, que pode ser traduzido em aumento da formação de domínios. A mistura de concentrações crescentes de DBC em vesículas previamente incubadas com cálcio, no entanto, parece potencializar o efeito induzido pelo cálcio sobre a distribuição lipídica.

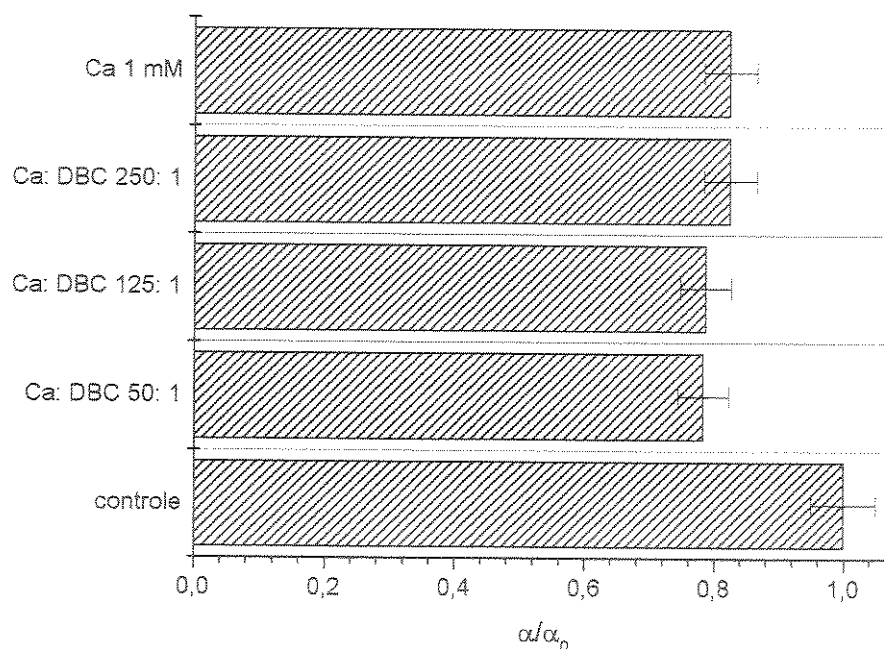


Figura 45: Parâmetro de alargamento espectral α/α_0 de membranas compostas por DOPC: POPA: 5-MeSL 75:10:15 em presença de diferentes proporções de cálcio: DBC. Tampão Tris 20 mM, pH 7,4. Concentração total de lipídios de 4 mM. Concentração total de cálcio (exceto no controle) de 1 mM.

A **Figura 45** mostra que o efeito das proporções de cálcio: DBC sobre o parâmetro α/α_0 não varia significativamente, desde que o cálcio esteja presente.

Quando adicionamos DBC a membranas incubadas previamente com cálcio por mais de meia hora (i.e., em um relativo equilíbrio de formação de domínios), não percebemos mudança significativa do parâmetro α , o que pode significar que a DBC, nesta faixa de concentração ou de proporção com o cálcio, não cause alterações na distribuição de domínios induzida pelo cálcio. As proporções usadas, no entanto, são muito baixas comparadas aos valores para competição efetiva entre a DBC e o cálcio (Papahadjopoulos, 1972).

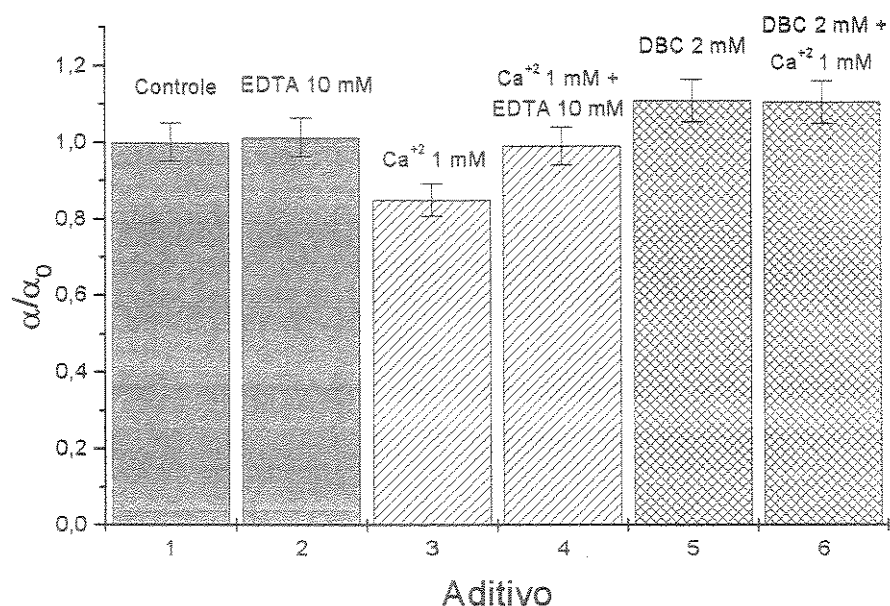


Figura 46: Comparação de valores de α/α_0 de espectros de membranas a 4 mM de DOPC: POPA: 5-MeSL 75: 10: 15 em presença de Ca^{+2} , EDTA e DBC. Tampão Tris 20 mM, pH 7,4. Medidas feitas após não menos que 5 horas de pré-incubação.

As concentrações escolhidas justificam-se porque a maior parte da DBC está particionada na membrana na concentração de 4 mM de lipídios. A concentração de cálcio é equivalente a de DBC e é suficiente para induzir domínio nestas vesículas. A concentração de EDTA, 10 vezes maior que a do cálcio, garante que todo o cálcio irá ser quelado por esta molécula.

Na **Figura 46** vemos que o cálcio reduz significativamente o valor de α/α_0 , o que significa aumento da formação dos domínios lipídicos.

O EDTA, que é um quelante de Ca^{+2} e Mg^{+2} , não altera significativamente a distribuição do marcador na membrana quando comparado ao controle, mas é capaz de impedir a indução de domínios lipídicos pelo cálcio. É clara por este experimento a identificação do Ca^{+2} como agente indutor de domínios.

Ao adicionarmos DBC a estas membranas, temos um pequeno aumento aparente do valor de α/α_0 em relação ao controle. No entanto, se considerarmos ter uma distribuição homogênea de marcador na membrana, o valor de α/α_0 deveria ser máximo. Duas hipóteses podem explicar este fenômeno: o marcador no controle não

está homogeneamente distribuído na membrana ou o parâmetro α/α_0 é sensível a outros efeitos, que não a distribuição (proximidade espacial) de marcadores.

Tokutomi *et al.* (1980) relatam que o pH e a temperatura podem alterar a distribuição lipídica de membranas compostas por DOPS. No nosso caso, o pH 7,4 não parece favorável a indução *per se* de domínios lipídicos e a temperatura do experimento é maior que a de transição de fase de membranas de DOPC: POPA. Além disso, a repulsão eletrostática entre as moléculas de POPA e a perturbação estérica do marcador nestas condições favorecem o máximo afastamento dos lipídios (Someharju *et al.*, 1985).

Quanto a suscetibilidade do parâmetro α/α_0 a outros fatores que não a distribuição do marcador, não podemos afirmar muito. Este parâmetro é empírico e foi usado para quantificar domínios por temperatura, íons e outros agentes que não penetram na membrana (Tokutomi *et al.*, 1980). A intercalação da DBC em membranas fosfolipídicas pode causar, *a priori*, alterações neste parâmetro que não tenham relação direta com a interação entre os marcadores.

De qualquer maneira, vemos que os valores de α/α_0 são equiparáveis entre amostras com DBC somente e de DBC na presença de cálcio, enquanto entre amostras com cálcio somente e de cálcio na presença de DBC a diferença é de duas vezes a de DBC para o controle.

Embora os valores de α/α_0 com DBC não estejam muito fora do erro experimental, os resultados experimentais sugerem que existe uma influência da DBC e do cálcio sobre este parâmetro. Temos novamente duas possibilidades.

- O cálcio pode estar amplificando o efeito original da DBC na membrana. Porém se este efeito é relacionado com a partição da DBC em membranas, teríamos razões para crer no contrário. Há descrição na literatura (Barghouthi *et al.*, 1993a) de que a partição da DBC protonada em membranas aniônicas é reduzida com o aumento da força iônica do meio, provavelmente devido a neutralização parcial de cargas da membrana e redução da interação eletrostática da DBC com aquela. Isto deveria resultar, portanto, numa redução da partição e do efeito da DBC sobre a membrana, qualquer que seja este efeito. Ainda resta a possibilidade de um aumento específico, pelo cálcio, do efeito da DBC ainda incorporada à membrana.
- A DBC pode estar anulando o efeito do cálcio. Se, em nosso caso, o efeito do cálcio responsável pela diminuição de α/α_0 é a indução de domínios lipídicos, a DBC deve

reverter a indução de domínios lipídicos pelo cálcio. Já é bem descrito em literatura a habilidade da DBC em deslocar íons cálcio de lipídios aniônicos (Cullis & Verkleij, 1979), bem como de reverter outros efeitos do cálcio sobre membranas (Hornby & Cullis, 1981). É razoável portanto imaginar a ação da DBC deslocando íons cálcio das cabeças polares e revertendo ou impossibilitando a formação de domínios lipídicos.

Medidas análogas usando o magnésio, um íon alcalino terroso como o cálcio, são mostradas na **Figura 47**.

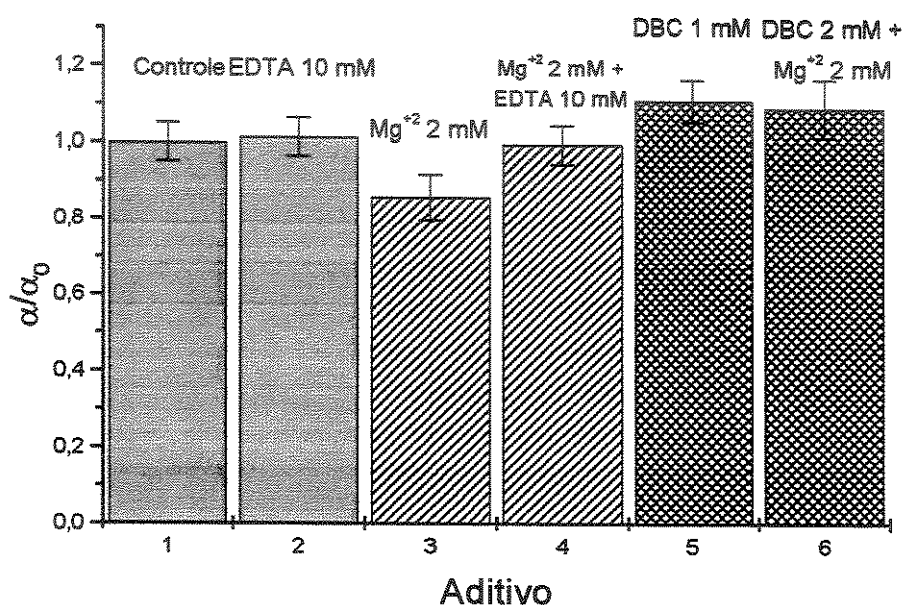


Figura 47: Comparação de valores de α/α_0 de espectros de membranas a 4 mM de DOPC: POPA: 5-MeSL 75: 10: 15 em presença de Mg^{+2} , EDTA e DBC. Tampão Tris 20 mM, pH 7,4. Medidas feitas após 5 horas de incubação.

Observa-se que o magnésio também é capaz de induzir domínios lipídicos neste sistema e que, da mesma forma observada com o cálcio, a DBC pode reverter estes domínios.

Devemos notar para os experimentos com cátion bivalentes que estes não difunde-se facilmente através da bicamada lipídica e que portanto não devem estar agindo diretamente sobre cabeças lipídicas aniônicas que estejam voltadas para o interior do lipossomo. Existem com isso duas possibilidades para interpretação dos dados: (i) a de que não tenha sido alcançado um verdadeiro equilíbrio de efeito dos

cátions, que diminuiria ainda mais acentuadamente os valores de α se deixássemos a incubação ocorrer por tempo suficiente ou (ii) que a formação de domínios de POPA induzida por cálcio ocorra de forma acoplada nas duas camadas, sem necessitar a presença efetiva do cálcio no interior do lipossomo para que lipídios negativamente carregados camada interna distribuam-se em domínios.

No primeiro caso, tem-se como respaldo vários experimentos em que a incubação necessária para alcançar-se um efeito máximo levou um tempo bem maior que o presenciado no nosso experimento, podendo chegar a dias. Deve-se perceber que as técnicas usadas neste experimentos exigem tempos peculiares para alcançar-se um efeito máximo, que é interpretado como formação de domínios.

Quanto ao segundo caso, existem exemplos na literatura em que a indução de domínios de alguns tipos de lipídios em uma camada é acompanhado por uma redistribuição dos mesmos lipídios presentes na outra camada de forma co-localizada (Haverstick & Glaser, 1988). Se isto estiver ocorrendo em nosso sistema, temos que ambas as camadas estão em iguais condições de distribuição lipídica e que o equilíbrio alcançado é real.

A DBC, no entanto difunde-se rapidamente através das camadas lipídicas, e o equilíbrio observado deve ser um equilíbrio de fato. A cinética da difusão da DBC entre camadas e sua partição para a membrana são bastante rápidas (Naharashi & Frasier, 1970; de Paula & Schreier, 1996), não devendo ser maior que da ordem de segundos.

Temos a partir da **Figura 46** um quadro que sugere uma capacidade da DBC de reverter domínios lipídicos induzidos pelo cálcio e pelo magnésio.

A partir disso, podemos vislumbrar implicações fisiológicas importantes, tanto no fenômeno de anestesia como em outras alterações metabólicas.

Papahadjopoulos (1972) mostra a existência de uma forte correlação entre a capacidade de anestésicos locais e o deslocamento de íons cálcio de filmes de lipídios aniônicos.

Vários eventos metabólicos podem envolver a participação de domínios lipídicos, como o brotamento viral (Trommeshauser & Galla, 1998; Luan & Glaser, 1994), a ligação de proteínas extrínsecas à membrana (Mustonen *et al.*, 1987), o tráfico lipídico entre organelas (Kobayashi *et al.*, 1998), entre outras. Já foi sugerida a ação de anestésicos locais sobre a expressão de oncogenes mediada pela proteína quinase C (Nivarthi *et al.*, 1996), que poderia ser regulada por domínios lipídicos (Shen *et al.*, 1996).

A ação de anestésicos nestes eventos (com uma diversidade interessante de estruturas moleculares) pode ter nos domínios lipídicos um denominador comum em seu mecanismo.

Fizemos também medidas de α/α_0 para amostras incubadas com concentrações maiores de DBC e cálcio, que são mais próximas às condições fisiológicas. A **Figura 48** mostra estes resultados.

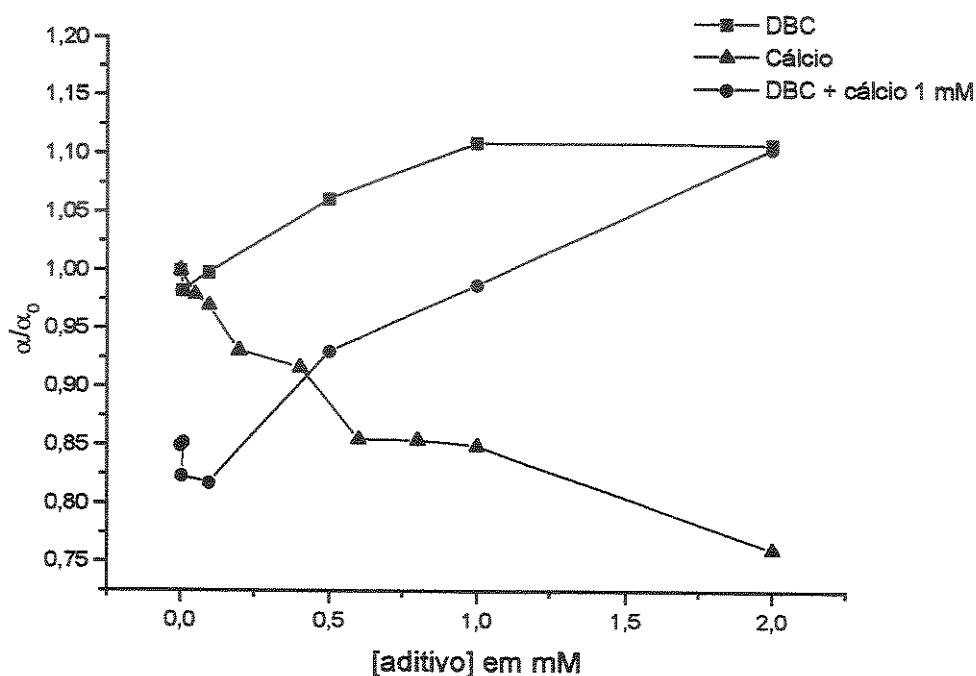


Figura 48: Variação de α/α_0 com adições crescentes de DBC (quadrado), cálcio (triângulo) e DBC em presença de cálcio 1 mM (círculo) a membranas compostas por DOPC: POPA: 5-MeSL 75: 10:15. Tampão Tris 20 mM, pH 7,4. Concentração lipídica total de 4 mM. O tempo de incubação foi de 5 horas. T.A.

Vemos na **Figura 48** um aumento nítido de α/α_0 com o aumento da concentração de DBC, já descrito na **Figura 42**. Também percebemos que a baixas concentrações de DBC, α/α_0 parece diminuir. Talvez haja uma prevalência do efeito eletrostático a baixas concentrações de DBC que promova a redução de α/α_0 de maneira análoga ao cálcio. Um estudo da interação da DBC com estas membranas por RPE e outros métodos nesta faixa de concentração de DBC e um entendimento mais rigoroso do parâmetro α/α_0 podem contribuir para a elucidação deste fato.

Adições crescentes de cálcio a estas membranas promovem uma diminuição de α/α_0 que é característico de um aumento de formação de domínios lipídicos. Aparentemente não alcançamos uma saturação na indução de domínios apesar da razão máxima entre as concentrações totais de cálcio e POPA ser de 2,5.

A adição crescente de DBC e fixa de cálcio 1 mM a estas membranas exhibe uma fase de decréscimo de α/α_0 para concentrações baixas de DBC mais conspícua que quando da adição de somente DBC. Na maioria das concentrações adicionadas, o parâmetro α/α_0 parece crescer com a adição de DBC.

O aumento de α/α_0 tende a saturação, com concentrações de DBC mais altas. Consideramos fortemente a possibilidade de esse aumento refletir a desorganização da membrana causada pela inserção da DBC, já descrito anteriormente (de Paula & Schreier, 1995) por técnicas de RPE e fluorescência. Se for esta a causa do efeito a saturação observada refletiria a saturação da fase membranar, por ter sido atingida a solubilidade aquosa do AL.

É importante considerarmos que para todas as concentrações de DBC sozinha notou-se um aumento significativo do parâmetro α e que se esta alteração não estiver relacionada com a dinâmica de segregação lateral de lipídios, podemos estar presenciando um mascaramento do valor de α correspondente a real distribuição de lipídios provocada pela DBC. Como esta interferência da DBC pode resultar um aumento que pode ser superior a +10%, podemos estar induzindo uma distribuição de lipídios ainda maior que quando adicionou-se somente cálcio.

É notável na **Figura 48** o comportamento em degraus da curva de concentração de cálcio versus α/α_0 . Este tipo de curva já foi observada em membranas contendo diferentes concentrações de pireno e é passível de modelagem tratando a membrana como uma microorganização dos lipídios em padrões periódicos regulares no plano da membrana (Somerharju *et al.*, 1985; Mustonen *et al.*, 1987; Tang & Chong, 1992). A organização lateral como cristal de grande alcance de marcadores de *spin* já foi sugerida por Berclaz & McConnell (1981).

Para que este modelo seja aplicável, alguns pressupostos são necessários: (i) o parâmetro α/α_0 é dependente da distância dos marcadores de *spin*; (ii) as cadeias acila estão dispostas em um padrão hexagonal; (iii) os marcadores de *spin* representam elementos hóspedes, que perturbam o arranjo regular da membrana e (iv) estes

elementos hóspedes tendem a maximizar a distância a fim de minimizar a energia livre total (Someharju *et al.*, 1985).

Tais pressupostos são razoáveis no nosso caso. O parâmetro α/α_0 é uma medida de alargamento espectral, apesar de ser um parâmetro empírico, presumivelmente causado pela interação de troca entre *spins*. Como a troca é dependente da distância, o modelo pode ser a explicação para a dependência discreta de α/α_0 com a concentração de cálcio.

Microscopia de fluorescência

A microscopia de fluorescência permite-nos visualizar a distribuição de lipídios marcados na 'célula' que desejamos estudar. Nossa abordagem para este estudo foi tripla: observamos variação no tamanho das 'células', quão heterogênea é a distribuição do lipídio marcado em toda a membrana 'celular' e medimos parâmetros de áreas que possuíam uma intensidade maior que a estipulada, que definimos como domínios lipídicos.

O marcador foi o NBD (**Figura 5**), covalentemente ligado a fosfolipídios negativos (DOPA ou DOPS). As 'células' são de três tipos: vesículas unilamelares gigantes (GUV), *ghosts* e eritrócitos. Nestes últimos monitoramos a distribuição de DOPA e de DOPS em experimentos separados. Para descrever os resultados da melhor forma possível, utilizamos os parâmetros já definidos na **Tabela 2**, além de avaliar suas eficiências na detecção de efeitos dos aditivos e de observar quão relacionados estão os parâmetros estudados.

Em seguida comparamos a distribuição lipídica nas 'células' sem a presença de qualquer aditivo. A **Tabela 10** mostra os resultados desta comparação.

Tabela 10: Comparação entre vesículas, *ghosts* e eritrócitos após 30 min. marcados com NBD-PA. O teste utilizado para detectar diferença entre as 'células' foi o de Kruskal-Wallis. (*) indica diferenças significativas entre tratamentos ($p < 0.05$). Os valores entre parênteses são as medianas, e fora dos parênteses, valores padronizados (Z) usados na análise de Kruskal-Wallis. O significado dos parâmetros é mostrado na **Tabela 2**.

Parâmetro	p	Vesícula	<i>Ghost</i>	Eritrócito
Número de domínios	0,112	-2,00 (0)	0,01 (1)	1,31 (1)
Área da célula	0,808	0,00 (1491)	0,62 (1412)	-0,61 (1395)
SD*	0,001	-3,59 (11,66)	-0,20 (15,32)	2,57 (17,60)
Enriquecimento*	0,027	-2,40 (0)	-0,41 (0,00234)	1,99 (0,00270)
Intensidade mínima	0,137	-1,96 (0)	0,26 (151)	1,04 (151)
Intensidade máxima*	0,042	-2,29 (0)	-0,30 (151)	1,81 (168)
Perímetro*	0,035	-2,31 (0)	-0,41 (4,24)	1,93 (17,6)
SDMedioDomCel*	0,041	-1,96 (0)	-0,92 (0)	2,20 (5,93)
MediaMediaDomCel*	0,039	-2,29 (0)	-0,37 (151)	1,88 (154)
MediaAreaDomCel*	0,031	-2,34 (0)	-0,43 (2)	1,97 (22)
MediaAreaRelativa	0,027	2,40 (0)	-0,41 (0,00155)	1,99 (0,0175)
AreaRelativaTotal*	0,024	-2,40 (0)	-0,50 (0,00155)	2,07 (0,0208)

A **Tabela 10**, assim como outras Tabelas análogas, apresenta em destaque os valores padronizados, que facilitam a comparação qualitativa e atribuem valores aos parâmetros medidos com maior representatividade e precisão. As medianas dos dados originais são mostradas entre parênteses, conforme indicado na legenda.

Podemos observar que eritrócitos aparentemente apresentam maior heterogeneidade na distribuição do lipídio marcado pela membrana de eritrócitos, seguido de membranas de *ghosts* e de vesículas (SD). Isto é facilmente explicado pela maior complexidade da estrutura da membrana de eritrócitos, que ainda possui proteínas ancoradas ao citoesqueleto localizadas em domínios, que podem ser capazes de induzir domínios de lipídios co-localizadamente (Rodgers & Glaser, 1991).

De forma semelhante, os eritrócitos mostraram uma concentração maior de lipídios marcados nos domínios que *ghosts* e vesículas, que pode ser visto nos parâmetros Enriquecimento, Intensidade máxima e MediaMediaDomCel.

O tamanho dos domínios também apresenta-se maior em eritrócitos que em *ghosts* e vesículas, como pode ser notado em MediaAreaDomCel, MediaAreaRelativa e AreaRelativaTotal.

O quadro geral que emerge destas informações é que eritrócitos, provavelmente pela maior complexidade de composição e distribuição espacial de proteínas de membrana, apresentam maior heterogeneidade na distribuição lipídica, além de uma maior concentração e extensão da organização dos lipídios em domínios

Vesículas marcadas com NBD-DOPA

A **Figura 49** mostra GUV incubadas somente com tampão, com Ca^{+2} 2 mM, DBC 1mM e Ca^{+2} 2 mM com DBC 1mM, após 2, 15 e 30 minutos. Na **Figura 49 A**, correspondente ao controle, não verificou-se nenhuma mudança aparente na distribuição homogênea de DOPA ao longo do tempo do experimento. Na presença de cálcio 2 mM (**Figura 49 B**), existe uma maior concentração de DOPA em uma região da vesícula, ou formação de domínio lipídico, a partir de 15 minutos. Na **Figura 49 C** incubou-se as vesículas com 1 mM de DBC, apesar de verificar-se domínios na presença de DBC somente, o tamanho da amostra de imagens ainda é muito pequeno, e não podemos afirmar se a DBC realmente tem efeito. Na **Figura 49 D**, onde cálcio 2 mM e DBC 1mM foram adicionadas simultaneamente e incubadas com as vesículas, notou-se o aparecimento inicial de domínios de DOPA e o posterior desaparecimento, detectado após 30 minutos.

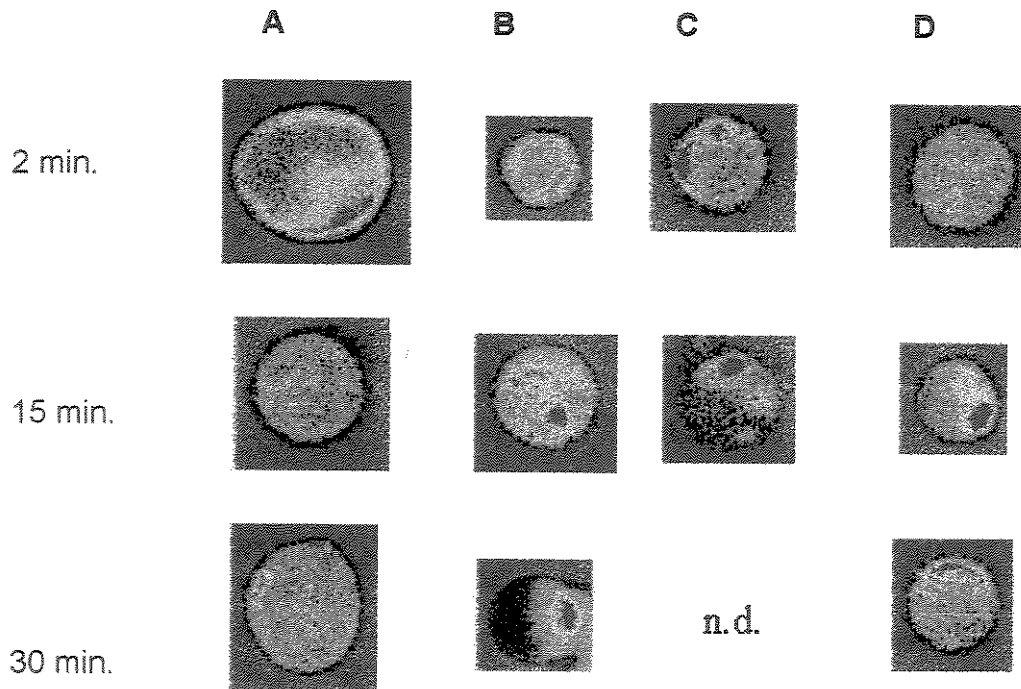


Figura 49: Vesículas unilamelares gigantes compostas por DOPC:DOPA:NBD-PA 90:9,5:0,5 (A), na presença de Ca^{+2} 2 mM (B), de DBC 1 mM (C) e de ambos (D). As linhas representam o período de incubação, de cima para baixo, de 2, 15 e 30 minutos respectivamente.

Os dados da análise das imagens de microscopia de vesículas tratados com Ca^{+2} e DBC são mostrados a seguir na **Tabela 11**. Os valores de p menores que 0,05 indicam que existe diferença significativa entre os tratamentos.

Tabela 11: Vesículas após 30 min. compostas por DOPC: DOPA: NBD-PA 90: 9,5: 0,5. O teste utilizado para detectar diferença entre as 'células' foi o de Kruskal-Wallis..(*) indica diferenças significativas entre tratamentos ($p < 0.05$). Os valores entre parênteses são as medianas, e fora dos parênteses, valores padronizados (Z) usados na análise de Kruskal-Wallis.

Parâmetro/Tratamento	p	Controle	Cálcio	DBC	Cálcio + DBC
Número de domínios*	0,030	-1,23 (0)	-1,40 (0)	n.d.	2,61 (2)
Área da célula	0,441	-1,25 (1491)	0,87 (2000)	n.d.	0,13 (1684)
SD*	0,001	-2,95 (11,66)	-0,63 (14,11)	n.d.	3,26 (22,26)
Enriquecimento*	0,045	-1,25 (0)	-1,23 (0)	n.d.	2,44 (8,55E-03)
Intensidade máxima*	0,046	-1,23 (0)	-1,25 (0)	n.d.	2,44 (163)
Perímetro	0,072	-1,25 (0)	-1,03 (0)	n.d.	2,22 (16,3)
SDMedioDomCel	0,162	-1,20 (0)	-0,67 (0)	n.d.	1,78 (4,63)
MediaMediaDomCel*	0,050	-1,23 (0)	-1,21 (0)	n.d.	2,39 (1,54E+02)
MediaAreaDomCel*	0,054	-1,27 (0)	-1,13 (0)	n.d.	2,35 (2,55E+01)
MediaAreaRelativa*	0,045	-1,25 (0)	-1,23 (0)	n.d.	2,44 (5,51E-03)
AreaRelativaTotal*	0,032	-1,30 (0)	-1,30 (0)	n.d.	2,57 (1,10E-02)

Os tratamentos promoveram efeitos significativamente diferentes sobre quase todos os parâmetros usados. Em geral, o cálcio apresentou resultados semelhantes ao controle e estes foram bastante diferentes do tratamento simultâneo de DBC e cálcio. Pela ausência do tratamento com DBC, não poderemos afirmar categoricamente quem de fato foi responsável pelas diferenças observadas.

A **Figura 50** compara graficamente os resultados destes tratamentos.

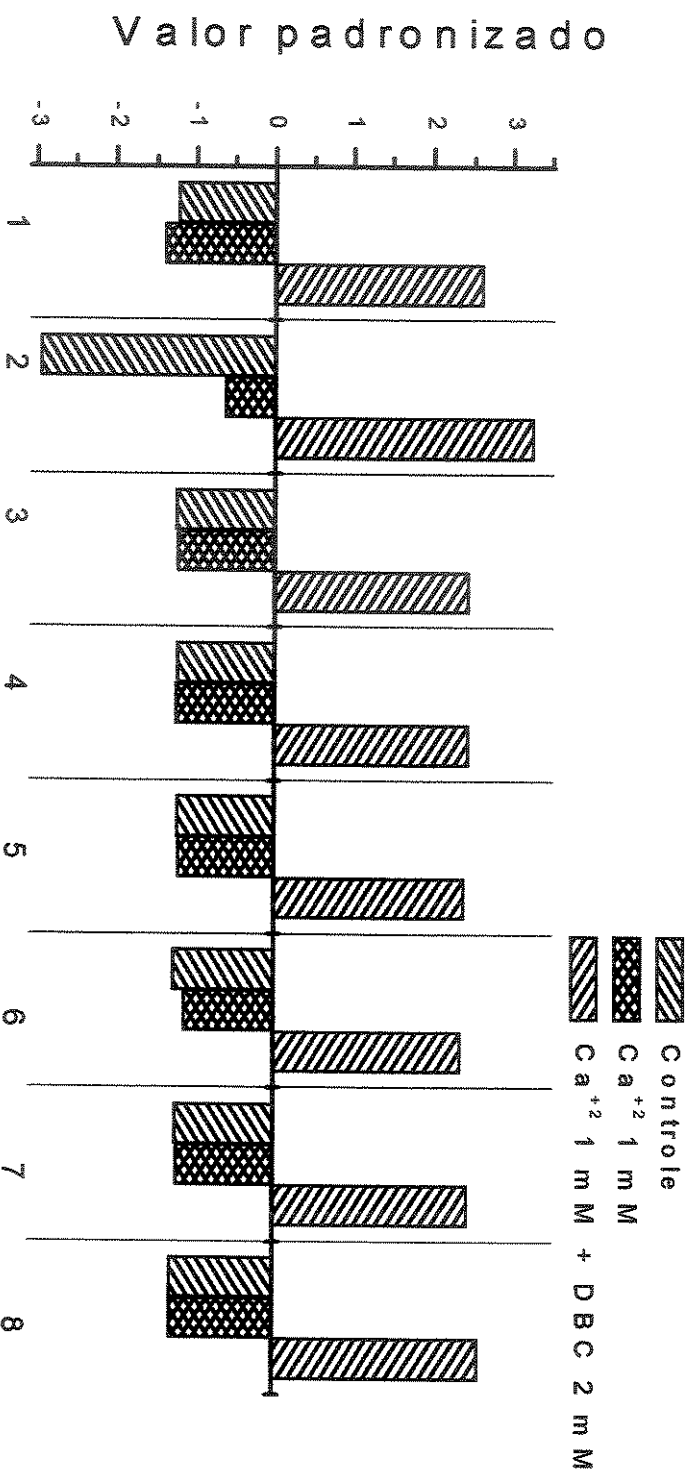


Figura 50: Valor padronizado do número de domínios (1) , desvio padrão da intensidade por toda a célula (2), enriquecimento (3), intensidade máxima nos domínios (4), intensidade média nos domínios (5), área média dos domínios (6), área média dos domínios em relação à vesícula (7) e fração da área celular contida em domínios (8) para os diferentes tratamentos. Vesículas compostas por DOPC: DOPA: NBD-DOPA 90: 9,5: 0,5 em tampão Tris 10 mM pH 7,4.

Vemos pela **Figura 50** que os número de domínios exibiu diferença significativa para os tratamentos comparados. Aparentemente, a adição de cálcio não altera este parâmetro, mas a adição concomitante deste com DBC aumenta o número de domínios por célula.

O desvio padrão, que é uma medida global de heterogeneidade de intensidade, i.e. de concentração de marcador, foi aumentado quando em presença de cálcio, e ainda mais quando adicionamos cálcio e DBC simultaneamente às vesículas. A DBC aparentemente *aumenta* a heterogeneidade composicional do marcador (SD).

O enriquecimento, a intensidade máxima nos domínios, a intensidade média nos domínios, a área média dos domínios, a área média dos domínios em relação à vesícula e a fração da área celular contida em domínios seguiram o mesmo padrão: cálcio não parece alterar significativamente este parâmetro, enquanto a mistura cálcio e DBC causam um aumento na medida destas características.

A DBC portanto parece aumentar a segregação dos lipídios aniônicos NBD-DOPA em membranas quando adicionada ao mesmo tempo que o cálcio.

Em geral, não pudemos notar diferenças evidentes entre o controle e o cálcio.

Ghosts marcados com NBD-DOPA

Fez-se também experimentos com ghosts marcados com NBD-DOPA, como mostrados na **Figura 51**. No controle, verificou-se poucos domínios, quando comparados aos eritrócitos (**Figura 51 A**). Na presença de cálcio 2 mM (**Figura 51 B**), os domínios ficaram muito mais evidentes. A adição de 1 mM de DBC (**Figura 51 C**) parece induzir levemente a formação de domínios. Com cálcio 2 mM e DBC 1 mM, parece haver uma diminuição de domínios, quando comparados ao experimento com cálcio 2 mM (**Figura 51 D**).

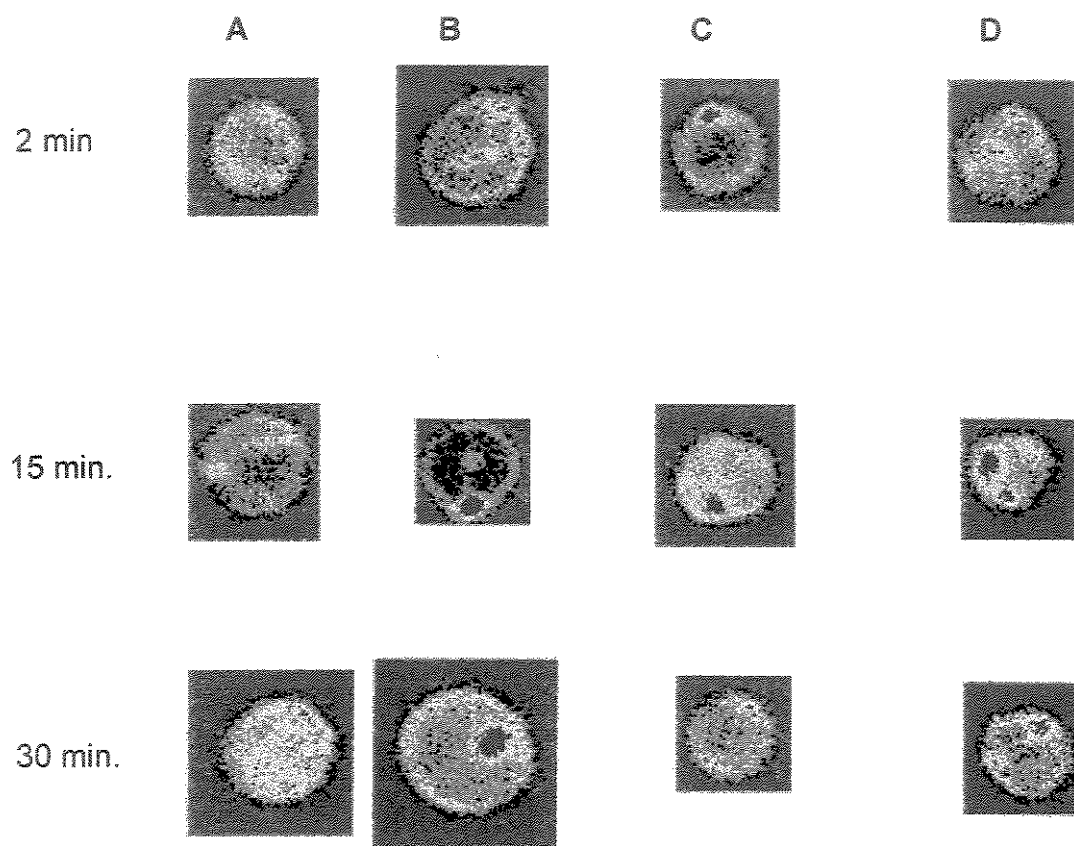


Figura 51: Ghosts marcados com NBD-DOPA (A), na presença de Ca^{+2} 2 mM (B), de DBC 1mM (C) e de ambos (D). As linhas representam o período de incubação, de cima para baixo, de 2, 15 e 30 minutos respectivamente.

Na **Tabela 12** apresentamos as características de domínios lipídicos em *ghosts* na ausência e presença de aditivos.

Tabela 12: *Ghost* após 30 min. marcados com NBD-PA. O teste utilizado para detectar diferença entre as 'células' foi o de Kruskal-Wallis. (*) indica diferenças significativas entre tratamentos. Os valores entre parênteses são as medianas, e fora dos parênteses, valores padronizados (Z) usados na análise de Kruskal-Wallis.

Parâmetro/Tratamento	p	Controle	Cálcio	DBC	Cálcio + DBC
Número de domínios	0,578	0,00 (1)	1,16 (1)	-1,21 (0)	0,12 (1)
Área da célula*	0,000	4,95 (1412)	3,43 (1291)	-5,80 (910)	-2,10 (978)
SD	0,877	0,35 (15,32)	0,60 (15,97)	-0,60 (14,34)	-0,33 (15,26)
Enriquecimento	0,319	-0,17 (0,00234)	1,37 (0,0134)	-1,65 (0)	0,61 (0,00866)
Intensidade mínima	0,387	0,41 (151)	0,99 (151)	-1,72 (0)	0,51 (151)
Intensidade máxima	0,101	0,22 (151)	1,97 (165)	-2,23 (0)	0,19 (151)
Perímetro	0,142	0,13 (4,24)	1,79 (10,5)	-2,11 (0)	0,37 (9,07)
SDMedioDomCel	0,095	-0,21 (0)	2,24 (4,61)	-2,00 (0)	0,06 (0)
MediaMediaDomCel	0,092	0,18 (151)	2,04 (153)	-2,24 (0)	0,17 (151)
MediaAreaDomCel	0,112	0,14 (2)	1,91 (9,5)	-2,20 (0)	0,33 (7)
MediaAreaRelativa	0,258	-0,24 (0,00155)	1,55 (0,0104)	-1,73 (0)	0,56 (0,00571)
AreaRelativaTotal	0,326	-0,37 (0,00155)	1,57 (0,0142)	-1,47 (0)	0,36 (0,00571)

Pelo que observamos nesta **Tabela**, com exceção da área dos *ghosts*, todos os demais parâmetros não apresentaram diferença significativa entre os diferentes tratamentos.

Como pode também ser percebido na **Tabela 12**, a adição de DBC induziu um valor mais negativo que o controle e o cálcio, os maiores valores para os parâmetros medidos. A adição simultânea de DBC e de cálcio aparentemente gerou um efeito intermediário ao efeito de cada um destes aditivos isoladamente.

Não pudemos afirmar que valores são significativamente diferentes entre si por meio deste teste, uma vez que ele só detecta a existência de diferenças significativas entre os tratamentos. Se de fato os valores extremos forem significativamente diferentes entre si, podemos afirmar o antagonismo entre o cálcio e a DBC na alteração da área celular.

Apesar do teste de Kruskal-Wallis não ser capaz de acusar diferenças significativas entre os demais parâmetros, o antagonismo entre o cálcio e a DBC e o efeito intermediário da mistura de cálcio e DBC persistente sugerem uma ação significativa destes agentes.

Se isso for verdade, a DBC atua como um agente que reduz o número de domínios preexistentes em *ghosts*, provavelmente induzidos por proteínas de membrana, distribui mais homogeneamente os lipídios DOPA marcados em toda a célula, diminui a concentração de lipídios em domínios, As intensidades mínima e máxima de fluorescência nos domínios também diminui com a adição da DBC, assim como o perímetro médio dos domínios, a heterogeneidade dentro dos domínios, a intensidade média, a área absoluta e relativa medias dos domínios e a área total relativa da membrana que participa de domínios lipídicos.

O cálcio agiria de forma oposta à da DBC. Interessantemente, a mistura destes alcança um valor intermediário, como se seus efeitos se anulassem quando adicionados simultaneamente.

Os parâmetros também apresentam diferentes capacidades de distinção de efeitos como também alguma correlação entre si. A **Tabela 13** mostra os valores de correlação entre estes diferentes parâmetros.

Podemos agrupar os parâmetros a partir da **Tabela 13** nos grupos mostrados na **Tabela 14**. Verificamos que parâmetros tinham correlação alta (maior que 0,85) entre si para os agruparmos.

Tabela 13: Correlação entre valores de parâmetros de domínios lipídicos de *ghost* marcados com NBD-DOPA para os diferentes tratamentos em 30 min. Em negrito estão destacadas as correlações maiores que 0,85.

	NDom	AreaCel	AreaRelat ivaTotal	MediaAre aRelativa	MediaAre aDomCel	MediaMedi aDomCel	SDMedio DomCel	Perimetro	Intensidad e mínima	Intensidade maxima	Enriquecimento
NDom	0,052309										
AreaRelativaTotal	0,57194	0,045417									
MediaAreaRelativa	0,468603	0,063424	0,979865								
MediaAreaDomCel	0,458206	0,279777	0,919402	0,941388							
MediaMediaDomCel	0,90139	0,145068	0,661121	0,634056	0,633821						
SDMedioDomCel	0,372383	0,205751	0,865418	0,870583	0,87939	0,512691					
Perimetro	0,637514	0,252956	0,894706	0,90277	0,946431	0,801598	0,780809				
Intensidade mínima	0,907519	0,13398	0,609379	0,5802	0,579366	0,996664	0,441973	0,765254			
Intensidade máxima	0,879429	0,170475	0,740354	0,715865	0,720119	0,990125	0,626205	0,857381	0,975955		
Enriquecimento	0,443815	0,061368	0,975479	0,997411	0,937545	0,611376	0,892164	0,884237	0,554012	0,697895	
SD	0,602338	0,022948	0,8933	0,864332	0,802469	0,659658	0,809722	0,784798	0,611784	0,72762	0,869608

Tabela 14: Classificação dos parâmetros de domínios lipídicos para *ghosts* marcados com NBD-DOPA a partir das correlações mostradas na **Tabela 14**.

Grupo	Parâmetros
1	NDom, MediaMediaDomCel, MeanDomCelMin, MediaDomCelMax, SDMedioDomCel
2	AreaRelativaTotal, MediaAreaRelativa, MediaAreaDomCel, Perimetro, Enriquecimento
3	Área da célula
4	SD

Poderíamos, desta forma, caracterizar o efeito destes aditivos sobre a heterogeneidade da distribuição de NBD-DOPA em *ghosts* somente com três parâmetros, uma vez que a área da célula não mostrou diferença entre os tratamentos.

É interessante notar que a maioria dos parâmetros do grupo 1 são concernentes à intensidade de fluorescência nos domínios, o que pode ser interpretado em termos de concentração de marcador, enquanto no grupo 2 a maioria dos parâmetros são relativos a dimensões dos domínios (área e perímetro). O grupo 4 também refere-se a intensidade de marcador, mas é uma medida direta de quão heterogênea é a distribuição de NBD-DOPA na membrana de *ghosts*.

Eritrócitos marcados com NBD-DOPA

Para observar-se possíveis efeitos em uma membrana biológica, marcou-se eritrócitos com NBD-DOPA, como descrito anteriormente. A **Figura 52** revela os resultados deste experimento. Os eritrócitos exibiram domínios lipídicos sem que fosse necessária a adição de qualquer agente indutor (**Figura 52 A**). Na presença de cálcio 2 mM (**Figura 52 B**) não houve alteração aparente em tamanho e número de domínios. Quando adicionou-se somente aos eritrócitos DBC 1 mM, os domínios anteriormente presentes desapareceram. Ainda com a adição de cálcio 2 mM concomitante a de DBC 1 mM (**Figura 52 D**), não detectou-se domínios.

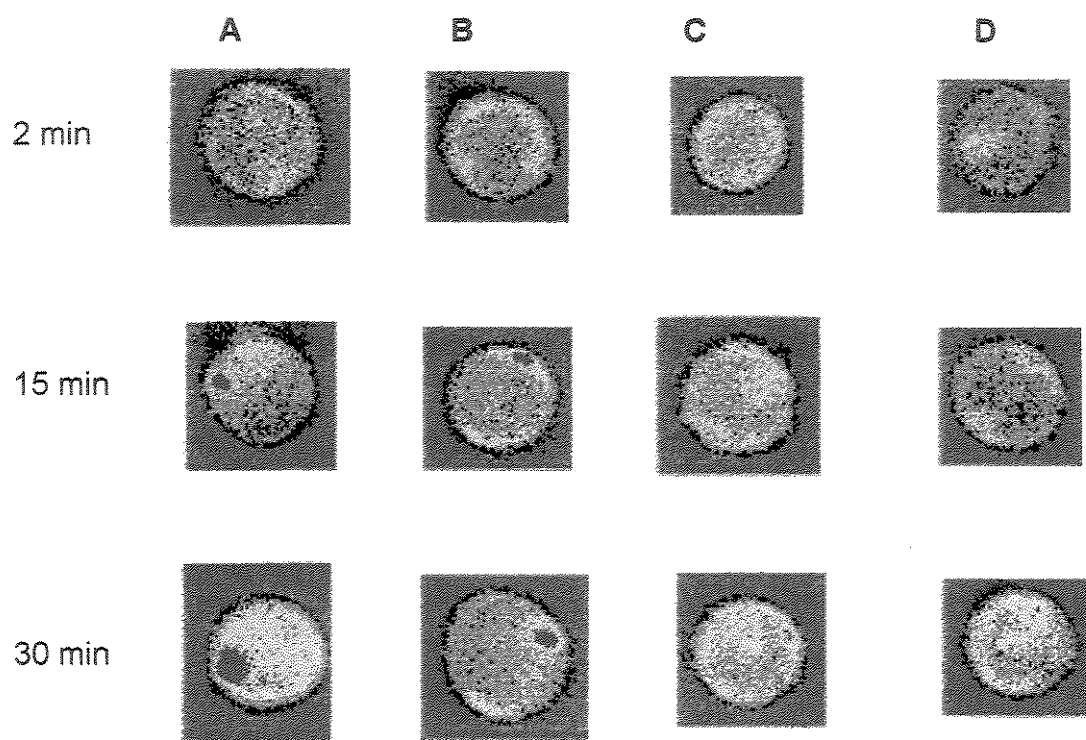


Figura 52: Eritrócitos marcados com NBD-DOPA (A), na presença de Ca^{+2} 2 mM (B), de DBC 1mM (C) e de ambos (D). As linhas representam o período de incubação, de cima para baixo, de 2, 15 e 30 min., respectivamente.

Na **Tabela 15** temos os valores dos parâmetros de domínios lipídicos em eritrócitos marcados com NBD-DOPA.

Tabela 15: Eritrócitos após 30 min. NBD-PA. Kruskal-Wallis. (*) indica diferenças significativas entre tratamentos. Os valores entre parênteses são as medianas, e fora dos parênteses, valores padronizados (Z) usados na análise de Kruskal-Wallis.

Parâmetro/Tratamento	p	Controle	Cálcio	DBC	Cálcio + DBC
Número de domínios	0,126	1,08 (1)	1,68 (1)	-1,60 (0)	-1,14 (0)
Área da célula	0,363	-0,44 (1395)	1,36 (1491)	0,20 (1452)	-1,41 (1382)
SD*	0,006	2,70 (17,60)	1,19 (15,80)	-2,78 (13,53)	-0,81 (14,63)
Enriquecimento*	0,038	1,29 (0,00270)	2,03 (0,0254)	-1,79 (0)	-1,55 (0)
Intensidade mínima	0,118	0,89 (151)	1,85 (151)	-1,51 (0)	-1,24 (0)
Intensidade máxima*	0,005	1,22 (168)	2,80 (171)	-2,24 (0)	-1,81 (0)
Perímetro*	0,042	1,33 (17,6)	1,95 (17,8)	-1,70 (0)	-1,62 (0)
SDMedioDomCel*	0,014	1,23 (5,93)	2,47 (7,10)	-2,16 (0)	-1,54 (0)
MediaMediaDomCel*	0,006	1,11 (154)	2,84 (155)	-2,26 (0)	-1,72 (0)
MediaAreaDomCel*	0,025	1,24 (22)	2,24 (24)	-1,89 (0)	-1,62 (0)
MediaAreaRelativa*	0,043	1,27 (0,0175)	2,01 (0,0163)	-1,77 (0)	-1,53 (0)
AreaRelativaTotal*	0,038	1,42 (0,0208)	1,94 (0,0163)	-1,90 (0)	-1,45 (0)

Vemos na **Tabela 15** que relativamente poucos parâmetros deixaram de evidenciar diferenças significativas entre os tratamentos.

Aparentemente, o desvio padrão da intensidade na célula é reduzido quando adicionamos DBC aos eritrócitos. A adição de cálcio aos eritrócitos parece promover uma pequena redução nesta resposta, quando comparada a DBC, enquanto se adicionarmos simultaneamente cálcio e DBC, o efeito da DBC parece prevalecer grandemente sobre o do cálcio. É interessante como estes aditivos somente puderam reduzir este parâmetro.

O enriquecimento, intensidade máxima nos domínios, perímetro dos domínios, desvio padrão da intensidade nos domínios, média de intensidade e de área entre domínios e as áreas relativa e total dos domínios nas células alteraram-se de forma análoga entre si. A DBC diminui o valor do parâmetro, enquanto o cálcio aumenta este valor, mesmo em relação ao controle. Quando adicionados ao mesmo tempo, a DBC

tem seu efeito aplacado pela presença do cálcio, com uma forte prevalência de uma ação como da DBC somente.

Vale notar que os resultados são semelhantes aos de *ghost*, e o teste de Kruskal-Wallis detecta diferença significativa entre os tratamentos, em contraste com as membranas de *ghost*.

A adição simultânea de cálcio e de DBC em eritrócitos teve um efeito mais próximo ao da DBC isolada que em *ghosts*. A redução de componentes de membrana no preparo de *ghost* pode aumentar o acesso do cálcio aos lipídios aniônicos na membrana e com isso acirrar a competição com a DBC quanto ao efeito final sobre a organização lipídica em sistemas biológicos.

A **Tabela 16** apresenta os valores de correlação entre os parâmetros usados nos experimentos de eritrócitos marcados com NBD-DOPA após 30 min. de incubação.

Tabela 16: Correlação entre valores de parâmetros de domínios lipídicos de eritrócitos marcados com NBD-DOPA para os diferentes tratamentos em 30 min. Em negrito estão destacadas as correlações maiores que 0,85.

	NDom	AreaCel	AreaRelativaTotal	MediaAreaRelativa	MediaAreaRelativa	MediaAreaDomCel	MediaAreaDomCel	MediaMediaDomCel	SDMedioDomCel	Perimetro	Intensidade minima	Intensidade maxima	Enriquecimento
NDom													
AreaCel	0,116756												
AreaRelativaTotal	0,704578	-0,07867											
MediaAreaRelativa	0,626938	-0,06733	0,979481										
MediaAreaDomCel	0,633934	0,046647	0,959725	0,984021									
MediaMediaDomCel	0,927374	0,092378	0,764236	0,754075	0,766473								
SDMedioDomCel	0,53421	0,052107	0,823719	0,838321	0,862174	0,663534							
Perimetro	0,765278	0,047723	0,933477	0,949099	0,961865	0,884006	0,815413						
Intensidade minima	0,931995	0,092263	0,733585	0,721727	0,732844	0,997929	0,615293	0,862822					
Intensidade maxima	0,908094	0,090708	0,807108	0,800443	0,815537	0,992959	0,745965	0,914215	0,983783				
Enriquecimento	0,608796	-0,063	0,976213	0,997831	0,982941	0,738363	0,858966	0,936953	0,703043	0,789403			
SD	0,659394	-0,1383	0,916289	0,895467	0,879465	0,722953	0,805606	0,852134	0,691545	0,76795			0,899447

Todos os parâmetros apresentam uma correlação alta, com exceção da área do eritrócito. Conforme feito anteriormente, utilizamos estas informações para classificar os dados de acordo com os valores contidos na **Tabela 16**. A **Tabela 17** mostra a classificação dos parâmetros.

Tabela 17: Classificação dos parâmetros de domínios lipídicos para eritrócitos marcados com NBD-DOPA a partir das correlações mostradas na **Tabela 16**.

Grupo	Parâmetros
1	NDom, MediaMediaDomCel, Intensidade minima, Intensidade maxima
2	AreaRelativaTotal, MediaAreaRelativa, MediaAreaDomCel, Perimetro, Enriquecimento, SD
3	AreaCel
4	SDMedioDomCel

Comparando-se a **Tabela 17** com a **Tabela 14**, vemos uma consistência no agrupamento. As únicas diferenças são a independência do parâmetro MediaMediaDomCel e o agrupamento de SD com outros parâmetros de área. De qualquer forma, podemos sempre distinguir dois grandes grupos: um medindo parâmetros métricos (área, perímetro) e outro de intensidade, i.e. concentração de marcador, e um grupo que pode estar caracterizando alterações morfológicas das células, que é formado pelo parâmetro AreaCel. Realizamos observações de eritrócitos marcados com NBD-DOPS na presença dos aditivos cálcio e DBC. Os resultados são mostrados na **Tabela 18**.

Tabela 18: Eritrócitos após 30 min. marcados com NBD-PS. O teste utilizado para detectar diferença entre os eritrócitos foi o de Kruskal-Wallis. (*) indica diferenças significativas entre tratamentos. Os valores entre parênteses são as medianas, e fora dos parênteses, valores padronizados (Z) usados na análise de Kruskal-Wallis.

Parâmetro/Tratamento	p	Cálcio	DBC
Número de domínios	0,161	1,40 (1)	-1,40 (0)
Área da célula*	0,000	4,32 (2043)	-4,32 (1539)
SD	0,586	-0,54 (13,45)	0,54 (14,43)
Enriquecimento	0,322	0,99 (0,00104)	-0,99 (0)
Intensidade mínima	0,187	1,32 (151)	-1,32 (0)
Intensidade máxima	0,176	1,35 (151)	-1,35 (0)
Perímetro	0,262	1,12 (3,83)	-1,12 (0)
SDMedioDomCel	0,531	0,63 (0)	-0,63 (0)
MediaMediaDomCel	0,210	1,25 (151)	-1,25 (0)
MediaAreaDomCel	0,262	1,12 (1,50)	-1,12 (0)
MediaAreaRelativa	0,322	0,99 (0,000684)	-0,99 (0)
AreaRelativaTotal	0,306	1,02 (0,000684)	-1,02 (0)

Como podemos verificar na **Tabela 18**, cálcio e DBC parecem apresentar efeitos antagônicos, de forma semelhante à observada com *ghosts*. O cálcio promove um efeito maior em praticamente todos os parâmetros, correspondendo a uma maior organização dos lipídios de membrana em relação ao experimento com cálcio. Não sabemos porque o cálcio promoveu uma heterogeneidade em toda a membrana celular menor que a DBC. Devido a ausência do grupo controle neste experimento, não podemos afirmar qual o efeito absoluto destes aditivos.

Só podemos falar categoricamente em diferenças nos valores dos parâmetros quando observamos a área da célula, que parece aumentar com a presença do cálcio ou da DBC, e sofrer uma forte redução na presença de ambos os aditivos. Provavelmente esta variação reflete alterações morfológicas. Se a diferença não detectada em eritrócitos

marcados com DOPA corresponder à realidade, é possível que com a marcação de DOPS nos eritrócitos exista uma fração significativa maior deste lipídio na monocamada externa que *in natura*, que por sua vez facilite ou proporcione as alterações na área celular que observamos.

Mais ainda, as alterações na área celular podem ser independentes da distribuição de DOPS na membrana, se o teste de Kruskal-Wallis confirmar o fenômeno observado.

De uma maneira geral, a DBC é antagônica ao efeito do cálcio em pelo menos um parâmetro, seja ele celular ou referente aos domínios.

Conclusão

Fluorescência

No presente trabalho medimos propriedades ópticas e de fluorescência da DBC. Com isso foi possível determinar a constante de dissociação (pK_a) e a constante de ligação desse anestésico em membranas fosfolipídicas, em diferentes pH.

O valor de pK_a da DBC é de 8,4 (**Figura 4**) indicando que em pH fisiológico haveria predominância da forma carregada do AL.

As medidas de supressão por iodeto mostraram que o valor da constante de Stern-Volmer (K_{SV}) foi maior para a supressão de fluorescência da DBC^+ , refletindo a grande contribuição de interações eletrostáticas no fenômeno da supressão. As colisões entre as moléculas devem tornar-se mais freqüentes, e com isso a perda de energia da DBC^+ no estado excitado com o choque com íons I^- é maior. Vale observar que o grupamento ionizável da DBC, a amina terciária, localiza-se próximo ao anel quinolínico, que é o responsável pela fluorescência da DBC, e que portanto favorece o encontro deste íon com o próprio anel fluoróforo.

A importância da forma desprotonada da DBC fica evidente quando consideramos os valores de constante de ligação encontrados. K_b mostra que a forma neutra interage mais fortemente com membranas lipídicas (**Tabela 6**);

As medidas de fluorescência revelaram ainda que a forma protonada da DBC tem rendimento quântico maior que a forma neutra (**Tabela 4**).

A interação da DBC desprotonada com vesículas de DOPC é acompanhada pelo aumento da intensidade de fluorescência (em baixas concentrações de membrana – **Figura 8**) e deslocamento para o azul, dos comprimentos de onda de emissão (**Figura 9**). Com aumento da concentração de membrana e, conseqüentemente, da dispersão de luz, observa-se diminuição da intensidade de fluorescência, mesmo após tratamentos de subtração/correção espectral.

Observações semelhantes foram feitas com a DBC protonada. A interação com meio menos polar diminui o rendimento quântico da fluorescência e desloca a emissão para comprimentos de onda menores (**Figura 20 e Figura 21**).

A variação fluorescência da DBC em meios de diferentes polaridades foi analisada com misturas de dioxano:água (**Figura 28**), na tentativa de correlacionar as propriedades de fluorescência da DBC em membranas e, comparando as constantes dielétricas, determinar a localização da molécula no interior da bicamada. A ocorrência de interação específica entre a DBC e soluções de dioxano provavelmente causou uma redução da intensidade de fluorescência. A redução também presente com o aumento de membrana pode assim ser facilmente justificada pela ocorrência de interações específicas entre a DBC e a membrana.

O ajuste de espectros por curvas log-normal é uma ferramenta interessante no estudo da fluorescência de triptofano em proteínas (Burstein *et al.*, 1973; Abornev & Burstein, 1992) informando-nos parâmetros estratégicos ($I_{\max}$, $\lambda_{\max}$, assimetria espectral e largura do espectro a meia altura). Esta análise permite-nos identificar mais facilmente as espécies e possíveis formas diméricas de DBC em membranas, além de seus respectivos sítios, de forma acurada.

Encontramos um fluoróforo e uma metodologia satisfatória para a correção da turbidez presente em suspensões de membranas. O PyPC fica fortemente ligado à membrana, é estável, possui um rendimento quântico excelente e possui um espectro de emissão que sobrepõe-se bastante ao da DBC. Apesar de não conseguirmos valores de K_b concordantes na aplicação do método empregado, os valores de χ^2 e a distribuição dos dados corrigidos em torno do ajuste de K_b qualifica-o na investigação do comportamento espectral da DBC em presença de membrana.

RPE

No estudo de domínios por medidas de RPE, o parâmetro α revelou-se uma forma razoável de avaliar-se dinâmicas de distribuições lipídicas. α é máximo nos experimentos controle (α_0) e seu valor decresce com o aumento de encontro dos marcadores em membrana (i.e., com a proximidade entre os marcadores).

O valor de α para o controle (α_0) deve ser máximo, uma vez que o parâmetro α decresce com o aumento de encontro dos marcadores em membrana (i.e., formação de domínios).

Vimos que o aumento da concentração de cálcio resulta em diminuição progressiva dos valores de α , o que é coerente com uma progressiva indução de domínios lipídicos. Quando adiciona-se DBC a membranas incubadas previamente com cálcio por mais de meia hora (i.e., em um relativo equilíbrio de formação de domínios), não percebemos mudança significativa do parâmetro α , o que pode significar que a DBC, nesta faixa de concentração ou de proporção com o cálcio, não cause alterações na distribuição de domínios induzida pelo cálcio.

Microscopia de Fluorescência

A análise das imagens de eritrócitos por microscopia de fluorescência mostrou-se excelente para o acompanhamento dos domínios e de suas características. A alteração do padrão de domínios naturalmente existentes nestas membranas pelo cálcio e pela DBC e cálcio foram evidentes.

Em vesículas lipídicas, a mistura cálcio e DBC provocaram um aumento significativo nos valores dos parâmetros analisados, e ainda maior que o aumento promovido pelo cálcio sozinho. Isto pode significar que a DBC realce a capacidade do cálcio em induzir domínios lipídicos em membranas, já vista em outros trabalhos (Haverstick & Glaser, 1987). O efeito da adição de cálcio, se significativo, foi muito discreto no sistema de vesículas.

Em *ghosts*, o teste estatístico usado não detectou diferenças significativas entre os tratamentos. No entanto as aparentes diferenças à primeira vista apresentam um padrão consistente, onde a adição de DBC induziu um valor mais negativo que o controle e o cálcio, os maiores valores para os parâmetros medidos. A adição simultânea de DBC e de cálcio aparentemente gerou um efeito intermediário ao efeito de cada um destes aditivos isoladamente.

Se estas observações forem verdadeiras, estaremos observando a indução da formação de domínios pelo cálcio e a ação antagônica da DBC, tornando as composições da membrana mais uniformes, em contraposição às proteínas de membrana ou pelo cálcio.

Os resultados em eritrócitos foram análogos aos em *ghosts*, com a ressalva de que o teste de Kruskal-Wallis acusou diferença significativa entre os tratamentos. O efeito da

mistura DBC e cálcio promoveu um efeito mais próximo ao da DBC isoladamente, quando comparados a *ghosts*. A perda de glicoproteínas e talvez de proteínas extrínsecas quando do preparo do *ghost* pode disponibilizar mais sítios de ligação ao cálcio, acirrando mais a competição entre cálcio e DBC nesta membrana. Os parâmetros usados na análise podem ser classificados basicamente naqueles concernentes à intensidade de fluorescência nos domínios, o que pode ser interpretado em termos de concentração de marcador, nos relativos a dimensões dos domínios (área e perímetro) e em heterogeneidade global da distribuição do marcador na membrana, a partir dos dados de correlação entre os parâmetros.

O processamento de imagens de vesículas, *ghosts* e eritrócitos marcados com NBD já é realidade em nosso laboratório. Otimizamos este processo pelo emprego de filtros que reduzem ruídos e pela avaliação de radiância de eritrócitos destacados da imagem total para padronização, além de personalizá-lo por meio da escolha de parâmetros obtidos das imagens e do valor de limiar utilizado.

Modelo geral

A partir das informações obtidas por estas técnicas, podemos estabelecer um modelo de formação de domínios lipídicos, ilustrado na **Figura 53**:

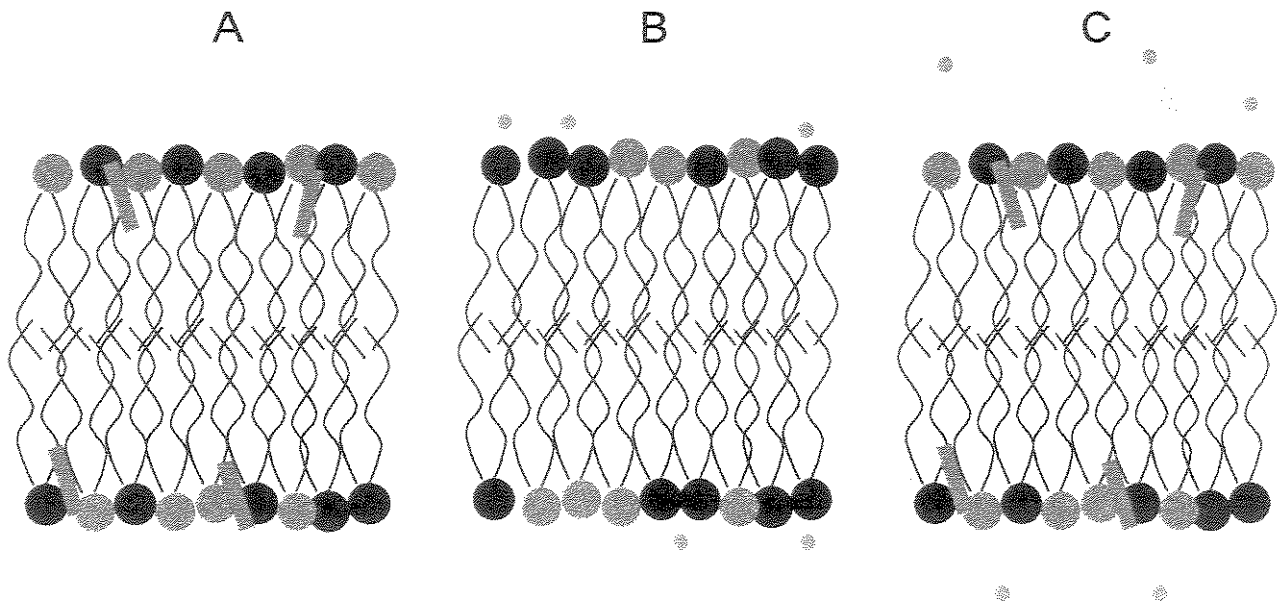


Figura 53: Modelo de formação de domínios lipídicos e efeito da dibucaína em membranas.

Neste modelo, a DBC liga-se preferencialmente à interface da bicamada lipídica (A), e não induz domínios lipídicos em membranas compostas por lipídios neutros e aniônicos. Quando adiciona-se cálcio a esta membrana na ausência de DBC (B), o cálcio reorganiza a distribuição lateral dos lipídios, induzindo a formação de domínios.

Na presença de DBC, no entanto, o cálcio não induz domínios lipídicos, uma vez que a DBC liga-se preferencialmente à cabeça polar dos fosfolipídeos e expulsa o cálcio destes sítios.

Anexo

Macros usados no Scion Image Beta 4.0.2 para análise de imagens

<pre> macro 'GlobalCheckImage'; {Displays images for checking before processing} var i,left,top,width,height,npictures:integer; begin npictures:=nPics+1; ResetCounter; for i:=1 to nPics do begin SelectPic(i); Duplicate(WindowTitle); end; for i:=npictures to nPics do begin SelectPic(i); ReduceNoise; AutoThreshold; end; end; macro 'GlobalProcessDomain'; {Processes domains from vesicles or cells} var globalmean,count:integer; i,left,top,width,height:integer; begin ResetCounter; SetOptions('Area;Mean;Std. Dev.;Perimeter;Min/Max'); NewTextWindow('DomainData'); SetScale(1,'pixel'); ReduceNoise; AutoThreshold; Measure; count:=rCount; globalmean:=rMean[count]; ResetCounter; MultiplyByConstant((100)/globalmean); AutoThreshold; Measure; SetThreshold(150); AnalyzeParticles('label'); AutoThreshold; Measure; SetCounter(rCount-1); SelectAll; Clear; Measure; CopyResults; SelectWindow('DomainData'); Paste; ResetCounter; end; DisposeAll; end; </pre>	<pre> macro 'LocalCheckImage'; {Displays an image for checking before processing} var i,left,top,width,height,npictures:integer; begin Duplicate(WindowTitle); ReduceNoise; AutoThreshold; end; macro 'LocalProcessDomain'; {Processes domains from vesicles or cells} var globalmean,count:integer; i,left,top,width,height:integer; begin ResetCounter; SetOptions('Area;Mean;Std. Dev.;Perimeter;Min/Max'); NewTextWindow('DomainData'); SetScale(1,'pixel'); ReduceNoise; AutoThreshold; Measure; count:=rCount; globalmean:=rMean[count]; ResetCounter; MultiplyByConstant((100)/globalmean); AutoThreshold; Measure; SetThreshold(150); AnalyzeParticles('label'); AutoThreshold; Measure; SetCounter(rCount-1); SelectAll; Clear; Measure; CopyResults; SelectWindow('DomainData'); Paste; ResetCounter; end; DisposeAll; end; macro 'DisposeAll'; {Closes all image windows} begin DisposeAll; end; </pre>
---	---

Bibliografia

- Abornev, S.M. & Burstein, E.A. (1992) Resolution of Protein Tryptophan Fluorescence Spectra into Elementary Components **Mol. Biol.** 26: 890-897.
- Adade, A.B., Chignell, D. & Vanderkooi, G. (1984) Local-Anesthetics - A New Class of Partial Inhibitors of Mitochondrial ATPase **J. Bioenerg. Biomembr.** 16: 353-363.
- Agin, D., Hersh, L. & Holtzman, D. (1965) The Action of Local Anesthetics on Excitable Membranes: A Quantum-Chemical Analysis **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 53: 952-958.
- Aires, M.M. (1991) Fisiologia. Editora Guanabara-Koogan. Rio de Janeiro, RJ.
- Arias H.R., Sankaram M.B., Marsh D. & Barrantes F.J.N. (1990) Effect of Local-Anesthetics on Steroid-Nicotinic Acetylcholine-Receptor Interactions in Native Membranes of Torpedo-Marmorata Electric Organ **Biochim. Biophys. Acta** 1027: 287-294.
- Auger, M., Jarrell, H.C., Smith, I.C.P., Siminovitch, D.J., Mantsch, H.H. & Wong, P.T.T. (1988) Effects of the Local-Anesthetic Tetracaine on the Structural and Dynamic Properties of Lipids in Model Membranes – A High-Pressure Fourier-Transform Infrared Study **Biochemistry** 27: 6086-6093.
- Auger, M., Smith, I.C.P. & Jarrell, H.C. (1989) Interactions of the Local-Anesthetic Tetracaine with Glyceroglycolipid Bilayers - A H-2-NMR Study **Biochim. Biophys. Acta** 981: 351-357.
- Bargouthi, S. A., Puri, R.K. & Eftink, M.R. (1993a) Local-Anesthetic Phospholipid Interactions - Effects of Ionic-Strength, Temperature, and Phospholipid Mixtures on the Binding of Dibucaine to Phospholipids **Biophys. Chem.** 46: 1-11.
- Barghouthi, S. & Eftink, M.R. (1993b) Fluorescence Studies of a Local Anesthetic Phospholipid Interaction **Biophys. Chem.** 46: 13-19.
- Bazzi, M.D. & Nelsestuen, G. (1991) Extensive Segregation of Acidic Phospholipids in Membranes Induced by Protein-Kinase-C and Related Proteins **Biochemistry** 30: 7961-7969.
- Bazzi, M.D. & Nelsestuen, G. (1992) Interaction of Annexin-VI with Membranes - Highly Restricted Dissipation of Clustered Phospholipids in Membranes Containing Phosphatidylethanolamine **Biochemistry** 31: 10406-10413.

- Berclaz, T. & McConnell, H.M. (1981) Phase-Equilibria in Binary-Mixtures of Dimyristoylphosphatidylcholine and Cardiolipin **Biochemistry-US** 20: 6635-6640.
- Bianconi, M.L. & Schreier, S. (1991) EPR Study of Membrane Partitioning, Orientation, and Membrane-Modulated Alkaline-Hydrolysis of a Spin-Labeled Benzoic-Acid Ester **J. Phys. Chem.** 95: 2483-2486.
- Birrell, G.B. & Griffith, O.H. (1976) Cytochrome-C Induced Lateral Phase Separation in a Diphosphatidylglycerol-Steroid Spin-Label Model Membrane **Biochemistry** 15: 2925-2929.
- Blanton, M., McCardy, E., Gallaher, R. & Wang, H.H. (1988) Noncompetitive Inhibitors Reach their Binding-Site in the Acetylcholine-Receptor by 2 Different Paths **Mol. Pharmacol.** 33: 634-642.
- Blume, A., Hübner, W. & Messner, G. (1988) Fourier-Transform Infrared-Spectroscopy of C-13=O-Labeled Phospholipids Hydrogen-Bonding to Carbonyl Groups **Biochemistry** 27: 8239-8249.
- Boggs, J.M., Moscarello, M.A. & Papahadjopoulos, D. (1977) Phase Separation of Acidic and Neutral Phospholipids Induced by Human Myelin Basic-Protein **Biochemistry** 16: 5420-5426.
- Bota, A., Kriechbaum, M. (1998) Prehistory in the Pretransition Range of Dipalmitoylphosphatidylcholine/Water System **Colloid Surface A** 141: 441-448.
- Boulanger, Y., Schreier, S., Leitch, L.C. & Smith, I.C.P. (1980) Multiple Binding-Sites for Local-Anesthetics in Membranes - Characterization of the Sites and their Equilibria by Deuterium NMR of Specifically Deuterated Procaine and Tetracaine **Can. J. Biochem.** 58: 986-995.
- Boulanger, Y., Schreier, S. & Smith, I.C.P. (1980) Molecular Details of Anesthetic-Lipid Interaction as Seen by Deuterium and P-31 Nuclear Magnetic-Resonance **Biochemistry** 20: 6824-6830.
- Bouwstra, J.A., Gooris, G.S., Bras, W., Talsma, H. (1993) Small-Angle X-Ray-Scattering - Possibilities and Limitations in Characterization of Vesicles **Chem. Phys. Lipids** 64: 83-98.
- Browning, J.L., Akutsu, H. (1982) Local-Anesthetics and Divalent-Cations Have the Same Effect on the Headgroups of Phosphatidylcholine and Phosphatidylethanolamine **Biochim. Biophys. Acta** 684: 172-178.

- Burstein E.A., Vedenkin, N.S., Ivkova M.N. (1973) Fluorescence and Location of Tryptophan Residues in Protein Molecules **Photochem. Photobiol.** 18: 263-279.
- Burstein, E.A. (1996) An Improved Algorithm of Resolution of Fluorescence Spectra into Quencher Accessibility-Associated Components **Photochem. Photobiol.** 63: 278-280.
- Burstein, E.A. & Emelyanenko, V.I. (1996) Log-Normal Description of Fluorescence Spectra of Organic Fluorophores **Photochem. Photobiol.** 64: 316-320.
- Butterworth J.F., Strichartz G.R. (1990) Molecular Mechanisms of Local-Anesthesia - A Review **Anesthesiology** 72: 711-734.
- Butler, K.W., Schneider, H. & Smith, I.C.P. (1973) Effects of Local Anesthetics on Lipid Multilayers A Spin Probe Study **Arch. Biochem. Biophys.** 154: 548-554.
- Carrington, A. & McLauchlan, A.D. (1967) Introduction to Magnetic Resonance, Harper & Row, New York.
- Casanovas A.M., Nebot M.F.M., Courriere P. & Oustrin J. (1983) Inhibition of Cytochrome-Oxidase Activity by Local-Anesthetics **Biochem Pharmacol** 32: 2715-2719.
- Catterall, W.A. (1992) Cellular and Molecular-Biology of Voltage-Gated Sodium-Channels **Physiol. Rev.** 72: S15-S48 Suppl. S.
- Cerbon, J. (1972) NMR Evidence For Hydrophobic Interaction of Local Anesthetics - Possible Relation to their Potency **Biochim. Biophys. Acta** 290:51-57.
- Cevc, G., Watts, A., Marsh, D. (1981) Titration of the Phase-Transition of Phosphatidylserine Bilayer-Membranes - Effects of pH, Surface Electrostatics, Ion Binding, and Headgroup Hydration **Biochemistry** 20: 4955-4965.
- Chazotte B, Vanderkooi G. (1981) Multiple Sites of Inhibition of Mitochondrial Electron-Transport by Local-Anesthetics (1981) **Biochim. Biophys. Acta.** 636: 153-161.
- Covino, B.G. & Vassallo, H.G. (1976) Local Anesthetics: mechanisms of action and clinical use, Grune and Stratton, New York.
- Cullis, P.R. & Verkleij, A.J. (1979) Modulation of Membrane-Structure by Ca^{2+} and Dibucaine as Detected by P-31 NMR **Biochim. Biophys. Acta** 552: 546-551.
- Datta, D. (1987) A Comprehensive Introduction to Membrane Biochemistry. Floral Publishing.
- Davis, J.H., Bloom, M., Butler, K.W. & Smith, ICP (1980) The Temperature-Dependence of Molecular Order and the Influence of Cholesterol in Acholeplasma-Laidlawii Membranes **Biochim. Biophys. Acta** 597: 477-491.

- Deguchi, T. (1967) Structure and Activity in Tetrodotoxin Derivatives **Jap. J. Pharmac.** 17:267-269.
- de Jong (1994) Local Anesthetics, C.C. Thomas, Springfield, Illinois, EUA.
- de Jong, R.H. (1977) Local Anesthetics, C.C. Thomas, Springfield, Illinois, EUA.
- de Paula, E. & Schreier, S. (1995) Use of a Novel Method For Determination of Partition Coefficients to Compare the Effect of Local Anesthetics on Membrane Structure **Biochim. Biophys. Acta** 1240: 25-33.
- de Paula, E. & Schreier, S. (1996) Molecular and Physicochemical Aspects of Local Anesthetic-Membrane Interaction **Braz. J. Med. Biol. Res.** 29: 877-894.
- de Paula, E. "Estudos espectroscópicos dos efeitos de anestésicos locais sobre propriedades estruturais e dinâmicas de membranas lipídicas", Tese de Doutorado, Instituto de Química, USP, outubro, 1993.
- Desai, S., Hadlock, T., Messani, C., Chafitz, R., Strichartz, G. (1994) Ionization and Adsorption of a Series of Local-Anesthetics in Detergent Micelles - Studies of Drug Fluorescence **J. Pharmacol. Exp. Therap.** 271: 220-228.
- Devaux, P. & McConnell, H.M. (1972) Lateral Diffusion in Spin-Labeled Phosphatidylcholine Multilayers **J. Am. Chem. Soc.** 94: 4475-4491.
- Driscoll, D.A, Samarasinghe, S., Adamy, S., Jonas, J. & Jonas, A. (1991) Pressure Effects on Dipalmitoylphosphatidylcholine Bilayers Measured by H-2 Nuclear-Magnetic-Resonance **Biochemistry** 30: 3322-3327.
- Dodge, J.T., Hanahan, D.J. & Mitchell, C. (1963) Preparation and Chemical Characteristics of Hemoglobin-Free Ghosts of Human Erythrocytes **Arch. Biochem. Biophys.** 100: 119-&
- Doyle, D.A., Cabral, J.M., Pfuetzner, R.A., Kuo, A., Gulbis, J.M., Cohen, S.L., Chait, B.T. & Mackinnon, R. (1998) The structure of the potassium channel: Molecular Basis of K⁺ conduction and selectivity **Sci.** 280: 69-77.
- Eftink, M. R., Puri, R.K & Ghahramani, M.D. (1985) Local Anesthetic Phospholipid Interactions – The pH-Dependence of the Binding of Dibucaine to Dimyristoylphosphatidylcholine Vesicles **Biochim. Biophys. Acta** 813:137-140.
- Eisinger J, Flores J. (1985) Fluorometry of Turbid and Absorbant Samples and the Membrane Fluidity of Intact Erythrocytes **Biophys. J.** 48: 77-84.

- Ernandes, J.R. Chaimovich, H. & Schreier, S. (1977) Spin Label Study of Detergents in Region of Critical Micelle Concentration **Chem. Phys. Lipids** 18: 304-315.
- Feigenson, G. W. (1986) On the Nature of Calcium Ion Binding Between Phosphatidylserine Lamellae **Biochemistry** 25: 5819-5825.
- Feigenson, G. W. (1989) Calcium Ion Binding Between Lipid Bilayers: the Four-Component System of Phosphatidylserine, Phosphatidylcholine, Calcium Chloride and Water **Biochemistry** 28: 1270-1278.
- Ferreira, G.S.S., Périgo, D.M., Politi, M.J. & Schreier, S. (1996) Effect of Anions From the Hofmeister Series and Urea on the Binding of the Charged and Uncharged Forms of the Local Anesthetic Tetracaine to Zwitterionic Micelles **Photochem. Photobiol.** 63: 755-761.
- Finzi, L., Bustamante, C., Garab, G. & Juang, C-B. (1989) Direct Observation of Large Chiral Domains in Chloroplast Thylakoid Membranes by Differential Polarization Microscopy **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 86: 8748-8752.
- Flewelling, R.F. & Hubbel, W.L. (1986a) Hydrophobic Ion Interactions with Membranes - Thermodynamic Analysis of Tetraphenylphosphonium Binding to Vesicles **Biophys. J.** 49: 531-540.
- Flewelling, R.F. & Hubbel, W.L. (1986b) The Membrane Dipole Potential in a total Membrane-Potential Model - Applications to Hydrophobic Ion Interactions with Membranes **Biophys. J.** 49: 541-552.
- Forman S.A. & Miller K.W. (1989) Molecular Sites of Anesthetic Action in Postsynaptic Nicotinic Membranes **Trends Pharmacol. Sci.** 10: 447-452.
- Fraceto, L.F. "Localização de Anestésicos Locais do tipo Amino-Amida em Lipossomas Uni e Multilamelares", Tese de Mestrado, Instituto de Biologia, Unicamp, março de 2000.
- Frazier, D.T., Narahashi, T. & Yamada, M. (1970) Site of Action and Active Form of Local Anesthetics. 2. Experiments with Quaternary Compounds **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 171: 45-51.
- Glaser, M. (1992) Characterization and Formation of Lipid Domains in Vesicles and Erythrocyte Membranes **Comments Mol. Cel. Biophys.** 8: 37-51
- Glatter, O. & Kratky, O. (1982) Small Angle X-ray Scattering. Academic Press, Inc.

- Ghosh, A.K., Rukmini, R. & Chattopadhyay, A. (1997) Modulation of Tryptophan Environment in Membrane-Bound Melittin by Negatively Charged Phospholipids: Implications in Membrane Organization and Function **Biochemistry** 36: 14291-14305.
- Griffith, O.H., Cornel, D.W. & McConnell, H.M. (1965) **J. Phys. Chem.** 43: 2909-2917.
- Griffith, O.H. & Jost, O.P (1976) Spin Labelling, Theory and Applications, pp. 453-523 (Berliner, L.J., ed.), Academic Press, New York.
- Gupta, S.P. (1991) Quantitative Structure - Activity Relationship Studies on Local-Anesthetics **Chem. Rev.** 91: 1109 -1119.
- Harned & Owen (1958) The Physico Chemical of Electrolytic Solutions, p. 161, Reinhold book, NY.
- Hartmann, W., Galla, H.-J. & Sackmann, E. (1977) Direct Evidence of Charge-Induced Lipid Domain-Structure in Model Membranes **FEBS Lett.** 78: 169-172.
- Haverstick, D.M. & Glaser, M. (1987) Visualization of Ca^{2+} -Induced Phospholipid Domains **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 84: 4475-4479.
- Haverstick, D.M. & Glaser, M. (1988) Visualization of Domain Formation in the Inner and Outer Leaflets of a Phospholipid-Bilayer **J. Cell. Biol.** 106: 1885-1892.
- He, J. & Nichols, P. (1993) Dibucaine Interacts Differently with Membrane and Protein in Cytochrome-C Oxidase Systems **Biochem. Cell Biol.** 71:14-21.
- Henao, F., Deforesta, B., Orlowski, S., Cuenda, A., Gutierrezmerino, C. & Champeil, P. (1991) Kinetic Characterization of the Normal and Procaine-Perturbed Reaction Cycles of the Sarcoplasmic-Reticulum Calcium-Pump **Eur J Biochem** 202: 559-567.
- Hille, B. (1971) Permeability of Sodium Channel to Organic Cations in Myelinated Nerve **J. Gen. Physiol.** 58: 599-617.
- Horakova, L, Szocsova, H. & Stolc, S. (1989) Interaction of Local-Anesthetics with Cytochrome-C Oxidase **Pharmazie** 44: 161-162.
- Honger, T., Jorgensen, K., Stokes, D., *et al.* (1997) Phospholipase A(2) Activity and Physical Properties of Lipid-Bilayer Substrates **Methods Enzymol.** 286: 168-190
- Hope, M.J., Bally, M.B., Mayer, L.D., Janoff, A.S. & Cullis, P.R. (1986) Generation of Multilamellar and Unilamellar Phospholipid-Vesicles **Chem. Phys. Lipids** 40: 89-107.
- Hornby, A.P. & Cullis, P.R. (1981) Influence of Local and Neutral Anesthetics on the Polymorphic Phase Preferences of Egg-Yolk Phosphatidylethanolamine **Biochim. Biophys. Acta** 647: 285-292.

- Hubbel, W.L. & McConnell, H.M. (1969) Orientation and Motion of Amphiphilic Spin Labels in Membranes **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 64: 20-27.
- Hubbel, W.L. & McConnell, H.M. (1971) Molecular Motion in Spin-Labeled Phospholipids and Membranes **J. Am. Chem. Soc.** 93: 314-326.
- Hui, S.W., Boni, L.T., Stewart, T.P. & Isac, T. (1983) Identification of Phosphatidylserine and Phosphatidylcholine in Calcium-Induced Phase Separated Domains **Biochemistry** 22: 3511-3516.
- Jorgensen, K. & Mouritsen, O.G. (1999) Investigation of Lipid Membrane Macro- and Micro-Structure Using Calorimetry and Computer Simulation: Structural and Functional Relationships **Thermochim. Acta** 328: 81-89.
- Jacobson, K. & Papahadjopoulos, D. (1975) Phase Transition and Phase Separation in Phospholipid Membranes Induced by Changes in Temperature, pH, and Concentration of Bivalent Cations **Biochemistry** 14: 153-161
- Jost, P., Libertini, L.J., Hebert, V.C. & Griffith, O.H. (1971) Lipid Spin Labels in Lecithin Multilayers - Study of Motion Along Fatty Acid Chains **J. Mol. Biol.** 59: 77-98.
- Kamp, H.H., Wirtz, K.W.A., Baer, P.R., Slotboom, A.J., Rosenthal, A.F., Paltauf, F. & van Deenen, L.L.M. (1977) Specificity of Phosphatidylcholine Exchange Protein from Bovine Liver **Biochemistry** 16: 1310-1316.
- Kao C.Y., Nishiyama A. (1965) Similarity of Actions of Tetrodotoxin and Saxitoxin on Excitable Membrane **Fed. Proceed.** 24: 649-&.
- Kleinschmidt, J. H., Marsh, D. (1997) Spin-Label Electron Spin Resonance Studies on the Interactions of Lysine Peptides with Phospholipid Membranes **Biophys. J.** 73: 2546-2555.
- Kobayashi, T., Stang, E., Fang, K.S., De Moerloose, P., Parton, R.G. & Gruenberg, J. (1998) A Lipid Associated with the Antiphospholipid Syndrome Regulates Endosome Structure and Function **Nature** 392: 193-197.
- Kosman, D.J. (1984) Electron Spin Resonance, Structural and Resonance Techniques in Biological Research, cap. 2, New York, USA.
- Kubinyi, H. (1979) In: Progress in Drug Research, vol. 23, Lipophilicity and drug activity (Jucker, E. ed.) Birkhäuser Verlag, Basel, Suíça.
- Kuroda, Y. & Fujiwara, Y. (1987) Locations and Dynamic Perturbations For Lipids of Cationic Forms of Procaine, Tetracaine, and Dibucaine in Small Unilamellar

- Phosphatidylcholine Vesicles as Studied by Nuclear Overhauser Effects in H-1 Nuclear-Magnetic-Resonance Spectroscopy **Biochim. Biophys. Acta** 903:395-410.
- Ladokhin, A.S., Holloway, P.W. (1995) Fluorescence of Membrane-Bound Tryptophan Octyl Ester - A Model for Studying Intrinsic Fluorescence of Protein-Membrane Interactions **Biophys. J.** 69: 506-517.
- Lakowicz, J.R. (1983) Principles of fluorescence spectroscopy, cap. 9, Plenum Press, New York.
- Lakshminarayanaiah, N. (1984) Equations of Membrane Biophysics. Academic Press, Inc.
- Laroche, G., Carrier, D. & Pézolet, M. (1988) Study of the Effect of Poly(L-Lysine) On Phosphatidic-Acid and Phosphatidylcholine Phosphatidic-Acid Bilayers by Raman-Spectroscopy **Biochemistry** 27: 6220-6228.
- Lee, A.G. (1976) Interactions Between Anesthetics and Lipid Mixtures Amines **Biochim. Biophys. Acta** 448: 34-44.
- Lee, A.G. (1978) Effects of Charged Drugs on Phase-Transition Temperatures of Phospholipid Bilayers **Biochim. Biophys. Acta** 514:95-104.
- Lentz, B. R., Moore, B.M. & Barrow, D.A. (1979) Light-Scattering Effects in the Measurement of Membrane Microviscosity with Diphenylhexatriene **Biophys. J.** 25:489-494.
- Lewartowski, B., Emanuel K., Langer G.A. (1998) Dibucaine Displaceable Sarcolemmal Ca^{2+} Fraction in Guinea-Pig Cardiac Myocytes **J. Physiol. Pharmacol.** 49: 213-227.
- Lin, C. T., Williamson, L. N., Chyan, Y. G. & Marques, A. D. S. (1988) Deprotonation Dynamics of Local-Anesthetics in Hydrophobic Media - Dibucaine.HCl in Water Alcohol or Surfactant Mixtures **Photochem. Photobiol.** 48: 733-740.
- Lissi, E., Bianconi, M.L., do Amaral, A.T., de Paula, E., Blanch, L.E.B. & Schreier, S. (1990) Methods for the Determination of Partition-Coefficients Based on the Effect of Solutes upon Membrane-Structure **Biochim. Biophys. Acta** 1021: 46-50.
- Loh, W., Beezer, A.E. & Mitchell, J.C. (1995) Thermochemical Investigation of Possible Interactions Between Urea and Some Sparingly Soluble Solutes in Aqueous-Solution **Thermochimica Acta** 255:83-91.
- Louro, S.R.W. & Tabak, M. (1994a) Depth profiling of dibucaine in sarcoplasmis reticulum vesicles by fluorescence quenching **Biochim. Biophys. Acta** 1189:243-246.

- Louro, S.R.W., Nascimento, O.R. & Tabak, M. (1994b) Charge- and pH-dependent Binding Sites for Dibucaine in Ionic Micelles: A Fluorescence Study **Biochim. Biophys. Acta** 1190:319-328.
- Luan, P., Glaser, M. (1994) Formation of Membrane Domains by the Envelope Proteins of Vesicular Stomatitis-Virus **Biochemistry** 33: 4483-4489 Apr 19 1994
- Malheiros, S.V.P., de Paula, E. & Meirelles, N.C. (1998) Contribution of Trifluoperazine/Lipid Ratio and Drug Ionization to Hemolysis **Biochim. Biophys. Acta** 1373: 332-340.
- Malheiros, S.V.P., Meirelles, N.C. & de Paula, E. (2000) Pathways Involved in Trifluoperazine-, Dibucaine- and Praziquantel-Induced Hemolysis **Biophys. Chem.** 83: 89-100.
- Marsh, D. & Smith, I.C.P. (1972) Interacting Spin Labels as Probes of Molecular Separation within Phospholipid Bilayers **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 49: 916-922.
- Marban, E., Yamagishi, T. & Tomaselli, G.F. (1998) Structure and Function of Voltage-Gated Sodium Channels **J. Physiol. London** 508: 647-657.
- Mason, R.P., Gonye, G.E., Chester, D.W. & Herbette, L.G. (1989) Partitioning and Location of Bay-K-8644, 1,4-Dihydropyridine Calcium-Channel Agonist, in Model and Biological-Membranes **Biophys. J.** 55: 769-778.
- Mason, R.P., Rhodes, D.G. & Herbette, L.G. (1991) Reevaluating Equilibrium and Kinetic Binding Parameters for Lipophilic Drugs Based on a Structural Model for Drug-Interaction with Biological-Membranes **Med. Chem.** 34:869-877.
- Mason, R.P. & Trumbore, M.K. (1996) Differential Membrane Interactions of Calcium Channel Blockers - Implications for Antioxidant Activity **Biochem. Pharmacol.** 51: 653-660.
- Metcalf III, T.N., Wang, J.L. & Schindler, M. (1986) Lateral Diffusion of Phospholipids in the Plasma-Membrane of Soybean Protoplasts - Evidence For Membrane Lipid Domains **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 83: 95-99.
- Mustonen P, Virtanen J.A., Somerharju P.J. & Kinnunen P.K.J. (1987) Binding of Cytochrome-c to Liposomes as Revealed by the Quenching of Fluorescence from Pyrene-Labeled Phospholipids **Biochemistry** 26: 2991-2997.

- Miller, J.A., Agnew, W.S. & Levinson, S.R. (1983) Principal Glycopeptide of the Tetrodotoxin Saxitoxin Binding-Protein from *Electrophorus electricus* - Isolation and Partial Chemical and Physical Characterization **Biochemistry** 22:462-470.
- Narahashi, T., Frazier, D.T. & Yamada, M. (1970) Site of Action and Active Form of Local Anesthetics. 1. Theory and pH Experiments with Tertiary Compounds **J. Pharmacol Exp.Ther.** 171: 32-51.
- Narahashi, T., Yamada, M. & Frazier, D.T. (1969) Cationic Forms of Local Anaesthetics Block Action Potentials from inside Nerve Membrane **Nature** 223:748-749.
- Nichols, J.W. & Pagano, R.E. (1981) Kinetics of Soluble Lipid Monomer Diffusion Between Vesicles **Biochemistry** 20:2783-2789.
- Nivarthi R.N., Grant G.J., Turndorf H, Bansinath M. (1996) Spinal Anesthesia by Local Anesthetics Stimulates the Enzyme Protein Kinase C and Induces the Expression of an Immediate Early Oncogene, C-Fos **Anesth. Analg.** 83: 542-547.
- Noda, M., Shimizu, S., Tanabe, T., Takai, T., Kayano, T., Ikeda, T., Takahashi, H., Nakayama, H., Kanaoka, Y., Minamino, N., Kangawa, K., Matsuo, H., Raftery, M.A., Hirose, T., Inayama, S., Hayashida, H., Miyata, T. & Numa, S. (1984) Primary Structure of *Electrophorus electricus* Sodium-Channel Deduced from cDNA Sequence **Nature** 312: 121-127.
- Noda, M., Ikeda, T., Kayano, T., Suzuki, H., Takeshima, H., Kurasaki, M., Takahashi, H. & Numa, S. (1986) Existence of Distinct Sodium-Channel Messenger-RNAs in Rat-Brain **Nature** 320: 188-192.
- Ohnishi, S. & Ito T. (1974) Calcium-Induced Phase Separations in Phosphatidylserine-Phosphatidylcholine Membranes **Biochemistry** 13: 881-887.
- Ohnishi, S. & McConnell, H.M. (1965) Interaction of Radical Ion of Chlorpromazine with Deoxyribonucleic Acid **J. Am. Chem. Soc.** 87: 2293-2299.
- Papahadjopoulos, D. (1972) Studies on Mechanism of Action of Local Anesthetics with Phospholipid Model Membranes **Biochim. Biophys. Acta** 265: 169-186.
- Papahadjopoulos, D., Jacobson K., Poste G. & Shepherd G. (1975) Effects of Local-Anesthetics on Membrane Properties .1. Changes in Fluidity of Phospholipid Bilayers **Biochim. Biophys. Acta** 394: 504-519.
- Pinto, L.D.A., Yokaichiya, D.K., Fraceto, L.F. & de Paula, E. (2000) Interaction of Benzocaine with Model Membranes **Biophys. Chem.** 87: 213-223.

- Prassl, R., Gailhofer, M., Chapman, M.J., Nigon, F., Schuster, B. & Laggner, P. (1997) Evidence for a Lipid Microphase Separation in Human Low Density Lipoprotein **Atherosclerosis** 134: 226-227 Sp. Iss. SI
- Pryor, P.R., Mullock, B.M., Bright, N.A., Gray S.R. & Luzio P. (1999) The Role of Intra-Organelle Calcium in Fusion Between Late Endosomes and Lysosomes and in the Re-Formation of Lysosomes From Late Endosome-Lysosome Hybrid Organelles **Mol. Biol. Cell** 10: 114A Suppl. S.
- Ragsdale, D.S. McPhee, J.C. Scheuer, R. & Catterall, W.A. (1994) Molecular Determinants of State-Dependent Block of Na⁺ Channels by Local-Anesthetics **Sci.** 265: 1724-1728.
- Ragsdale, D.S., McPhee, J.C., Scheuer, T. & Catterall, W.A. (1996) Common molecular determinants of local anesthetic, antiarrhythmic, and anticonvulsant block of voltage-gated Na⁺ Channels **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 93: 9270-9275.
- Rampersaud, A., Inouye, M. (1991) Procaine, a Local-Anesthetic, Signals through the EnvZ Receptor to Change the DNA-Binding Affinity of the Transcriptional Activator Protein OmpR **J. Bacteriol.** 173: 6882-6888.
- Rodgers, W. & Glaser, M. (1991) Characterization of Lipid Domains in Erythrocyte Membranes **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 88: 1364-1368
- Rodgers, W. & Glaser, M. (1993) Distributions of Proteins and Lipids in the Erythrocyte-Membrane **Biochemistry** 32: 12591-12598.
- Rouser, G., Fleicher, S. & Yamamoto, A. (1970) 2 Dimensional Thin Layer Chromatographic Separation of Polar Lipids and Determination of Phospholipids by Phosphorus Analysis of Spots **Lipids** 5: 494-496.
- Sackmann, E., Trauble, H. (1972) Studies of Crystalline-Liquid Crystalline Phase-Transition of Lipid Model Membranes. 1. Use of Spin Labels and Optical Probes as Indicators of Phase-Transition **J. Am. Chem. Soc.** 94: 4482-4491
- Sackmann, E., Trauble, H. (1972) Studies of Crystalline-Liquid Crystalline Phase-Transition of Lipid Model Membranes. 2. Analysis of Electron-Spin Resonance Spectra of Steroid Labels Incorporated into Lipid-Membranes **J. Am. Chem. Soc.** 94: 4492-4498.
- Saishu, T., Kagawa, Y. & Shimizu, R. (1983) Resistance of Thermophilic ATPase (TF1) to Specific F1-ATPase Inhibitors Including Local-Anesthetics **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 112: 822-826.

- Sakai, H. & Tsukihara, T. (1998) Structures of Membrane Proteins Determined at Atomic Resolution **J Biochem-Tokio** 124: 051-1059.
- Scheuer, T. (1999) A Revised View of Local Anesthetic Action: What Channel State Is Really Stabilized? **J. Gen. Physiol.** 113:3-6.
- Schreier, S., Polnaszek, C.F. & Smith, I.C.P. (1978) Spin Labels in Membranes Problems in Practice **Biochim. Biophys. Acta** 515: 375-436.
- Schreier, S. Amaral, A.T., Stachissini, A.S. & Bianconi, M.L. (1986) **Bull. Magn. Reson.** 8: 166-171.
- Schreier, S., Frezzatti Jr., W. Jr, Araujo, P.S., Chaimovich, H. & Cuccovia, I.M. (1984a) Effect of Lipid-Membranes on the Apparent pK of the Local-Anesthetic Tetracaine - Spin Label and Titration Studies **Biochim. Biophys. Acta** 769: 231-237.
- Schreier, S. Frezzatti Jr., W. Jr, Araujo, P.S., & Cuccovia, I.M. (1984b) Surfactants in Solution, (Mittal, K.L. & Lindmam, B. eds.), vol. 3, pp. 2145-2156, Plenum Press, New York and London.
- Seelig, J. (1978) P-31 Nuclear Magnetic-Resonance and Head Group Structure of Phospholipids In Membranes **Biochim. Biophys. Acta** 515: 105-140.
- Shen Y.M.A., Dibble A.R.G., Sando J.J., Biltonen R.L. (1996) Anesthetic Effects on Protein Kinase C and Lipid Domain Formation. **Biophys. J.** 70: WP272-WP272.
- Sheremetyev, Y.A., Fomin, I.L., Suslov, F.Y., *et al.* (2000) The Investigation of Calcium Phosphate-Induced Fusion of Human Erythrocytes **Biol. Membrany** 17: 234-237
- Shukla, S. D., Hanahan, D.J. (1982) Identification of Domains of Phosphatidylcholine In Human-Erythrocyte Plasma-Membranes - Differential Action of Acidic and Basic Phospholipases A2 From Agkistrodon-Halys-Blomhoffii **J. Biol. Chem.** 257: 2908-2911.
- Singer, S. J. & Nicholson, G. L. (1972) Fluid Mosaic Model of Structure of Cell-Membranes **Sci.** 175: 720-731.
- Singleton, W.S., Gray, M.G., Brown, M.L. & White, J.C. (1965) Chromatographically Homogeneous Lecithin from Egg Phospholipids **J. Am. Oil Chem. Soc.** 42: 53-56.
- Skalko, N, Bouwstra, J, Spies, F, *et al.* (1998) Morphological observations on liposomes bearing covalently bound protein: Studies with freeze-fracture and cryoelectron microscopy and small angle x-ray scattering techniques **Biochim. Biophys. Acta** 1370: 151-160.
- Smith, I.C.P. (1984) **Biomembr.** 12:135-168.

- Somerharju, P.J., Virtanen, J.A., Eklund, K.K., Vainio, P. & Kinnunen, P.K.J. (1985) 1-Palmitoyl-2-Pyrenedecanoyl Glycerophospholipids as Membrane Probes – Evidence for Regular Distribution In Liquid-Crystalline Phosphatidylcholine Bilayers **Biochemistry** 24: 2773-2781.
- Souza, S.M.B, Chaimovich, H. & Politi, M. (1995) Effects of Urea on Dioctadecyldimethylammonium **Langmuir** 11: 1715-1719.
- Strichartz, G.R. & Ritchie, J.M. (1987) Local Anesthetics, Handbook of Experimental Pharmacology, (Strichartz, G.R. ed.), vol. 81, cap. 2, Springer-Verlag, Berlin.
- Strichartz, G.R., Sanchez, V., Arthur, G.R., Chafetz, R. & Martin, D. (1990) Fundamental Properties of Local-Anesthetics. 2. Measured Octanol-Buffer Partition-Coefficients and pK_a Values of Clinically Used Drugs **Anesth. Analg.** 71: 158-170.
- Suwalaky, M., Hernandez, P., Villena, F., Aguilar, F. & Sotomayor, C. P. (1998) Interaction of the Anticancer Drug Tamoxifen with the Human Erythrocyte Membrane and Molecular Models **Z. Naturforschung C** 53: 182-190.
- Suwalaky, M., Espinoza, M. A., Sanchez, I. & Villena, F. (1991) X-Ray Studies on Phospholipid-Bilayers .11. Interactions with Chloramphenicol **Z. Naturforschung C** 46: 647-655.
- Sztark, F., Tueux, O., Erny, P., Dabadie, P. & Mazat, J.P. (1994) Effects of Bupivacaine on Cellular Oxygen-Consumption and Adenine-Nucleotide Metabolism **Anesth. Analg.** 78: (2) 335-339.
- Tabak, M. & Borisevitch, I.E. (1992) Interaction of Dipyrindamole with Micelles of Lysophosphatidylcholine and with Bovine Serum-Albumin - Fluorescence Studies **Biochim. Biophys. Acta.** 1116: 241-249.
- Tang, D. & Chong, P.L.G. (1992) E/M Dips - Evidence for Lipids Regularly Distributed into Hexagonal Super-Lattices in Pyrene-PC/DMPC Binary-Mixtures at Specific Concentrations **Biophys. J.** 63: 903-910.
- Tocanne, J.-F., Dupou-Cézanne, L., Lopez, A. & Tourrier, J.-F. (1989) Lipid Lateral Diffusion and Membrane Organization **FEBS Lett.** 257: 10-16.
- Tokutomi, S., Ohki, K. & Ohnishi, S.I. (1980) Proton-Induced Phase-Separation in Phosphatidylserine-Phosphatidylcholine Membranes **Biochim. Biophys. Acta** 596: 192-200.

- Trauble, H. & Sackmann, E. (1972) Studies of Crystalline-Liquid Crystalline Phase-Transition of Lipid Model Membranes. 3. Structure of a Steroid-Lecithin System Below and Above Lipid-Phase Transition **J. Am. Chem. Soc.** 94: 4499
- Trommeshauser, D. & Galla, H.J. (1998) Interaction of a Basic Amphipathic Peptide From the Carboxyterminal Part of the HIV Envelope Protein Gp41 with Negatively Charged Lipid Surfaces **Chem. Phys. Lipids** 94: 81-96.
- Vidal, B.C. (1997) Image Analysis and Definition of Nuclear Phenotypes **Rev. Bras. Genét.** 749-754.
- Vanderkooi, G. (1984) Dibucaine Fluorescence and Lifetime in Aqueous-Media as a Function of pH **Photochem. Photobiol.** 39: 755-762.
- Vanderkooi, G. & Adade, A.B. (1986) Stoichiometry and Dissociation-Constants for Interaction of Tetracaine with Mitochondrial Adenosine-Triphosphatase as Determined by Fluorescence **Biochemistry** 25: 7118-7124.
- Van Osdol, W.W., Ye, Q., Johnson, M.I. & Biltonen, R.I. (1992) Effects of the Anesthetic Dibucaine on the Kinetics of the Gel-Liquid Crystalline Transition of Dipalmitoylphosphatidylcholine Multilamellar Vesicles **Biophys. J.** 63: 1011-1017.
- Wakita M., Kuroda Y., Fujiwara Y. & Nakagawa T. (1992) Conformations of Dibucaine and Tetracaine In Small Unilamellar Phosphatidylcholine Vesicles as Studied by Nuclear Overhauser Effects in H-1 Nuclear-Magnetic-Resonance Spectroscopy **Chem. Phys. Lipids** 62: 45-54.
- Wang, F., Naisbitt, G.H., Vernon, L.P. & Glaser, M. (1993) Pyrularia Thionin Binding to and the Role of Tryptophan-8 in the Enhancement of Phosphatidylserine Domains in Erythrocyte-Membranes **Biochemistry** 32: 12283-12289.
- Warren, R.C. (1987) Physics and Architecture of Cell Membranes, cap. 1 e 2, Adam-Hilger, Bristol and Philadelphia.
- Wertz, J.E. & Bolton, J.R. (1972) Electron Spin Resonance - Elementary Theory and Practical Applications, McGraw Hill, New York, EUA.
- Westman, J., Boulanger, Y., Ehrenberg, A & Smith, I.C.P. (1982) Charge and pH Dependent Drug-Binding to Model Membranes - A H-2-NMR and Light-Absorption Study **Biochim. Biophys. Acta** 685: 315-328

- White, R.A., Kutz, K.J. & Wampler, J.E. (1991) Fundamentals of Fluorescence Microscopy In: Topics in Fluorescence spectroscopy, vol. 1, chapt. 7 (Lakowicz, J.r., ed.) Plenum Press, New York, EUA.
- Wildsmith, J.A.W., Gissen, A.J., Takman, B. & Covino, B.G. (1987) Differential Nerve Blockade - Esters V Amides and the Influence of pK_a **Br. J. Anaesth.** 59: 379-384.
- Wiseman, D.J., Cordeiro, C., Finlay, B.B. & Webb, M.S. (1999) Monogalactosyldiacylglycerol Confers Fusogenicity to Liposomal Delivery Systems and Facilitates Targeting to Hepatocytes **J. Liposome Res.** 9: 461-475.
- Wolf, D.E., Maynard, V.M., McKinnon, C.A. & Melchior, D.L. (1990) Lipid Domains in the Ram Sperm Plasma-Membrane Demonstrated by Differential Scanning Calorimetry **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 87: 6893-6896.
- Wolosker H, Pacheco A.G.F., Demeis L (1992) Local-Anesthetics Induce Fast Ca^{2+} Efflux through a Nonenergized State of the Sarcoplasmic-Reticulum Ca^{2+} -ATPase **J. Biol. Chem.** 267: 5785-5789.
- Wong, P.T.T. (1984) Raman-Spectroscopy of Thermotropic and High-Pressure Phases of Aqueous Phospholipid Dispersions **Ann. Rev. Biophys. Bioeng.** 13: 1-24.
- Wu, W.H. & Berkowitz, G.A. (1991) Lidocaine and ATPase Inhibitor Interaction with the Chloroplast Envelope **Plant Physiol.** 97: 1551-1557.
- Yechiel, E. & Edidin, M. (1987) Micrometer-Scale Domains in Fibroblast Plasma-Membranes **J. Cell. Biol.** 105: 755-760.