



ANA CÉLIA RUGGIERO

AÇÃO DAS DROGAS TRIFLUOPERAZINA E PAPAVERINA E DO ESTRESSE OXIDATIVO EM ERITRÓCITOS

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação do Departamento de Bioquímica - IB, Universidade de Campinas, UNICAMP

ORIENTADORA:  
Prof(a) Dra. Nilce Correa Meirelles

CAMPINAS -SP

1994

502475

R843a  
23881/BC

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(s) candidato (a) Ana Célia Ruggiero e aprovada pela Comissão Julgadora.

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL

---

Ao  
Rolando,  
Alberto e  
Daniel

## **AGRADECIMENTOS**

À Dra Nilce Correa Meirelles pela orientação e confiança depositada em mim, meu sincero agradecimento.

À Dra Eneida de Paula pelo estímulo, sugestões e críticas, pelo empenho e amizade.

Ao Dr. Marcel Tabak, pela colaboração em parte do trabalho, pela sua dedicação à ciência e pela amizade.

Ao Dr. Antonio Alonso pela colaboração nos experimentos de Ressonância Magnética e pelas sugestões e correções.

À Dra. Satie Ogo pela leitura, críticas e sugestões.

Aos professores e funcionários do Departamento de Bioquímica pela atenção e colaboração.

Às funcionárias da secretária Andréia, Miriam e Mariana pela atenção, colaboração e competência.

Às amigas Fátima e Mariza, amizade preciosa, que tornou esse tempo um aprendizado de vida.

Aos grupo do laboratório, Alessandro, Eduardo, Luciane, Ricardo e Sônia (posso ter esquecido alguém, me desculpe), pelo ambiente de trabalho agradável, pela mútua cooperação e amizade.

Aos colegas da pós-graduação, em particular Mauro e Armindo.

Ao Rolando, que deu condições para que eu realizasse esse trabalho e aos meninos Alberto e Daniel, pelas ausências.

Agradeço ao todos que de uma forma ou outra colaboraram para a realização desse trabalho.

# ÍNDICE

ERIT-P... 2020

<b>ABREVIATURAS</b>	i
<b>RESUMO</b>	ii
<b>SUMMARY</b>	iv
<b>INTRODUÇÃO</b>	01
1. O ERITRÓCITO	01
2. HEMÓLISE HIPOTÔNICA DE ERITRÓCITOS	06
3. ENVELHECIMENTO DOS ERITRÓCITOS	08
4. DANO OXIDATIVO NO ERITRÓCITO	10
5. AÇÃO DE DROGAS SOBRE A MEMBRANA	15
5.1. TRIFLUOPERAZINA	14
5.2. PAPAVERINA	21
<b>OBJETIVOS</b>	23-a
<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	24
1. MATERIAIS	24
2. MÉTODOS	24
2.1. PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DA PAPAVERINA	24
2.1.1. DETERMINAÇÃO DO pKa DA PAPAVERINA	24
2.1.2. ESTUDOS DE LIGAÇÃO DA PAPAVERINA COM SURFACTANTES	25
2.2. PREPARO DAS AMOSTRAS DE MATERIAL BIOLÓGICO	26
2.2.1. SUSPENSÕES DE HEMÁCIAS	26
2.2.3. GHOSTS	27
2.2.4. SOLUÇÕES DE HEMOGLOBINA	27
2.3. TRATAMENTOS APLICADOS AOS ERITRÓCITOS	28
2.3.1. DEPLEÇÃO DE ATP	28
2.3.2. INCUBAÇÃO COM TRIFLUOPERAZINA E PAPAVERINA	28
2.3.3. INCUBAÇÃO COM PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO	29
2.4. MÉTODOS UTILIZADOS	29

2.4.1. CURVA DE RESISTÊNCIA À HEMÓLISE	29
2.4.2. AVALIAÇÃO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA DOS ERITRÓCITOS	30
2.4.3. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE FERRILHEMOGLOBINA	31
2.4.4. MEDIDAS DE FLUORESCÊNCIA	32
2.4.4.1. SUPRESSÃO DE FLUORESCÊNCIA DO TRIPTOFANO PELO ANS	32
2.4.5. DETERMINAÇÃO DA FLUIDEZ DOS ERITRÓCITOS POR RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA	34
<b>RESULTADOS</b>	40
1. DETERMINAÇÃO DO pKA DA PAV	40
1.1. NA AUSÊNCIA DE SURFACTANTES	42
1.2. NA PRESENÇA DE SURFACTANTES	43
2. FRAGILIDADE OSMÓTICA	45
2.1. EFEITO DA TFP NA HEMÓLISE HIPOSMÓTICA	46
3. PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA	48
4. OXIDAÇÃO DA HEMOGLOBINA	51
4.1. AÇÃO DA TRIFLUOPERAZINA NA FORMAÇÃO DE FERRILHb	54
4.2. AÇÃO DA PAPAVERINA NA FORMAÇÃO DE FERRILHb	56
4.3. MEDIDAS NA BANDA DE SORET	57
5. FLUORESCÊNCIA	63
5.1. DETERMINAÇÃO DA DISTÂNCIA ENTRE FLUORÓFOROS POR SUPRESSÃO DE FLUORESCÊNCIA	69
6. MEDIDAS DE RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA	74
<b>DISCUSSÃO</b>	81
1. PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DA PAV	81
2. EFEITO DE DROGAS E DEPLEÇÃO DE ATP	83
2.1. TRIFLUOPERAZINA	83
2.2. PAPAVERINA	93
2.3. DEPLEÇÃO DE ATP	97

<b>CONCLUSÕES</b>	103
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	106
<b>COMUNICAÇÕES EM CONGRESSO</b>	118

---

## ABREVIATURAS

ANS	1-anilino-8-naftaleno sulfonato
CTAC	Cloreto de cetiltrimetilamônio
5-Doxil	Ácido 5-doxil esteárico
12-Doxil	Ácido 12-doxil esteárico
ferrilHb	Ferrilhemoglobina
Hb	Hemoglobina
Hb-Fe II	Oxihemoglobina
Hb-Fe III	Metahemoglobina
Ht	Hematócrito
IAA	Iodoacetamida
INO	Inosina
$\lambda$	Comprimento de onda
metaHb	Metahemoglobina
oxiHb	Oxihemoglobina
PAV	1-[(3,4-dimetoxifenil)metil]-6,7-dimetoxiquinolina
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PC	Fosfatidilcolina
PE	Fosfatidiletanolamina
PS	Fosfatidilserina
RPE	Ressonância Paramagnética Eletrônica
SDS	Lauril sulfato de sódio
$\tau_c$	Tempo de correlação rotacional
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico
TFP	Trifluoperazina

## RESUMO

As drogas fenotiazínicas são amplamente utilizadas clinicamente como neuroléticos e antipsicóticos. A interação dessas drogas com a membrana eritrocitária induz a mudanças na forma bem como na permeabilidade do eritrócito. A atividade biológica dos fenotiazínicos pode perturbar a estrutura da membrana por ligação direta com os lipídios ou pela interação com as proteínas, perturbando a interação lipídio-proteína.

Nesse trabalho estudamos o efeito de duas drogas de efeitos clínicos diversos e de estruturas químicas diferenciados, a trifluoperazina, um derivado fenotiazínico e a papaverina, um vaso dilatador inespecífico (Goodman & Gilman, 1975), sobre os eritrócitos.

Através de medidas supressão de fluorescência, dos resíduos de triptofano das proteínas da membrana eritrocitária, em suspensões de ghosts, causada pela sonda de membranas ANS, observamos que a trifluoperazina interage com as proteínas da membrana eritrocitária. Nessa interação ocorre um rearranjo na membrana, expondo os resíduos de triptofano das proteínas da membrana, ao meio mais hidrofílico alterando de alguma forma a interação lipídio-proteína. Além disso, através de medidas de Ressonância Paramagnética Eletrônica com marcadores de spin derivados do ácido esteárico verificamos um aumento na fluidez da membrana, pela ação da trifluoperazina. Em condições

semelhantes, a papaverina, apresentou efeitos discretos sobre a fluidez da membrana, não sendo possível assinalar alterações na ordem ou mobilidade da membrana eritrocitária.

Em ghosts isolados de eritrócitos depletados de ATP ou em suspensões de células íntegras depletadas também foram detectadas alterações, na fluidez da membrana, sendo que essas modificações não parecem estar relacionadas a regiões específicas da membrana eritrocitária.

Numa segunda abordagem, avaliamos o efeito da TFP sobre a oxidação da hemoglobina provocada por peróxido de hidrogênio. Nos processos oxidativos a que a Hb foi submetida pelo peróxido de hidrogênio obtivemos um efeito protetor da TFP. Esse efeito é mais evidente para a hemoglobina oxigenada (oxiHb). A TFP se liga à oxiHb, protegendo a proteína da ação do peróxido de hidrogênio, antes da formação de qualquer intermediário, sendo que somente 10% da quantidade relativa inicial da Hb é transformada nas espécies oxidadas: meta e ferrilHb.

## SUMMARY

Phenothiazines drugs are mainly used as neuroleptics and antihistamines. These drugs disturb biological membranes, modifying the form and permeability of the membranes. Biologically active phenothiazines may perturb membrane lipid structure through two possible mechanisms, a direct interaction of the drug with membrane proteins, reflected in the lipid bilayer, and a perturbation of lipid structure that leads to perturbation of proteins via lipid-protein interactions.

In this work we studied the effect of two drugs with different clinical and chemical structure: trifluoperazine (TFP), a phenothiazine derivative, and papaverine, an inespecific vasodilator (Goodman & Gilman, 1975), upon erythrocytes.

Measurements of the quenching of tryptofan residues of the proteins of the erythrocyte membrane, by ANS, a membrane probe, proved that TFP interactes with membrane proteins of the erythrocytes membrane. In this interaction, a change in the protein were tridimensional arrangement exposes the tryptophan residues to a more hydrofilic region, and caused changes on the lipid-protein interaction of the erythrocyte membrane. Also the membrane fluidity is increase, as demonstrated by spin labelling, Eletron Paramagnetic Ressonace experiments. At the same conditions papaverine was demonstrated, papaverine demonstrated a slight

---

effect, that can not be assigned to a change in the membrane fluidity.

In the ghosts depleted from ATP or in suspensions of erythrocytes (also submitted to the ATP depletion) we found alterations in the membrane fluidity. This change seems to be different, depending on the membrane regions, as seen by EPR experiments.

Hemoglobin, treated with TFP, and submitted to the action of hydrogen peroxide, showed a protective effect of this phenothiazine drug on its oxidation, this effect being more pronounced for oxygenated Hb (oxiHb). TFP interacts with Hb and protects the protein from the peroxide action, before the formation of any intermediary species. Only 10% of the Hb was transformed in the oxidated species: meta and ferric Hb.

# INTRODUÇÃO

## 1. ERITRÓCITO

O eritrócito, a célula vermelha do sangue, é uma célula anucleada de forma discóide bicôncava, que contém hemoglobina em concentração elevada, de cerca de 22 mM/célula. As células circulam carregando oxigênio e dióxido de carbono entre o pulmão e os tecidos através dos vasos sanguíneos e capilares. A célula pode circular através dos capilares de diâmetro menor que a sua dimensão devido a sua capacidade de deformabilidade. Quando uma força é aplicada em uma direção, sabe-se que as células tornam-se alongadas em cerca de duas vezes do seu diâmetro na direção da força (Noji et alii, 1991). A habilidade da célula em sofrer essa transformação em resposta a uma força aplicada tem sido conhecida como deformabilidade celular (Noji et alii, 1991). Desta forma, a deformabilidade celular é um fator importante para a realização das suas funções *in vivo*. Além disso, a célula resiste à fragmentação. Essas duas situações requerem uma membrana extremamente flexível e muito estável. É a composição da membrana eritrocitária que permite a ela desempenhar suas funções, conferindo à célula sua capacidade de deformação e sua estabilidade (Chasis et alii, 1987).

A membrana eritrocitária é composta de uma bicamada lipídica que contém várias proteínas integrais, uma rede proteica (o

citoesqueleto proteico), e uma pequena porção de carboidratos ligados às proteínas (glicoproteínas) e aos lipídios (glicolipídios) (Gratzer, W.B. 1981).

Todos os lipídios das células vermelhas estão na membrana. A composição lipídica da membrana eritrocitária é (Storch & Kleinfeld, 1985):

colesterol - 25%

esfingomielina - 17,5%

glicolipídios - 10%

fosfolipídios - 47,5%

Os fosfolipídios estão distribuídos assimetricamente entre as monocamadas interna e externa da membrana eritrocitária. As regiões polares dos fosfolipídios, chamadas cabeças polares, estão expostas ao meio aquoso. A distribuição assimétrica nas duas monocamadas lipídicas é absoluta para a fosfatidilserina (PS) com todas as moléculas de PS se localizando na camada interna, bem como para a fosfatidiletanolamina (PE), onde a maior parte das moléculas, cerca de 80%, estão na monocamada interna (Devaux, 1991, Schroit & Zwall, 1991). Por outro lado a fosfatidilcolina (PC) (76%) e a esfingomielina (82%), preferencialmente se localizam na camada externa (Connor et alii, 1990; Devaux, 1991; Schroit & Zwall, 1991). Diferentes mecanismos são propostos para a manutenção da assimetria: i) a interação do esqueleto da membrana principalmente da espectrina com os amino-fosfolipídios, fixando esses compostos na monocamada interna, ii) uma

translocação específica ATP-dependente dos aminofosfolipídios da camada externa para a camada interna e iii) um lento "flip-flop" de fosfolipídios endógenos (Middelkoop et alii, 1988; Wilson et alii, 1993). Alterações na assimetria transmembranar de PS estão associadas a condições patológicas severas e podem contribuir para trombose. Eritrócitos de indivíduos com anemia falciforme apresentam perda de assimetria de PS e são procoagulantes. Eritrócitos de pacientes com diabetes tem deformabilidade reduzida e maior viscosidade membranar além de um aumento espontâneo de agregação, provavelmente associado a um aumento no movimento lipídico transmembranar passivo e à presença de PS na monocamada externa da membrana plasmática (Wilson et alii, 1993).

As proteínas da membrana do eritrócitos são subdivididas em duas classes: as proteínas periféricas e as integrais. As proteínas integrais tem uma parte central hidrofóbica que interage com os lipídios. A maioria das proteínas periféricas da membrana eritrocitária parece estar envolvida na formação de um extenso retículo submembranar, o citoesqueleto eritrocitário. O principal componente do citoesqueleto eritrocitário é a espectrina, além da actina e da proteína 4.1. A conexão entre as proteínas integrais e a espectrina no citoesqueleto é feita por uma família de proteínas, as ankirinas. Essa interação protege a integridade da célula na circulação (Platt et alii 1993). A interação da membrana com a espectrina tem sido exaustivamente pesquisada. Recentemente tem sido discutido o papel das interações eletrostáticas nessa interação

(Kahana et alii 1991), além disso a existência de regiões hidrofóbicas na molécula de espectrina e na bicamada lipídica, sugerem que as interações hidrofóbicas podem também ser importantes para a manutenção da forma do eritrócito (Streichman, 1991).

Um eritrócito humano sobrevive na circulação por aproximadamente 120 dias, e depois é removido pelo fígado ou pelo sistema reticuloendotelial. Durante a sua vida na circulação, o eritrócito sofre modificações no conteúdo de lipídios e proteínas da membrana, na atividade enzimática, na permeabilidade iônica, tamanho e deformabilidade (Jain 1988).

O eritrócito gera ATP através da glicólise para manter as suas condições fisiológicas. A concentração intracelular de ATP nos eritrócitos, influencia as propriedades morfológicas e mecânicas das células (Mosior et alii, 1990-a). Um longo tempo de estocagem ou o esgotamento metabólico, causam uma diminuição da microviscosidade da membrana celular (Mosior et alii, 1990-a). O efeito foi atribuído a uma diminuição da concentração intracelular de ATP. O nível intracelular de ATP influencia o estado tanto dos lipídios como das proteínas da membrana eritrocitária indicando um papel importante para o ATP na regulação das propriedades dinâmicas da membrana (Mosior et alii, 1990-a).

Como discutido, os lipídios na membrana eritrocitária encontram-se assimetricamente distribuídos, e a fosfatidilserina ocupa preferencialmente a monocamada interna da membrana. Sabe-se que a translocação da fosfatidilserina da monocamada

externa para a monocamada interna, requer ATP, uma vez que: a) o transporte não ocorre em células depletadas de ATP, b) o transporte é inibido pelo vanadato e c) o transporte pode ser reconstituído em ghosts de eritrócito reconstituídos na presença de  $Mg^{2+}$ -ATP (Schroit e Zwall, 1991). Além disso, a forma do eritrócito pode também ser modificada. Eritrócitos depletados de ATP tornam-se equinocíticos; a regeneração dos níveis de ATP devolve a forma discóide da célula e o excesso de ATP produz estomatócitos. Esses dados podem ser explicados por uma redistribuição dos fosfolipídios entre as duas bicamadas mediada por uma translocase fosfolipídio ATP-dependente (Devaux, 1991) .

A principal proteína transmembranar, a banda 3, em eritrócitos humanos desempenha várias funções: o transporte aniônico e a interação do citoesqueleto com proteínas citossólicas (Hb e determinadas enzimas glicolíticas). Essa interação é mediada pelo extenso domínio citoplasmático da banda 3, que se estende da bicamada até o citoplasma.

O domínio citoplasmático da banda 3 se encontra fosforilado não somente nos resíduos Ser/Thr, mas também nos resíduos de tirosina (Clari & Moret, 1989; Clari et alii, 1990). Várias quinases Ser/Thr e Tyr-proteínas bem como fosfatases P-Ser e P-Tyr-proteínas estão diferentemente distribuídas entre o citoplasma e as diferentes estruturas dos eritrócitos humanos e são afetados de forma diferente, *in vitro*, pela força iônica, pelo 2,3-difosfoglicerato e por outros metabólitos fosforilados (Clari et alii, 1990).

Na depleção metabólica, a fosforilação da Ser e da Tyr da banda 3 encontra-se diminuída. A defosforilação da Ser da banda 3 diminui o transporte aniônico, mediado pela banda 3, da membrana eritrocitária. A subsequente restauração metabólica dos eritrócitos depletados de ATP, restaura a Ser-fosforilação da banda 3, restaurando também o transporte aniônico (Clari et alii, 1990). Tal paralelismo entre Ser-fosforilação da banda 3 e o transporte aniônico através da membrana, indica que a fosforilação/defosforilação dos resíduos de serina da banda 3, pode estar funcionalmente correlacionada com o transporte aniônico, mediado por essa proteína (Clari et alii, 1990).

Por outro lado, elevados níveis de glicose podem causar a peroxidação dos lipídios da membrana e aumentar a fragilidade osmótica dos eritrócitos (Jain, 1989). Observou-se que esses efeitos são bloqueados quando os eritrócitos são pré-tratados com: a) fluoreto, um inibidor do metabolismo da glicose, b) com vitamina E, um antioxidante, c) com p-cloromercúrio benzoato e metirapone, inibidores do sistema citocromo P-450, ou d) com dimetilfurano, difenilamina e tiouréia, sequestradores de radicais oxigênio (Jain, 1989).

## 2. HEMÓLISE HIPOTÔNICA DE ERITRÓCITOS

A lise hipotônica das células vermelhas leva a uma perda da hemoglobina e outras proteínas citoplasmáticas, através de poros que se formam na membrana plasmática. Esses poros resultam de rupturas criadas quando a pressão interna gerada pela osmose rápida torna-se muito alta para ser suportada pela membrana (Chasis & Shohet, 1987). Medidas cinéticas da lise de eritrócitos humanos, utilizando pulsos elétricos sugerem que a ruptura da membrana acontece em etapas consecutivas: i) vazamento dos íons, ocasionando um desbalanceamento osmótico que conseqüentemente leva à ii) hemólise coloidal da membrana e à iii) formação de poros que tem um diâmetro médio de menos que 500 Å (Lee et alii, 1985).

Embora todo conteúdo citoplasmático seja perdido na ruptura, indicando que a barreira membranar tenha sido destruída, a membrana citoplasmática consegue reter, ainda, muito da sua integridade geométrica. A membrana pode, espontaneamente, recuperar suas propriedades por re-selagem ("resealing") em função da temperatura, pelo fato de que nesta operação o citoesqueleto proteico é preservado (Connor et alii, 1990). Se a lise ocorre em tampão à temperatura fisiológica (37°C), o tempo de vida dos poros é muito curto (alguns segundos), mas à 4° C eles permanecem na membrana por várias horas. Para explicar o papel da temperatura no processo de restauração da membrana, postulou-se que os poros representam regiões de descontinuidade na matriz lipídica da membrana eritrocitária (Lee et alii, 1985.).

Scherier et alii, (1992) utilizando marcadores de spin derivados dos glicerofosfolipídios observaram que a lise hipotônica é acompanhada por uma redistribuição dos fosfolipídios. A mudança na forma das linhas dos espectros de ressonância paramagnética eletrônica (RPE) mostraram que após a hemólise, a monocamada mais rígida (a mais externa) torna-se mais fluida, enquanto o inverso ocorre com a monocamada interna, que se torna mais rígida. Eles observaram também que, após a restauração das membranas, na presença de Mg-ATP, a assimetria transmembranar dos fosfolipídios foi restabelecida.

### 3. ENVELHECIMENTO DOS ERITRÓCITOS

O termo envelhecimento se refere a destruição de eritrócitos, que ocorre quando essas células são removidas da circulação em função do seu tempo de vida. Os mais tradicionais métodos para a separação de eritrócitos jovens e envelhecidos são baseados no gradiente de densidade, uma vez que as células jovens são menos densas que as envelhecidas. Por ser a Hb a maior constituinte dos eritrócitos, a densidade celular é principalmente determinada pela concentração de Hb intracelular. A concentração de Hb intracelular depende do conteúdo de água celular que, por sua vez, é regulado pela concentração de constituintes citoplasmáticos permeáveis, principalmente  $K^+$  e  $Na^+$  (Lee et alii, 1984). As células mais densas possuem permeabilidade ao  $K^+$  aumentada, o que resulta na diminuição do  $K^+$  intracelular. Com a redução do volume de água

intracelular, há um aumento na viscosidade intracelular, pelo fato da concentração de Hb ser muito elevada no interior dos eritrócitos. Esse fato contribui para uma diminuição da capacidade de deformabilidade do eritrócito (Nash et alii, 1983).

Outro fator que parece estar envolvido com a destruição das células envelhecidas, é alteração na membrana, ocasionando a hemólise osmótica. Observa-se, ainda, depleção metabólica do eritrócito, levando, conseqüentemente, à redução do nível intracelular de ATP, outro fator que pode levar à destruição das células (Stocchi et alii, 1987).

Estando envolvido no transporte do oxigênio, o eritrócito está mais exposto a processos oxidativos que outras células. As células mais densas possuem quantidades maiores de metaHb acompanhada por uma diminuição na citocromo-b<sub>5</sub> oxidase e seu cofator, citocromo b<sub>5</sub> (Imanishi et alii, 1985). Esse aumento no dano oxidativo pode ser causado por uma redução na atividade dos sistemas enzimáticos de defesa (Clark, 1988; Chen et alii, 1991). Como consequência, observou-se em eritrócitos mais densos aumento na quantidade de glutathiona oxidada e de hemicromo ligado à membrana além da presença de um complexo de espectrina e globina (Clark 1988, Pradhan et alii, 1990, Sullivan et alii, 1992).

As células mais densas possuem um conteúdo menor de lipídios totais que as células mais jovens, o que representa uma redução na área total da membrana, com concomitante diminuição nas proteínas da membrana (Clark, 1988).

De qualquer forma, as alterações decorrentes do o envelhecimento celular levam a um reconhecimento imunológico que permite a ligação de anticorpos autólogos, (sinalizando a senescência), permitindo a retirada dessas células da circulação.

#### 4. DANO OXIDATIVO NO ERITRÓCITO

O dano oxidativo dos componentes celulares tem sido estabelecido como um fator importante em várias condições patológicas. Os eritrócitos são particularmente suscetíveis ao dano oxidativo como resultado do alto conteúdo de ácidos graxos poliinsaturados das suas membranas e da alta concentração celular de oxigênio e hemoglobina, sendo a Hb um poderoso promotor de processos oxidativos (Clemens et alii 1987). Sob condições normais os eritrócitos são continuamente expostos a espécies reativas de oxigênio de fontes internas e externas. No interior do eritrócito, estima-se que mais que 3% da oxiHb (Fe II) é convertido em metaHb (Fe III) com a concomitante produção de radicais superóxido ( $O_2^-$ ) (van den Berg et alii, 1992). Em eritrócitos sadios o dano oxidativo significativo é prevenido por um eficiente sistema protetor constituído por uma série de compostos antioxidantes e enzimas, bem como por uma efetiva compartimentalização dos componentes dos eritrócitos. Os sistemas de defesa antioxidante incluem as enzimas catalase, superóxido dismutase e glutathione peroxidase além da vitamina E. Assim, as espécies de oxigênio mais reativas, que são formadas no citosol através da Hb, são detoxificadas antes que possam atingir a membrana celular, onde

através de dano oxidativo, poderia comprometer a integridade da célula (Halliwell & Gutteridge, 1989). No entanto, observa-se que uma pequena quantidade de espécies reativas de oxigênio pode atingir a face interna da membrana celular (van den Berg 1991). Por outro lado, a exposição freqüente dos eritrócitos às células metabolicamente ativas (fagócitos, por exemplo) pode contribuir para a manutenção de um contínuo estresse oxidativo na membrana dos eritrócitos. Muitos tipos de eritrócitos patológicos também possuem susceptibilidade aumentada ao estresse oxidativo. Além disso, em várias patologias que envolvem hemoglobinas anormais, verifica-se um aumento do dano oxidativo, que acelera a destruição dos eritrócitos (Chen et alii, 1991).

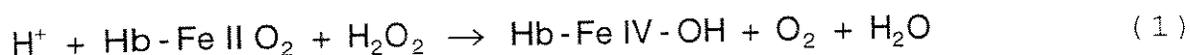
Os radicais peroxil lipídicos, que são formados como resultado do ataque de radicais livres aos lipídios da membrana, são convertidos a hidroperóxidos lipídicos pela ação da vitamina E. Se esses hidroperóxidos não são eficientemente removidos, a geração contínua dos mesmos (ainda que em níveis baixos), pode levar a efeitos adversos na estrutura e na função da membrana. Na presença de ferro (em qualquer forma), os hidroperóxidos podem ser decompostos e formar radicais, resultando numa amplificação do dano oxidativo na membrana. Além disso, a remoção incompleta de hidroperóxidos hidrossolúveis tal como o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) pode resultar no aumento da formação de radicais, que leva a danos oxidativos no citosol e na membrana (Halliwell & Gutteridge, 1989). O peróxido de hidrogênio é um hidroperóxido fisiológico formado continuamente pela dismutação do  $O_2^-$  (Cohen &

Hochstein, 1965; Chance et alii, 1979; Giulivi et alii, 1994) .O envolvimento de espécies reativas de oxigênio e a peroxidação lipídica em estados patológicos tais como, arteriosclerose, injúria na isquemia/reperfusão e anemia falciforme, tem instigado o interesse científico no processo de peroxidação lipídica (van den Berg et alii, 1992).

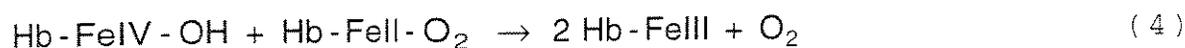
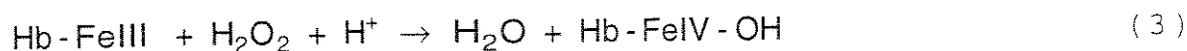
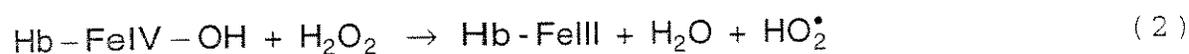
A hemoglobina (Hb), a principal hemoproteína das células vermelhas é responsável pelo transporte de  $O_2$  para os tecidos. Essa função depende da habilidade do íon Fe II, no heme, em ligar e liberar o oxigênio. A oxiHb (Hb-FeII) se autooxida a uma velocidade relativamente lenta formando metaHb (Hb-FeIII) e o ânion superóxido ( $O_2^-$ ), que sofre uma dismutação para formar  $H_2O_2$ . O mecanismo pela qual as espécies reativas de oxigênio podem causar injúria celular em vários tecidos pode estar ligado ao potencial citotóxico da interação hemoproteína/ $H_2O_2$  (Giulivi et alii, 1990). A oxidação do ferro hêmico da oxiHb (Hb-FeII) um ou dois equivalentes oxidantes acima do ferro II resulta na formação de Hb-FeIII e ferrilHb (Hb-FeIV-OH), respectivamente. Embora as reações iniciais entre Hb-FeII- $O_2$  e  $H_2O_2$  sejam complicadas pela seqüência de interações dos produtos com o peróxido de hidrogênio, fica claro que a ferrilHb é um forte agente oxidante, podendo promover oxidação, peroxidação e epoxidação de várias biomoléculas *in vitro* (Giulivi et alii, 1990). A exposição prolongada da Hb ao  $H_2O_2$  causa danos à Hb, tanto *in vitro* como *in vivo*. A Hb que foi desnaturada oxidativamente pelo peróxido é reconhecida e seletivamente degradada em eritrócitos e reticulócitos (Davies &

Goldberg, 1987). Embora o complexo ferrilHb tenha todos os atributos necessários para ser considerado uma espécie importante nos processos de dano oxidativo por radicais livres, a geração dessas espécies nos eritrócitos ainda não foi demonstrada.

A oxidação inicial da oxiHb pelo peróxido de hidrogênio pode ser descrita pela equação 1, formando  $O_2$  e ferrilHb:



Quando a concentração de Hb-FeII $O_2$  é alta o suficiente, as seguintes reações podem ocorrer:



Essas equações deduzidas por Giulivi (1990), são semelhantes, no balanço estequiométrico final, às apresentadas por Winterbourn (1985), diferem apenas nos passos intermediários, onde Winterbourn descreve etapas adicionais, além dessas descritas por Giulivi.

Quando há um fluxo contínuo de  $H_2O_2$  espera-se que o peróxido reaja com a ferrilHb produzindo metaHb e o radical hidroxila ( $HO_2^{\bullet}$ ), como descrito na equação (2). Na presença de baixa concentração

de oxiHb, a quantidade de peróxido pode ser alta o suficiente para reagir com toda metaHb formada, produzindo desta forma, ferrilHb e água (equação 3). Por outro lado, quando a concentração de hemoglobina é alta, a maioria do  $H_2O_2$  pode ser rapidamente consumida (equação 1) e a reação 4, não será favorecida. Sob tais condições toda ferrilHb reage com a oxiHb, produzindo metaHb, favorecendo, portanto, a reação 5 (Winterbourn, 1985; Guilivi, 1990).

A oxidação da metaHb pelo  $H_2O_2$  também leva à formação da ferrilHb (equação 4). Embora o estado ferril seja somente um equivalente acima do estado férrico do monômero metaHb, a oxidação consome 2 eq. redox de  $H_2O_2$ , que corresponde a uma molécula de  $H_2O_2$ , para alcançar o estado ferril. O outro equivalente redox está localizado na apoproteína, como um resíduo radicalar de aminoácido ( $\bullet$ Hb IV) (Kelder et alii, 1991). Se esse aminoácido radicalar é formado diretamente pelo  $H_2O_2$  ou via um intermediário de vida curta como o composto I (cátion de ferro IV oxeno porfirina  $\pi$  radicalar) ou por radicais hidroxil produzidos na clivagem homolítica do peróxido de hidrogênio, ainda não está bem esclarecido (Kelder et alii, 1991).

Na reação da metaHb com  $H_2O_2$  não somente ferrilHb é produzida mas há também a formação de espécies desnaturadas de hemoglobina. A presença de hemicromos de dímeros covalentemente interligados e polímeros tem sido observada (Solar & Shaklai, 1989; Wyse & Butterfield, 1989, Kelder et alii 1991-a).

Os derivados fenotiazínicos protegem o grupo heme de modificações causadas pelo  $H_2O_2$  (Kelder et alii, 1991-b).

A glutathiona reduzida (GSH), tem papel importante como antioxidante em eritrócitos em diferentes níveis. A oxidação da GSH pode ser resultado do ataque direto de radicais, mas também pode ocorrer indiretamente, através dos processos de reparo que necessitam de GSH, como a redução de grupos tiólicos de proteínas da membrana, que possam ter sido oxidados (van den Berg et alii, 1992), além de serem capazes de ligar hemina, potente agente hemolítico proveniente da oxidação da Hb (Sullivan et alii, 1992) .

## 5. AÇÃO DE DROGAS SOBRE A MEMBRANA

### 5.1. TRIFLUOPERAZINA: um derivado fenotiazínico

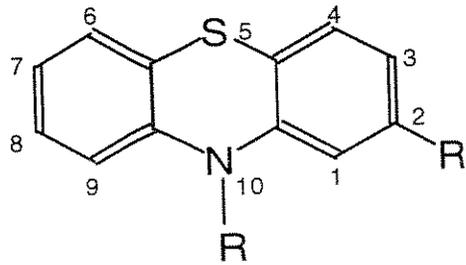
A despeito da complexidade da interação de drogas com as membranas biológicas, a ligação muitas drogas com as membranas, pode ter nas propriedades físico-químicas, tais como,  $pK_a$  e caráter lipofílico, a sua correlação. Isto é especialmente válido para drogas, como anestésicos, sedativos e tranqüilizantes (Marroum et alii 1993). e outras drogas lipofílicas, seus hemólogos, e metabólitos. Assume-se amplamente que a atividade biológica de compostos, tais como antibióticos, tranqüilizantes e anestésicos, resulta da ligação a um sítio ativo nas proteínas das membranas, enquanto os lipídios desempenham um papel mais passivo.

Entretanto, trabalhos com bicamadas lipídicas artificiais (membranas modelos) tem demonstrado que as propriedades estruturais dessas vesículas podem ser afetados pela presença de moléculas associadas à membrana (Jones & Lee, 1985; Zachowski & Durand, 1988; Hitzemann, 1989; Lissi et alii, 1990; Jorgensen et alii, 1991).

As drogas de uma forma geral podem penetrar nos eritrócitos, aderir à superfície das células, ou ambos. A distribuição entre o eritrócito e o plasma aquoso, é governada pelas propriedades biológicas da membrana e físicas.

As drogas fenotiazínicas são largamente utilizadas na prática médica principalmente como neuroléticos ou agentes antipsicóticos, mas são também empregados como antieméticos, antinauseantes e anitistamínicos. A interação dos fenotiazínicos com a membrana eritrocitária tem sido estudada largamente (Lieber et alii, 1984; Yamaguchi et alii, 1985; Luxnat & Galla, 1986; Minetti & Di Stasi, 1987; Rosso et alii, 1988; Zachowski & Durand, 1988; Ondrias et alii, 1991; Spinedi et alii, 1992; Morroum & Curry, 1993; Thompson et alii, 1993). Foi mostrado que essas drogas induzem mudanças na forma bem como na permeabilidade dos eritrócitos.

A estrutura geral dos fenotiazínicos é:



Os compostos formados pela substituição no anel dos fenotiazínicos por halogênios ou outros grupos funcionais modificam muito o tipo da atividade e a potência farmacológica. Para a atividade antipsicótica, há influência da substituição na posição 2 e a estrutura da cadeia lateral na posição 10 (Tozer & Tuck, 1965; Vazquez et alii, 1992)

Os fenotiazínicos podem ser divididos em 3 grupos, com relação à substituição na posição 10 (Tabela I): a) cadeia lateral alifática, tal como a clorpromazina (CPZ) e a trifluopromazina (TPMZ), de baixa potência antipsicótica; b) cadeia lateral piperidínica, tal como a tioridazina (THZ); c) cadeia lateral piperizínica, tal como a fluofenazina (FPZ) e a trifluoperazina (TFP), compostos com alta potência psicótica (Vazquez et alii, 1992).

## SUBSTITUINTES

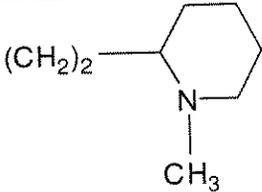
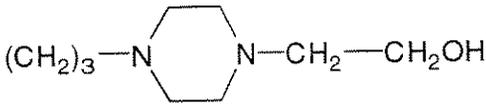
FENOTIAZ.	POSIÇÃO 2	POSIÇÃO 10	TIPO
THZ	SCH <sub>3</sub>		b
2-TRIFLUOFENOTIZÍNICOS			
TPMZ	CF <sub>3</sub>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> —N—(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	a
FPZ	CF <sub>3</sub>		c
TFP	CF <sub>3</sub>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> —N—N—CH <sub>3</sub>	c

Tabela I - Diferentes tipos de fenotiazínicos e seus substituintes (Vazquez et alii, 1992)

A maioria dos fenotiazínicos são bases fracas anfifílicas. Os valores de  $pK_a$  do grupamento amina para as principais drogas fenotiazínicas são: CPZ 9,3, TFPZ 9,1 e TFP 8,1. Em pH 7,4, os fenotiazínicos por serem aminas, estarão nas formas ionizadas. A existência da carga positiva na amina confere um certo grau de polaridade que deve ser o mesmo para todos os membros dessa classe de drogas (Marroum et alii 1993).

De todos os derivados fenotiazínicos, o mais estudado é, sem dúvida, a clorpromazina (CPZ), que tem um átomo de cloro substituinte na posição 2 e, na posição 10, a cadeia lateral da trifluopromazina (TPMZ) (vide tabela I).

Os fenotiazínicos, em baixas concentrações, tem um efeito estabilizante na membrana eritrocitária mas estão associados à hemólise em altas concentrações, efeito que já foi também observado em outras membranas (Seeman et alii 1972). Esse efeito parece ser mediado pela membrana, mas o mecanismo específico da alteração na permeabilidade não é claro ainda. Lieber et al. (1984) notou a formação de pequenos poros em membranas eritrocitárias saturadas com clorpromazina e sugeriu que esse fenômeno levaria ao inchamento da hemácia e à hemólise. Yamaguchi et alii. (1985) utilizando a técnica de ressonância paramagnética eletrônica, com marcadores de spin que se ligam à proteínas (TEMPO e maleimida) além de marcadores lipídicos (derivados do ácido esteárico), em "ghosts" de eritrócitos, mostrou que a CPZ (1-50 mM) se liga preferencialmente às proteínas da membrana, provocando um aumento da fluidez da membrana, em baixa concentração de droga. Para concentrações maiores, a fluidez da membrana diminui, e há agregação dos lipídios com a droga. Nesse caso, os marcadores de spin lipídicos ligam-se preferencialmente aos domínios hidrofóbicos das proteínas ao invés de se ligarem aos domínios lipídicos rígidos (Yamaguchi et alii, 1985).

Os fenotiazínicos podem perturbar a estrutura lipídica da membrana através de dois possíveis mecanismos, segundo Minetti e Di Stasi (1987): i) uma interação direta da droga com alguma proteína da membrana, refletindo na bicamada ii) uma perturbação na estrutura lipídica que leva a alteração nas proteínas via interações lipídio-proteína.

Rosso e colaboradores (1988) utilizando RPE com marcadores de spin e baseando-se em resultados da literatura mostrando que: a) a clorpromazina afeta a fluidez lipídica; b) se liga a superfície hidrofóbica de proteínas da membrana; c) é rapidamente acumulada na monocamada interna dos eritrócitos, produzindo uma redistribuição dos fosfolipídios; e d) induz a uma rápida estomacitose devido a sua acumulação na camada lipídica interna da membrana; investigaram o efeito da CPZ sobre a translocação dos fosfolipídios na membrana eritrocitária. Os resultados obtidos mostraram um pequeno efeito inibidor na atividade de translocase dos fosfolipídios na célula vermelha. Essa diminuição da atividade da translocase, resulta em: i) uma diminuição na velocidade de transporte de análogos de fosfatidilserina (PS) e PE e ii) uma distribuição transmembranar modificada dos marcadores de spin análogos de PS e PE. Eles interpretaram o efeito da CPZ como sendo devido a uma reorganização da bicamada, acompanhando a penetração rápida da droga na membrana.

Outro efeito da CPZ sobre o eritrócito, já bem estudado é a inibição da atividade da acetilcolinesterase (EC3.1.1.7; AChE) por interação molecular direta (Spinedi et alii, 1991). Essa inibição é

dependente da concentração de droga, é inicialmente não competitiva com o substrato, transformando-se no tipo "misto" com concentração de CPZ ao redor de 50  $\mu\text{M}$  (Spinedi et alii, 1992). Esse resultado leva à possibilidade de que a CPZ interage com a enzima na forma monomérica e também na forma de agregados micelares, resultando em diferentes efeitos inibitórios. Na concentração de 30-50  $\mu\text{M}$  a clorpromazina sofre agregação micelar (Luxnat e Galla 1986). A trifluoperazina também demonstra esse comportamento, mas para uma concentração menor 20-30  $\mu\text{M}$  (Spinedi et alii, 1992).

Por outro lado, os fenotiazínicos são bons doadores de elétrons o que leva à formação de radicais catiônicos (Levy et alii, 1972) relativamente estáveis. Esses radicais podem estar envolvidos como intermediários na oxidação *in vivo* dos fenotiazínicos a sulfóxidos e produtos hidroxilados no anel (Forrest e Green 1972). Kelder et alii (1991-a) verificaram a formação de radical catiônico da clorpromazina ( $\text{CPZ}^{+\bullet}$ ) durante a reação da droga com metaHb, na presença de peróxido de hidrogênio. Na reação da metaHb com  $\text{H}_2\text{O}_2$  ocorrem ligações cruzadas ("cross links") entre a hemeproteína, e os derivados fenotiazínicos protegem a formação dessas ligações cruzadas. A extensão da proteção é dependente da capacidade de doar elétrons do substituinte na posição 2 (Kelder et alii, 1994). Doadores de elétrons mais eficientes são convertidos mais rapidamente a radicais catiônicos e, por reduzirem o radical proteico formado, protegem a desnaturação da Hb (Kelder et alii, 1991-a, Perez-Gilabert et alii, 1994).

## 5.2. PAPAVERINA: um alcalóide benzil-isoquinolínico

Os efeitos farmacológicos de alcalóides benzil-isoquinolínicos são conhecidos a muito tempo. Desde 1914 a papaverina (PAV, Figura 1), droga padrão do grupo dos alcalóides benzilisoquinolínicos, tem sua ação descrita na literatura como um vasodilatador do tono de todos os músculos lisos sem interferir com a contração normal (Sollmann, 1949). Tanto a PAV, como seu análogo estrutural, a etaverina, tem sido utilizados no tratamento do infarto agudo do miocárdio, na angina pectoris, na asma brônquica e também na cólica biliar (Grollman, 1951). A papaverina (PAV) também diminui a susceptibilidade do coração à fibrilação ventricular provocada tanto pela estimulação elétrica, como pela ligadura da coronária (Sakamoto 1983).

Atualmente ela é considerada obsoleta para a terapêutica nos quais foi utilizada, mas a descoberta de ações detectadas a nível bioquímico, reativaram o interesse para o estudo da PAV (Ferrari, 1974). Como por exemplo, a PAV inibe a atividade da enzima fosfodiesterase e o efluxo de AMP cíclico em diferentes tecidos (Campbell & Taylor, 1981).

Meirelles et alii (1985) demonstraram que a PAV reduz a afinidade da Hb pelo oxigênio e, posteriormente (Paula e Meirelles, 1992) que esse efeito é observado tanto no sangue total como em preparações de Hb purificada. A interação de Hb com a PAV torna a molécula de Hb mais estável na forma desoxigenada e menos

resistente à oxidação. Em sangue total foi verificado um aumento na concentração de metaHb, por ação daPAV (Paula e Meirelles, 1992).

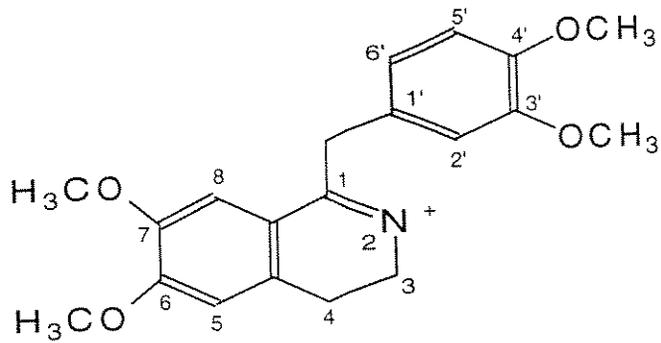


Fig.1- Estrutura química da papaverina (6,7-dimetoxi-1-verticil-isoquinoleína).

## OBJETIVOS

Foram nossos objetivos nesse trabalho:

- 1) Estudar a interação de eritrócitos intáctos com as drogas papaverina e trifluoperazina, e a influência dessa interação nas propriedades estruturais e dinâmicas da membrana do eritrócito (fluidez, resistência e hemólise)
- 2) Avaliar o efeito desses fármacos na oxidação da hemoglobina, induzida pelo peróxido de hidrogênio, em seus diferentes estágios desse processo (formação de metaHb e ferrilHb) para maior compreensão dos mecanismos de ação desses agentes e da interrelação com os efeitos observados na membrana eritrocitária.
- 3) Avaliar a peroxidação lipídica, induzida por peróxido de hidrogênio em eritrócitos submetidos à depleção de ATP e ao bloqueio dos grupos SH, além do efeito da trifluoperazina nesse processo.
- 4) Estudar o efeito da trifluoperazina e da papaverina sobre o estresse oxidativo induzido de eritrócitos
- 5) Estudar a interação da papaverina com membranas modelo (micelas de detergente) e seu efeito nas propriedades físico-químicas da PAV.

# MATERIAIS E MÉTODOS

## 1. MATERIAIS

O sangue foi obtido de ratos adultos Wistar pesando 180 a 250 g, mantidos em jejum por 12 horas.

As drogas papaverina e trifluoperazina, bem como iodoacetamida, metahemoglobina, tetraetoxipropano e ANS foram adquiridas da Sigma Chemical Company.

Etanol, butanol, azida sódica, ácido acético, ácido tricloacético, foram adquiridos da MERCK.

Os marcadores de spin, 5-doxil, 12-doxil e 16-doxil estearato forma adquiridos da Aldrich.

Os demais reagentes utilizados foram de máximo grau de pureza encontrados comercialmente, similares aos citados.

## 2 MÉTODOS

### 2.1. PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DA PAPAVERINA

#### 2.1.1. Determinação do pKa da PAV

A Papaverina foi utilizada na forma de cloridrato.

Para determinação do pKa da droga foram preparadas com 2 soluções estoques de 10 mM cada, a saber: tampão acetato (20 mM) para valores de pH (2-5) e com tampão fosfato (20 mM) para os pH (6-12). A solução de PAV (10  $\mu$ M) foi ajustada em intervalos de 0,5 a 1,0 unidades de pH, para uma larga I<sub>1</sub>/I<sub>2</sub> faixa de pH (1,5-12,5) com NaOH 0,1 M e HCl 0,1 M.

Os espectros de absorção óptica (Espectrofotômetro Beckmann, DU-70) foram obtidos na faixa de 220 a 280 nm. Para determinação do pKa da droga, um comprimento de onda foi escolhido (260 nm). Com as leituras de absorbância nesse comprimento de onda, para todos os pH, faz-se o cálculo do parâmetro  $\alpha$ , dado por:

$$\alpha = \frac{A_{\text{pH}} - A_{\text{base}}}{A_{\text{ácido}} - A_{\text{base}}} \quad (5)$$

Onde  $A_{\text{pH}}$ ,  $A_{\text{base}}$  e  $A_{\text{ácido}}$  são as absorbâncias determinadas em 260 nm no pH de leitura, para a forma protonada e para a forma não protonada da PAV, respectivamente. A partir de um gráfico de  $\log(\alpha/1-\alpha)$  versus pH determina-se o pKa da droga, no ponto em que a reta cruza o eixo X ( $\log \alpha/1-\alpha = 0$ ).

### 2.1.2. Estudos de ligação da droga com surfactantes

A ligação de papaverina em micelas de surfactantes resulta em mudanças no pKa da droga. Nesse trabalho verificamos o efeito dos surfactantes, sobre o pKa da PAV: lauril sulfato de sódio (SDS) e o

cloreto de cetiltrimetilamônio (CTAC), detergentes aniônico e catiônico respectivamente.

As soluções foram as mesmas utilizadas para determinação do pKa da droga. A concentração de surfactante variou na faixa de 0,2 a 80 mM. A concentração de PAV usada foi de 10  $\mu$ M. Os espectros de absorção foram obtidos na ausência e na presença dos surfactantes e o pKa determinado como descrito anteriormente (item 1.1, Métodos).

## **2.2. Preparo das amostras de material biológico**

### **2.2.1. Preparo das suspensões de hemácias**

As suspensões de hemácias foram preparadas a partir de sangue de ratos. O sangue foi coletado em solução anticoagulante, Alsever (citrato de sódio - 8,0 g/L, ácido cítrico - 0,55 g/L, glicose - 20,5 g/L e cloreto de sódio - 4,2g/L) e centrifugado a 4°C por 5 minutos a 700xg. O plasma e os leucócitos foram removidos por aspiração. Os eritrócitos foram então ressuspensos em PBS, solução salina tamponada, em osmolaridade e pH fisiológicos e centrifugados novamente, por 3 vezes. Obteve-se então o concentrado de hemácias que foi ressuspenso em soluções de hematócritos diferentes, de acordo com o objetivo do experimento.

### **2.2.2. Preparação de Membranas de hemácias ("ghosts")**

Para a preparação dos ghosts, utilizou-se hemácias obtidas a partir de sangue humano. As hemácias, depois de lavadas 3 vezes com PBS, foram suspensas em tampão fosfato (5 mM, pH 8), em volume 40 vezes maior que o seu. Centrifugou-se essa suspensão por 12.000xg, por 15 minutos. para retirar a hemoglobina. Esse procedimento foi repetido várias vezes, até que se conseguisse retirar toda a hemoglobina da amostra e as membranas ficassem esbranquiçadas. Essas membranas foram congeladas e, no momento da utilização, incubadas por 10 minutos a 37°C e ressuspensas em PBS.

### **2.2.3. Preparo das soluções de hemoglobina**

Para determinação do efeito da TFP e da PAV na formação do radical ferrilHb (Fe-IV) na presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, foram utilizadas soluções de metahemoglobina cristalizada, comercial (Sigma) sem nenhum tratamento prévio.

No preparo de hemoglobina purificada, as amostras de sangue adulto foram lavadas 3 vezes em salina (0,154 M NaCl, 1:2 V/V, centrifugadas 1400xg, 5 min.) e hemolisadas com água destilada (V/V) e centrifugadas (1400xg, 5min) desprezando-se o precipitado. O hemolisado foi filtrado em Sephadex G-25, contra tampão Bis-TRIS 0,02M, pH 8,0. Nesse procedimento a Hb é purificada de compostos de baixo peso molecular, como os fosfatos orgânicos,

que ficaram retidos no gel (Berman et alii, 1977). Em seguida, a solução de Hb foi dialisada durante a noite (12 horas) contra tampão bis-Tris 0,02 M, pH 7,4. Nas determinações essas soluções foram diluídas até a concentração de 10  $\mu$ M, e ajustadas para pH 5.

## **2.3. Tratamento das suspensões de hemácias**

### **2.3.1. Tratamento para a depleção de ATP**

Para a depleção de ATP, o concentrado de eritrócitos (seção 2.1, métodos) foi ressuspense em igual volume de solução I, contendo KCl (145 mM), Hepes (10 mM), Inosina (30 mM) e Iodoacetamida (5 mM). A suspensão foi então incubada a 37°C por 2 horas. Ou o concentrado de eritrócitos foi ressuspense (V/V) com uma solução II, idêntica à solução I (KCl 145 mM, Hepes 10 mM e Iodoacetamida 5 mM) mas sem a presença de Inosina. A suspensão foi então incubada por 2 horas a 37°C (Daleke et alii, 1985).

### **2.3.2. Tratamento com Trifluoperazina e Papaverina**

As suspensões de hemácias foram incubadas com essas drogas, sempre a 37°C, por 1 hora. As suspensões foram então centrifugadas para retirar o excesso de droga e novamente ressuspensas no hematócrito desejado. De acordo com o experimento foram utilizadas diferentes concentrações das drogas.

### **2.3.3. Tratamento com peróxido**

No tratamento com peróxido de hidrogênio o concentrado de hemácias foi ressuspensão para hematócrito de 4%, em salina tamponada contendo 4 mM de azida sódica. A azida sódica tem a finalidade de inibir a ação da enzima catalase. Após um período de 15 minutos à temperatura ambiente, as soluções de hemácias foram incubadas por 1 ou 2 horas, a 37°, com peróxido de hidrogênio em concentrações que variaram de 0,5 a 10 mM. Após o período de incubação, as suspensões de hemácias foram centrifugadas, a fim de retirar o excesso de peróxido.

## **2.4. Métodos**

### **2.4.1. Resistência à hemólise**

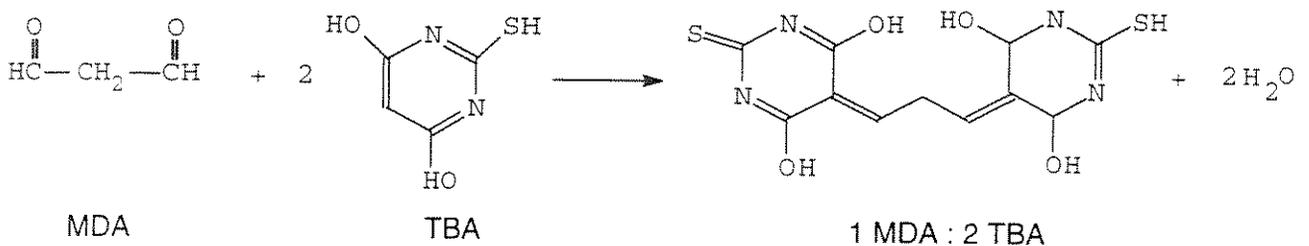
A determinação da resistência à hemólise foi acompanhada, após a incubação das suspensões de eritrócitos com diferentes concentrações de droga (PAV e TFP), pela liberação da hemoglobina. Após centrifugação (1400xg, 10 min) a concentração de hemoglobina no sobrenadante após a foi determinada espectrofotometricamente a 540 nm. Nesse comprimento de onda, a absorvidade molar da oxiHb é de 55.200 (Riggs, 1981). A concentração de hemoglobina liberada pelas hemácias

ressuspensas em água foi utilizada como controle de 100% de hemólise.

#### 2.4.2. Teste para a avaliação de peroxidação

A técnica utilizada para a avaliação da formação de peróxidos foi a do ácido tiobarbitúrico (TBA). Essa técnica nos permite avaliar a extensão da reação de peroxidação a partir dos aldeídos de baixa massa molecular que são produtos finais da cadeia de lipoperoxidação, entre eles o malondialdeído (MDA) formados na quebra dos ácidos graxos poliinsaturados da membrana. esses aldeídos reagem com o TBA formando complexos de cor avermelhada, ditas espécies reativas ao TBA (TBARS). Esses complexos podem ser detectados espectrofotometricamente (Buege e Aust, 1979; Yagi 1976).

A reação que ocorre é a seguinte:



Alíquotas de 1,0 mL das suspensões de hemácias tratadas com  $\text{H}_2\text{O}_2$  foram misturadas com 0,1 mL de ácido tricloroacético (TCA, a 30%) e deixadas em banho de gelo por 2 horas, a fim de precipitar todas as proteínas, principalmente a hemoglobina. Após

esse período, as suspensões foram centrifugadas a 11.500×g , por 15 minutos. Ao sobrenadante foi adicionado 0,25 mL de uma solução de TBA (0,67% em ácido acético glacial) e as amostras foram incubadas a 90°C, por 15 minutos. Em seguida, as amostras foram então colocadas em banho de gelo, por 10 minutos, e foi adicionado o mesmo volume de butanol. Após agitação realizou-se nova centrifugação (1400×g, 5 minutos) e separou-se a camada orgânica sobrenadante (butanol) para a determinação da concentração de TBARS. A concentração de TBARS foi determinada usando uma curva padrão de tetraetoxipropano que se converte linearmente em malondialdeído, um produto final da cadeia lipoperoxidativa (Yagi, 1976; Ohkawa et alii, 1979).

#### 2.4.3. Determinação da concentração de ferrilhemoglobina

Os espectros das soluções de hemoglobina foram obtidos na faixa de 500-800 nm a fim de se detectar os produtos de oxidação: metaHb (pico ou ombro característico a 630 nm) ou ferrilHb (nenhum pico a 630 nm; ombro chato na região de 570 nm).

As concentrações relativas de oxi, meta e ferrilHb foram calculadas a partir das fórmulas obtidas dos coeficientes de extinção molar dados por Winterbourn (1982), e descritas por van den Berg et alii, 1992. As concentrações são dadas em molaridade.

$$[\text{oxiHb}] = - 472 A_{560} + 536 A_{577} - 104 A_{630}$$

$$[\text{metaHb}] = - 784 A_{560} + 430 A_{577} + 1500 A_{630}$$

$$[\text{ferrilHb}] = 976 A_{560} - 536 A_{577} - 476 A_{630}$$

Para verificar se a TFP ou a PAV exerciam efeito protetor sobre a destruição do grupo heme da Hb causado pelo peróxido de hidrogênio, foram feitas cinéticas de redução da absorção óptica a 405 nm. Essas determinações foram feitas para as mesmas amostras em que concentrações das espécies de Hb foram obtidas, e em intervalos de tempo especificados nos resultados.

#### 2.4.4. Medidas de fluorescência

O ANS (1-anilino-8-naftaleno sulfonato), mostrado na figura é uma sonda de fluorescência muito utilizada para determinações de alterações na fluidez das membranas. A fluorescência do ANS é extremamente sensível a mudanças no ambiente experimentado pela sonda. (Slavik, 1982). Ele liga-se, não covalentemente, tanto às proteínas como aos lipídios das membranas.

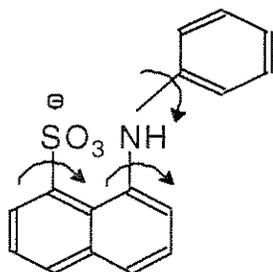


Figura 2 - Estrutura do ANS - 1-anilino-8-naftaleno-8-sulfonato

##### 2.4.4.1. Supressão da fluorescência do Triptofano pelo ANS

A ligação do ANS com as membranas de hemácias foi analisada em amostras contendo 150 µg de proteínas/ mL, determinada pelo método de Lowry (1951). A faixa de concentração de ANS foi de 5 - 80 µM, em PBS (pH 7,4).

Para observação da fluorescência (Espectrofluorímetro Perkin Elmer) do triptofano, o comprimento de onda para excitação foi 295 nm e a faixa emissão registrada foi de 305 a 580 nm, com máximo em 335 nm.

Um gráfico duplo recíproco da diminuição da intensidade de fluorescência do triptofano versus concentração de ANS. O intercepto da ordenada fornece o valor máximo de transferência de energia (supressão) entre o triptofano e o ANS, que corresponde a um estado de completa ocupação dos sítios de ligação do ANS na membrana (Watala e Gwozdzuski, 1993). A aparente separação intercromóforo R , que é, na membrana, a distância que separa as moléculas de triptofano e de ANS, foi determinada a partir dos valores da eficiência de transferência de energia (E) de acordo com a equação 6 (Andley e Chakrabarti, 1981):

$$R = R_0 (1 - E)^{1/6} \quad (6)$$

onde  $R_0$  é a distância (em Å<sup>o</sup>), em que a eficiência é igual a 0,5, e E é o valor do coeficiente de supressão determinado em 1/intercepto das ordenadas dos gráficos duplos recíprocos como na figura 25. O valor de  $R_0$  para a membrana eritrocitária é de 23.3 Å<sup>o</sup> (Brocklehurst, 1970)

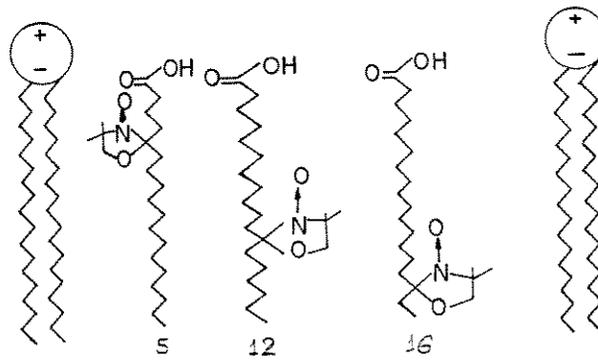
#### 2.4.5. Fluidez da membrana pelo método de RPE

Para se determinar o efeito da TFP e PAV sobre os lipídios da membrana e sua organização, utilizamos a técnica de ressonância paramagnética eletrônica com marcadores de spin. A técnica de RPE com marcadores de spin fornece informações estruturais e dinâmicas sobre as proteínas e lipídios das membranas (Hubbell e McConnell, 1976). Os marcadores de spin são moléculas paramagnéticas estáveis, geralmente derivados de nitróxidos (N-O, fragmento paramagnético). Os espectros de RPE são sensíveis aos movimentos moleculares e à natureza do meio.

Utilizamos marcadores de spin lipídicos que tem semelhança estrutural com os componentes da membrana. São derivados nitróxidos de ácidos graxos ou fosfolipídios. Na membrana eles se orientam ao lado das cadeias das moléculas lipídicas, com seu eixo longo de sua molécula, perpendicular à normal da bicamada.

Os marcadores de spin utilizados foram: o 5-doxil estearato e 12-doxil estearato e o 16-doxil estearato. Nesses marcadores o grupamento nitróxido em anel oxazolidínico está ligado, respectivamente, ao carbono 5, ao carbono 12 e ao carbono 16 do

ácido esteárico, monitorando desta forma, regiões diferentes da membrana. Os diferentes marcadores fornecem, dessa forma, informações sobre as regiões mais ou menos profundas da bicamada lipídica da membrana.



Marcadores de SPIN Derivados do Ácido Esteárico

Fig.3 - Orientação e localização dos derivados nitroxídeo do ácido esteárico nas membranas. Os números indicam a distância entre o radical nitroxídeo e o grupo carboxílico.

Essas medidas foram efetuadas suspensões de eritrócitos íntegros, sempre à temperatura de 37 °C, pois a temperatura tem grande influência no movimento dos marcadores de spin. Nos experimentos de RPE as suspensões de hemácias foram sempre realizadas em hematócrito de 50% a fim de manter uma relação ideal entre a quantidade de marcador e de lipídio, a fim de se obter um espectro com intensidade de sinal que possibilite a determinação dos parâmetros.

A partir do espectro de RPE determinamos o parâmetro de ordem (S) que pode ser calculado pela equação de Hubble e McConnell (1976), quando, no marcador de spin, o eixo da ligação N-O é paralelo à normal da bicamada, como os doxil estearato usados (Figura 3).

$$S = \frac{(A_{//} - A_{\perp})}{A_{zz} - 0,5(A_{xx} - A_{yy})} \quad (7)$$

A constante A (medida em Gauss), o desdobramento hiperfino entre as linhas de RPE, é dependente da orientação da amostra em relação ao campo. Os parâmetros  $A_{//}$  e  $A_{\perp}$  referem-se respectivamente, desdobramentos hiperfinos correspondentes aos marcadores orientados com seus eixos longos moleculares paralela e perpendicularmente, em relação ao campo externo, são obtidos a partir dos espectros (Figura 4). Os parâmetros  $A_{zz}$ ,  $A_{xx}$  e  $A_{yy}$ , indicam o valor da constante hiperfina A nas tres direções paralelas aos eixos principais e são obtidos do espectro de pó, ou seja o marcador totalmente imobilizado. Para a maioria dos radicais nitróxido, os valores do tensor, medidos em monocristal são:  $A_{xx}$  e  $A_{yy} \approx 6$  G e  $A_{zz} \approx 32$  G (Griffith e Jost, 1976). O movimento do marcador de spin é extremamente influenciado pela temperatura, assim todas as medidas foram realizadas a 37 °C.

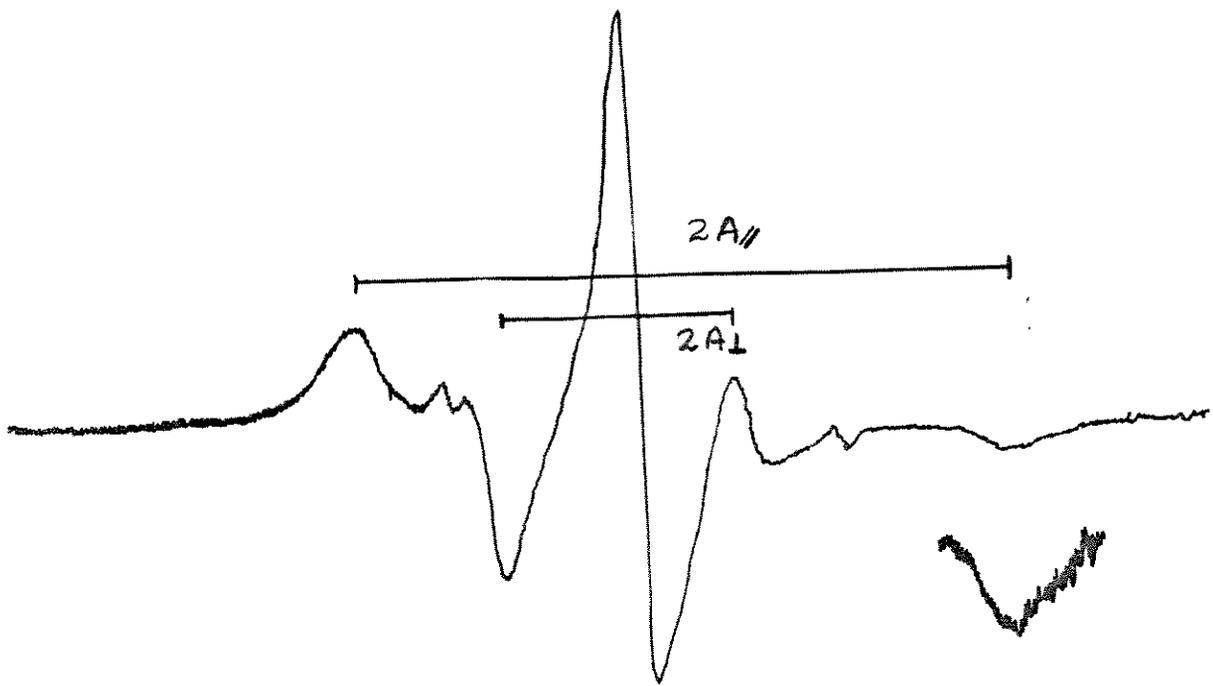


FIGURA 4 - Espectro de RPE de suspensões de eritrócitos (Ht 50%) marcadas com 5-doxil estearato, em PBS, pH 7,4, 37°C.

Para o marcador de spin 12-doxil estearato, inserido em região hidrofóbica da membrana de menor ordem, não foi possível medir com precisão os parâmetros  $2 A_{//}$  e  $2 A_{\perp}$ , por esse motivo os parâmetros empíricos  $I_1$  e  $I_2$  foram determinados, a partir dos espectros. Esses parâmetros estão relacionados com a solubilidade do marcador na membrana.

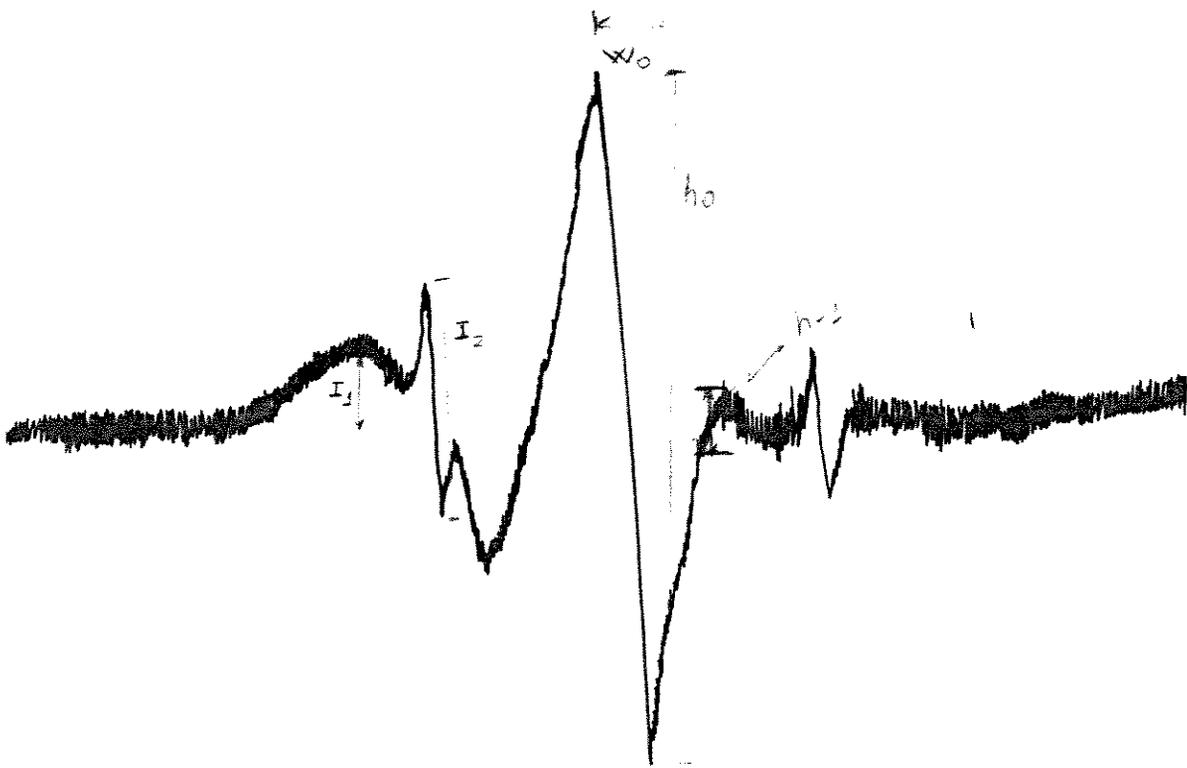


Figura 5 - Espectro de suspensões estearato.

marcadas com 12-doxil

Em marcadores cujos espectros apresentam contribuição significativa de sinal de movimento livre, é possível calcular o tempo de correlação rotacional ( $\tau_c$ ), a partir de medidas de parâmetros obtidos diretamente do espectro de RPE, utilizando a expressão abaixo:

$$\tau_c = 6,5 \times 10^{-10} \cdot \Delta H_o \left( \sqrt{\frac{h_o}{h_{-1}}} - 1 \right) \quad (8)$$

onde  $\Delta H_o$  é a largura pico a pico da linha de campo central e  $h_o$ ,  $h_{-1}$  são as intensidades dos componentes em campo central e alto no espectro (Figura 4). A medida de  $\Delta H_o$  em Gauss fornece o valor de  $\tau_c$  em segundos.

## RESULTADOS

### 1. DETERMINAÇÃO DO pKa DA PAV

#### 1.1. Na ausência de agentes surfactantes

O pico de absorção máxima da Papaverina apresenta deslocamento para o azul e discreta hipocromia, em função do pH. A figura 6 apresenta os espectros de absorção óptica da PAV, em função da variação do pH. A concentração de PAV utilizada foi de  $10\ \mu\text{M}$  para se evitar a precipitação da droga.

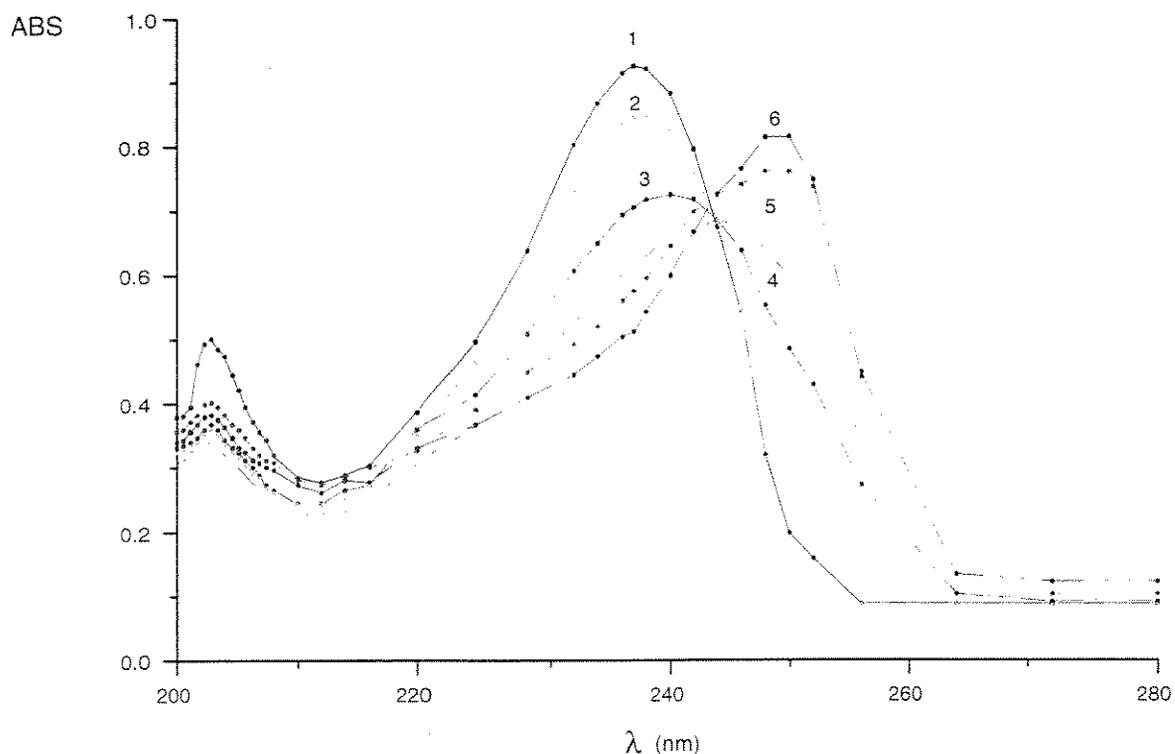


FIGURA 6 - Espéctros de absorção da PAV ( $10\ \mu\text{M}$ ) em diferentes valores de pH: (1) pH=11 (2) pH=7,5 (3) pH=6,5 (4) pH=6 (5) pH=5,5 (6) pH=5. Tampões: acetato na faixa de pH 2-5, fosfato na faixa de pH 6-12. Temperatura  $25^\circ\text{C}$ .

A partir da absorção óptica da PAV em um comprimento de onda escolhido (260 nm), próximo ao comprimento de onda de máxima absorção, de uma das formas da PAV, constrói-se um gráfico em função do pH, como mostrado na figura 3. A partir das absorbâncias obtidas, em cada valor de pH e das absorbâncias das formas protonada e desprotonada da PAV, obtemos o valor de  $\alpha$  como descrito em Métodos (Seção 1.1).

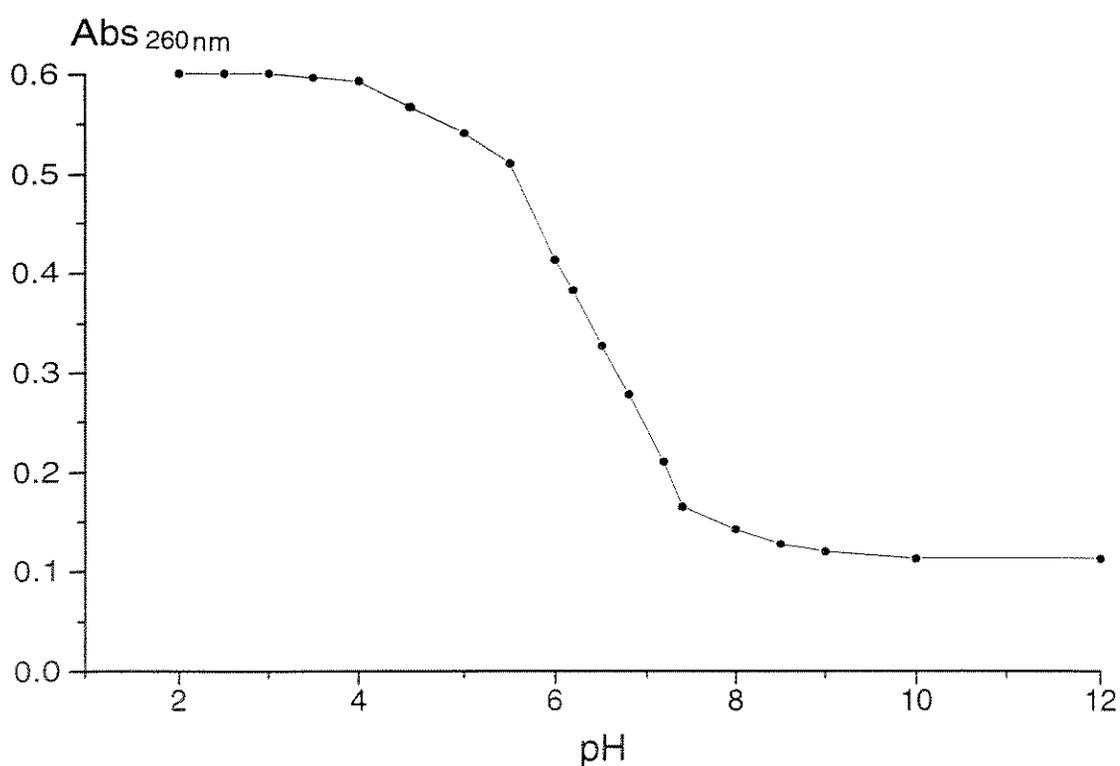


FIGURA 7 - Variação da Absorbância da papaverina (10 $\mu$ M) em 260 nm, em função do pH.

Um gráfico de  $\log(\alpha/1-\alpha)$  em função do pH é uma reta, como mostra a figura 8. O pKa é determinado quando  $\log(\alpha/1-\alpha) = 0$ . Neste ponto a concentração da forma protonada de PAV é igual à

concentração da forma desprotonada. O valor do pKa da PAV obtido a partir desse método foi de 6,4.

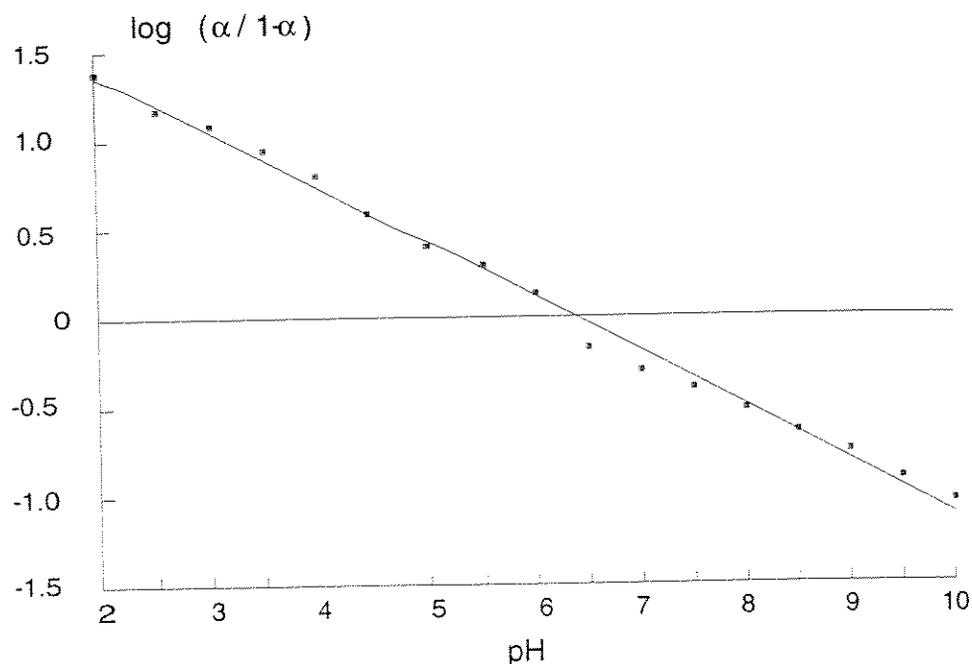


Figura 8 - Determinação do pKa da PAV. Solução de PAV (10  $\mu$ M), em acetato. O valor de  $\alpha$  foi obtido como descrito em Materiais e Métodos. O valor do pKa é determinado no eixo de pH, onde o valor da ordenada é igual a zero.

## 1.2. Determinação do pKa da PAV na presença de agentes surfactantes

A mudança do pKa da PAV foi estudado para dois surfactantes, do tipo aniônico (SDS) e catiônico (CTAC).

Para obter o valor de pKa da PAV em presença dos surfactantes, utilizou-se o mesmo procedimento utilizado para a determinação do pKa da PAV em água (item 1.1, Métodos). Os

surfactantes foram utilizados, em concentrações bem acima da CMC (concentração micelar crítica), a fim de que as determinações fossem feitas somente na presença da forma agregada do detergente. A concentração de PAV foi mantida em  $10\ \mu\text{M}$  a fim de se evitar a auto associação das moléculas de droga.

A figura 9 mostra o deslocamento do pico de absorção máxima da PAV, em função do pH, e na presença de SDS (100 mM) e CTAC (80 mM). Em ambos os casos as concentrações do surfactante encontram-se bem acima da CMC: 8,2 mM e 0,92 mM, respectivamente (Lichtenberg et alii, 1983).

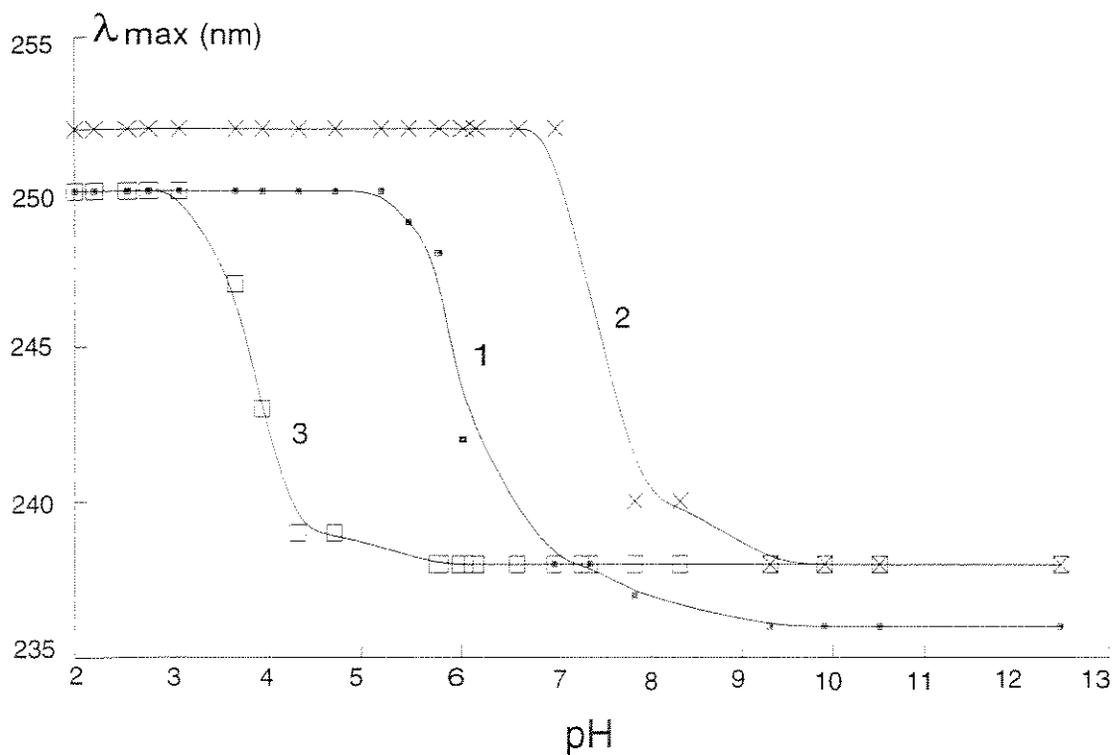


FIGURA 9 - Pico de absorção máxima da PAV ( $10\ \mu\text{M}$ ) na ausência (1) e na presença dos surfactantes SDS, 100 mM (2) e CTAC, 80 mM (3), em função do pH. Temperatura  $25\ ^\circ\text{C}$ .

A figura 10 mostra o gráfico de  $\log(\alpha/1-\alpha)$  em função do pH, na presença de 100 mM de SDS. O valor do pKa foi obtido da mesma forma que para a PAV em água, ou seja no ponto onde a reta cruza o eixo do pH e as concentrações da forma protonada e desprotonada da PAV são iguais. O comprimento de onda utilizado para as medidas de  $\alpha$  foi de 260 nm. O valor de pKa obtido foi de 7,99.

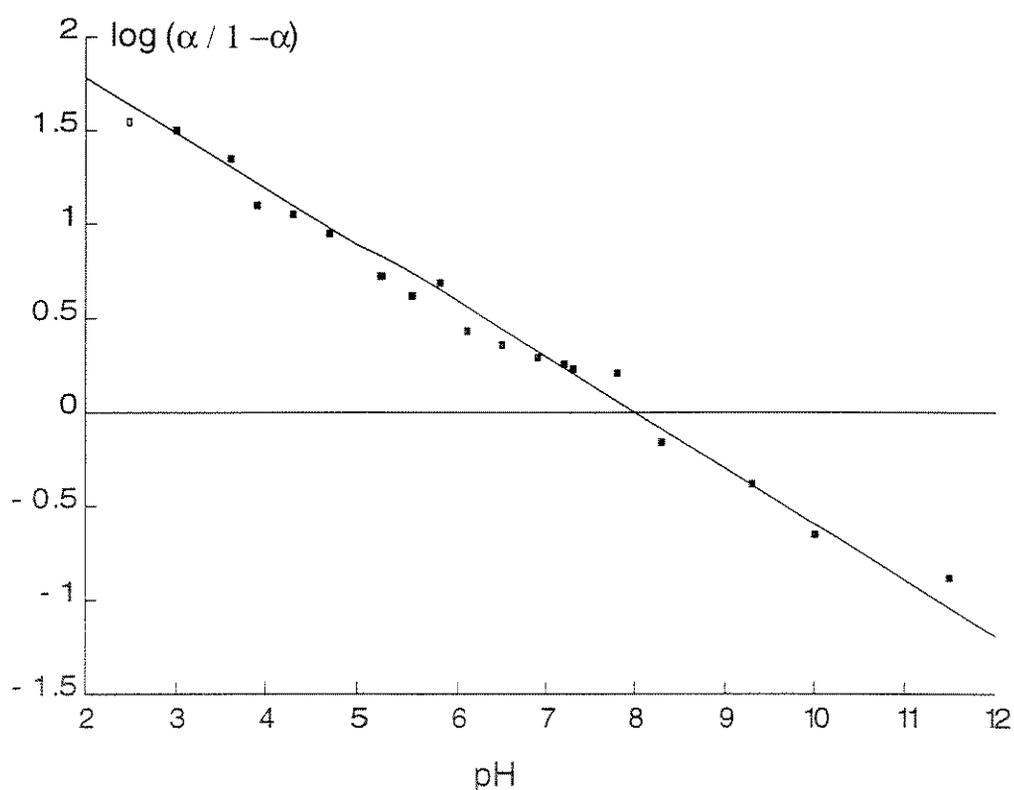


FIGURA 10 - Determinação do pKa da PAV ( $10\mu\text{M}$ ) na presença de SDS (100mM). Temperatura  $25^\circ\text{C}$ .

O mesmo procedimento foi utilizado para calcular o pKa em presença do CTAC. A concentração de detergente utilizada foi de 80 mM. O comprimento de onda escolhido para a determinação de

$\alpha$  foi 230 nm (à esquerda dos picos de máxima absorção da PAV), o que explica a inclinação inversa da reta, em comparação àquelas das figuras 8 e 10. O valor do pKa determinado foi de 4,46.

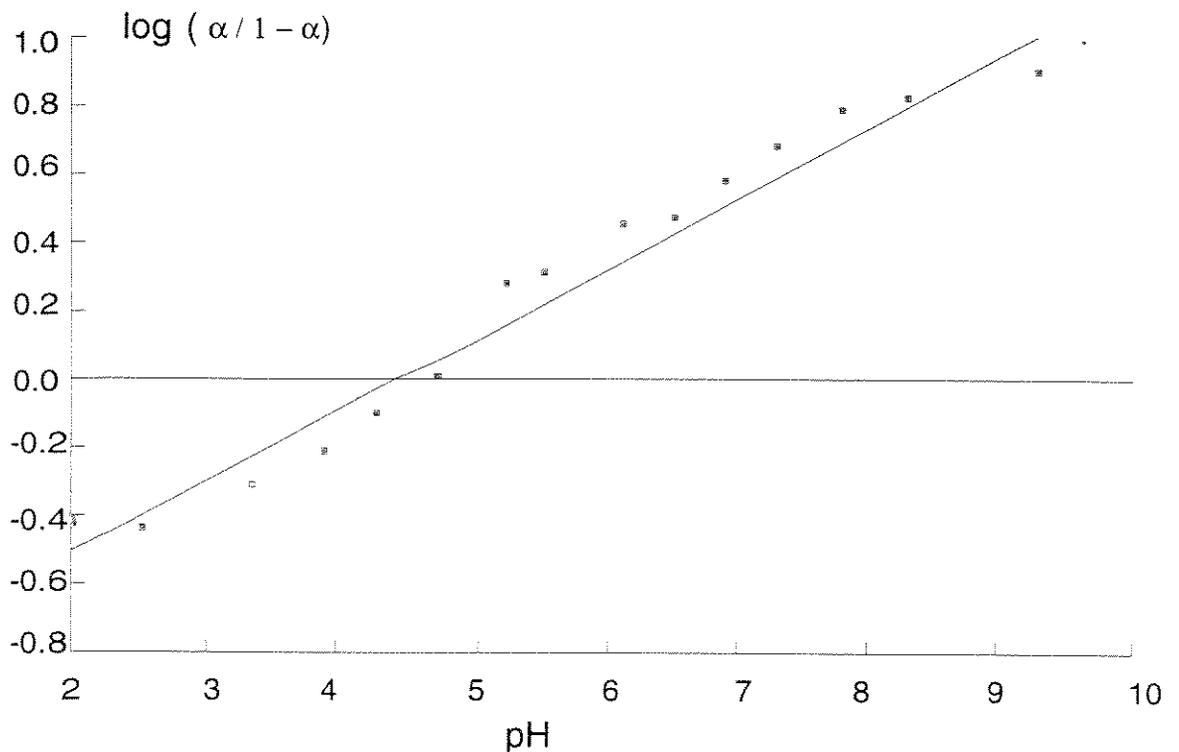


Figura 11 - Determinação do pKa da PAV na presença de 80 mM de CTAC. O valor foi obtido como descrito em Materiais e Métodos.

## 2. FRAGILIDADE OSMÓTICA

As curvas de hemólise de hemácias normais e daquelas depletadas de ATP é mostrada na figura 8. As hemácias submetidas ao estresse oxidativo apresentam uma menor resistência à

hemólise hiposmótica, o que pode ser verificado pelo deslocamento da curva para a direita.

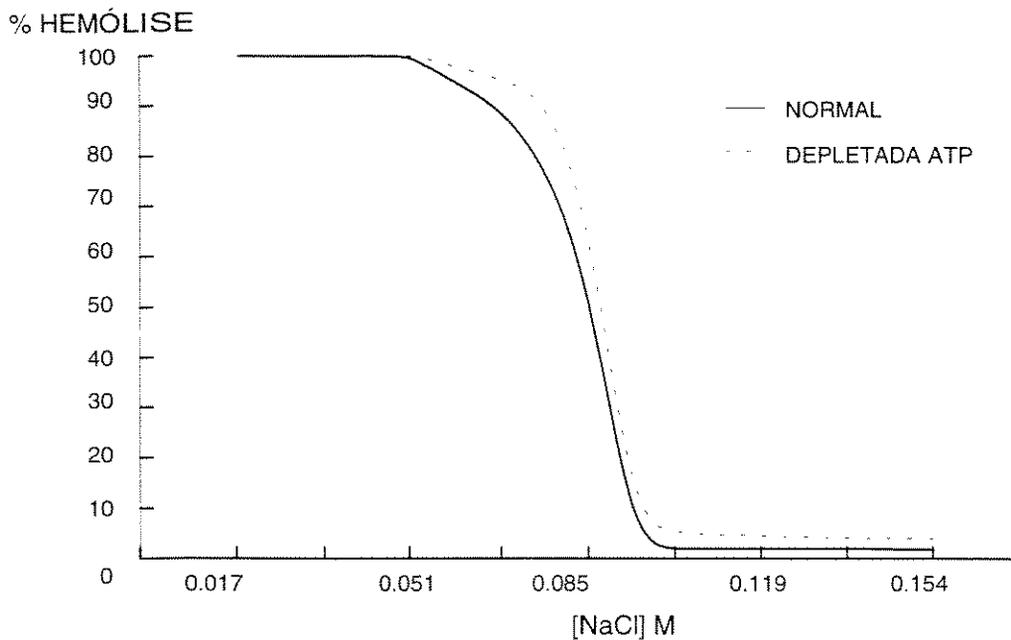


FIGURA 12 - Curva de resistência à hemólise hiposmótica de hemácias de ratos: hemácias normais e depletadas de ATP (com inosina-30 mM e iodoacetamida-5 mM - 37°C/2h). A porcentagem de hemólise é calculada a partir da quantidade de hemoglobina liberada da célula em relação àquela liberada quando os eritrócitos são ressuspensos em água (100%).

### 2.1. Efeito da TFP na hemólise hiposmótica de eritrócitos

A tabela 2, mostra o efeito da TFP na hemólise hiposmótica, tanto de hemácias normais como daquelas submetidas à depleção de ATP ou ao tratamento com iodoacetamida. A iodoacetamida se liga aos grupos SH mais expostos tanto das proteínas da membrana como daquelas que se encontram no citoplasma da célula, como a Hb e a glutatona. As suspensões foram preparadas para hematócrito de 4%, com solução hipotônica de NaCl 0,077M. Para as suspensões de hemácias controle, observamos um efeito

protetor à lise em concentrações de TFP que variam de 20 a 45  $\mu\text{M}$ . Em concentrações maiores (acima de 100  $\mu\text{M}$ ) a TFP induz a lise da hemácia.

As hemácias depletadas de ATP e com os grupos SH bloqueados apresentam uma porcentagem de lise osmótica maior, cerca de 12%, em relação ao controle. O efeito protetor da TFP sobre a lise é observado em hemácias depletadas de ATP e com bloqueio dos grupos SH. Na faixa de concentração de TFP estudada (0 - 100  $\mu\text{M}$ ) as hemácias tratadas apresentam diminuição da lise de cerca de 10%.

TABELA 2

EFEITO DA TFP NA PORCENTAGEM DE HEMÓLISE OSMÓTICA DE SUSPENSÕES DE HEMÁCIAS NORMAIS, DEPLETADAS DE ATP E COM OS GRUPOS SH BLOQUEADAS.

[TFP] $\mu\text{M}^{\text{a}}$	NORMAL <sup>b</sup>	SH BLOQUEADOS <sup>c</sup>	DEPLETADAS DE ATP <sup>d</sup>
0	56,00	68,50	66,75
20-30	44,67	63,97	60,71
35-45	31,56	63,16	61,43
50-80	48,95	59,62	59,31
85-95	54,11	- <sup>e</sup>	- <sup>e</sup>
100	56,50	58,00	58,00

<sup>a</sup> Diferentes concentrações de TFP a que as suspensões de hemácias foram tratadas 37°C/1h. Hematócrito 4%, em NaCl 0,077M.

<sup>b</sup> Suspensões de hemácias normais

<sup>c</sup> Suspensões de hemácias tratadas com iodoacetamida (5 mM-37°C- 2h).

<sup>d</sup> Suspensões de hemácias submetidas à depleção de ATP com inosina e iodoacetamida (30 mM e 5 mM, respectivamente, 37°C- 2h).

<sup>e</sup> Valores não determinados.

### 3. PEROXIDAÇÃO

A figura 13 apresenta a curva padrão que foi utilizada para determinação das concentrações de TBARS nas amostras de eritrócitos. Nesse gráfico mede-se a concentração de malondialdeído formado a partir da reação do tetraetoxipropano com o ácido tiobarbitúrico (Ítem 4.2, Métodos). O tetraetoxipropano se converte linearmente em malondialdeído (0,2 - 20  $\mu\text{M}$ ) (Yagi, 1976; Ohkana et alii, 1979)

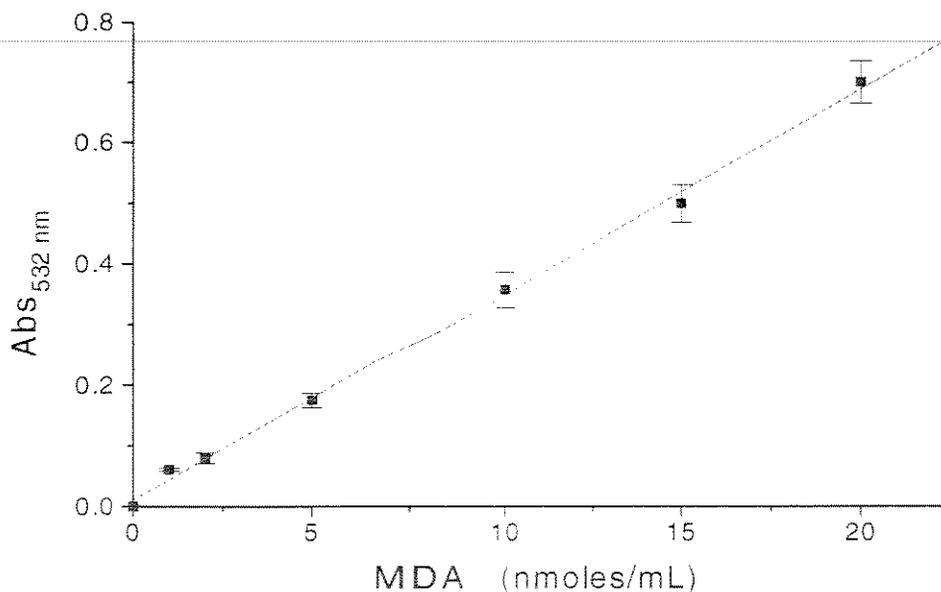


FIGURA 13 - Curva padrão de produção de malondialdeído, a partir do tetraetoxipropano.

A concentração de TBARS foi determinada segundo a curva padrão acima. O coeficiente de extinção molar a 532 nm é igual a  $1,56 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Esses valores são apresentados na figura 10.

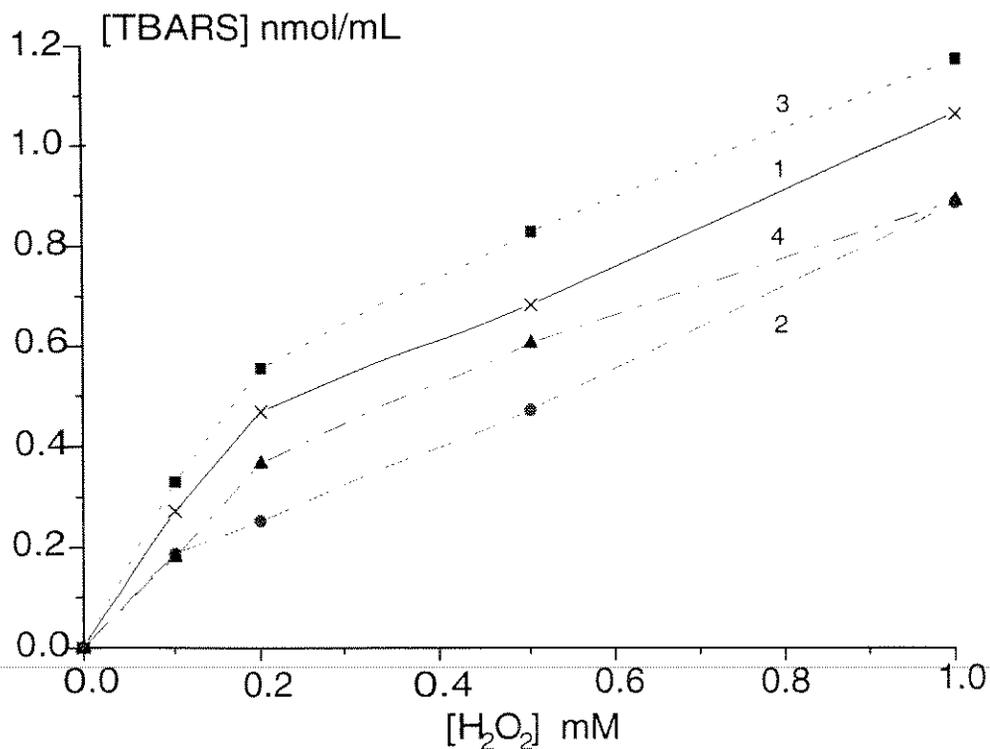


Figura 14. Ação da TFP sobre a peroxidação lipídica das suspensões de eritrócitos tratadas com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. As suspensões de eritrócitos foram tratadas com TFP, por 1h a 37°C e depois submetidas à ação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: (1) Controle, (2) 20 μM TFP, (3) 40 μM TFP e (4) 100 μM TFP.

Utilizando uma metodologia diferente, daquela descrita anteriormente (item 4.2, Métodos), na qual as amostras não permaneciam por 2 horas no gelo, com TCA e sem a extração dos produtos com butanol, obtivemos valores de concentração de TBARS mais elevados, como mostra a tabela 3. Nessa tabela mostramos a peroxidação lipídica provocada por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em hemácias normais (frescas e após uma semana de estocagem) e depletadas de ATP (frescas e estocadas). Os valores obtidos de TBARS para as hemácias frescas e estocadas, não diferem muito.

TABELA 3.  
 CONCENTRAÇÃO DE TBARS EM SUSPENSÕES DE ERITRÓCITOS  
 SUBMETIDAS À AÇÃO DE H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

[H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ]mM	[TBARS] nmoles/mL de suspensão de células			
	NORMAIS <sup>a</sup>		DEPLETADAS DE ATP <sup>b</sup>	
	SANGUE FRESCO	SANGUE ESTOCADO <sup>c</sup>	SANGUE FRESCO	SANGUE ESTOCADO
0,0	0,45±0,06	0,55±0,04	0,42±0,07	0,43±0,06
1,0	2,08±0,19	2,28±0,15	2,22±0,34	2,11±0,27
2,0	2,74±0,27	2,35±0,23	2,41±0,34	2,36±0,35
5,0	2,98±0,38	2,61±0,23	2,73±0,48	2,68±0,38
10,0	3,15±0,68	3,00±0,36	3,46±0,67	3,21±0,51

Valores de peroxidação lipídica por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (37°C,1h). A concentração de TBARS a 535 nm, utilizando o  $\epsilon$  (coeficiente de extinção molar) de  $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Os valores são a média de 5 determinações.

<sup>a</sup> Eritrócitos recém colhidos, controle.

<sup>b</sup> Eritrócitos submetidos à depleção de ATP com Inosina (30 mM) e IAA (5 mM).

<sup>c</sup> Eritrócitos estocados por 7 dias a 4°C.

#### 4. OXIDAÇÃO DA HEMOGLOBINA.

Tanto a reação da oxihemoglobina (oxiHb, FeII) como da metahemoglobina (MetaHb, FeIII) com agentes oxidantes como o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), podem ser seguidas espectrofotometricamente, quer em soluções da proteína purificada quer em células vermelhas intactas. A figura (15) apresenta o espectro de absorção das espécies: oxiHb, metaHb e ferrilHb, entre 500 e 700 nm. O espectro da ferrilHb apresenta características espectrais que permitem o seu reconhecimento: ausência de pico a 630 nm (característico da metaHb), um pico na região de 550 nm e um ombro na região de 570-580 nm (Winterbourn, 1990). As formas oxiHb e metaHb podem ser identificadas por seus picos característicos: 541 e 576 para oxiHb e 630 para a forma metaHb (Riggs, 1981).

As concentrações relativas dessas espécies foram calculadas a partir das equações apresentadas em Materiais e Métodos (item 4.3, Métodos), e são apresentadas na figura 16. A diminuição na fração de metaHb, por ação do  $H_2O_2$  é acompanhada pelo aparecimento de concentrações maiores de ferrilHb.

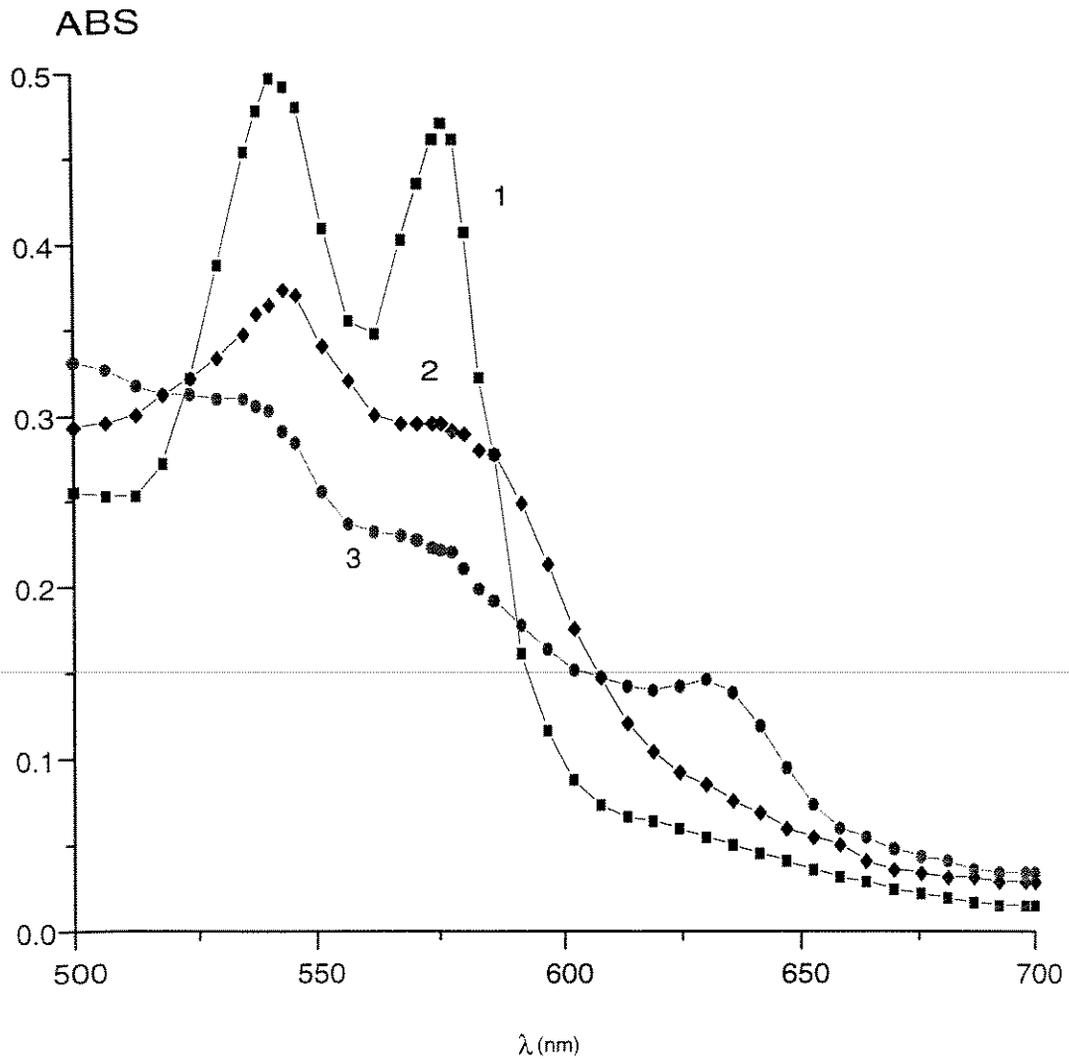


Figura 15 -Espéctro de absorção das espécies de Hb: (1) OxiHb, (2) FerrilHb e (3) MetaHb, entre 500 e 700 nm. Temperatura 25 °C, fosfato, pH 5,0.

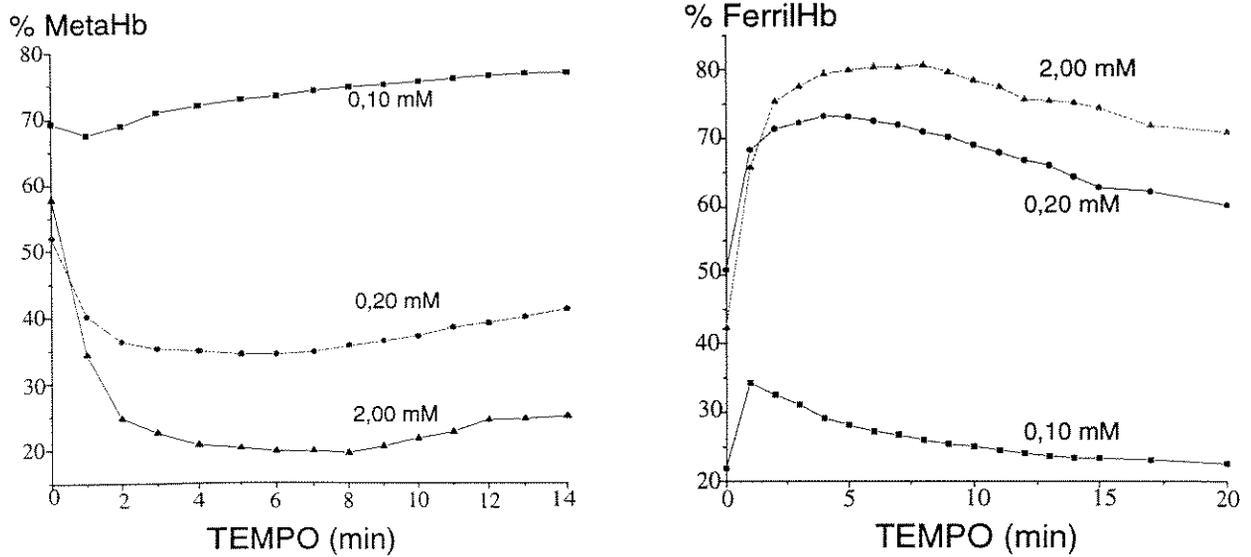


Fig. 16 - Valores percentuais relativos de metaHb e ferrilHb em solução de metaHb purificada ( $10\mu\text{M}$ ) tratada com  $\text{H}_2\text{O}_2$ , nas concentrações indicadas na figura, fosfato  $0,1\text{M}$ , pH 5. Temperatura  $25^\circ\text{C}$ .

Foram também determinadas as concentrações relativas das espécies de Hb para soluções de oxiHb humana, purificadas, conforme descrito em Métodos (item 2.3-Métodos). Os resultados são apresentados na figura 17.

Observa-se, pela ação de  $\text{H}_2\text{O}_2$  diminuição brusca da fração oxigenada de Hb acompanhada pelo aumento da formação de ferrilHb e, mais tardiamente, metaHb. Cerca de 30% da ferrilHb inicialmente formada passa para a forma de metaHb em 30 minutos.

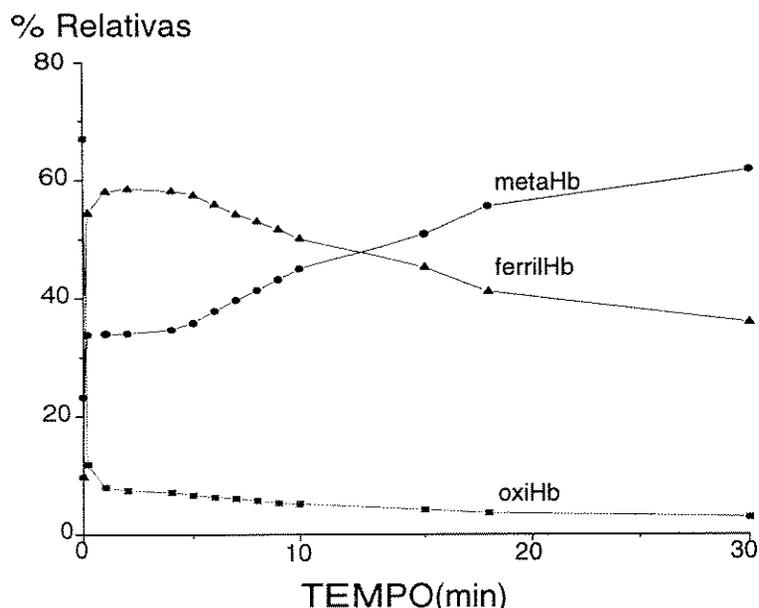


Fig. 17 - Valores percentuais de metaHb e ferrilHb formadas em solução de oxiHb humana purificada ( $10 \mu\text{M}$ ) submetida à ação de  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $0,20 \text{ mM}$ ). Fosfato  $0,1 \text{ M}$ , pH 5, temperatura  $25^\circ\text{C}$ .

#### 4.1. Ação da TFP na formação de ferrilHb

Quando a solução de metaHb foi tratada com trifluoperazina (na concentração de  $100 \mu\text{M}$ ), as quantidades relativas de ferrilHb formadas foram menores que as da figura 16, indicando um efeito protetor desta droga na oxidação da hemoglobina pelo peróxido de hidrogênio. Esses resultados são apresentados na figura 18, em que as soluções de metaHb foram tratadas com a droga antes da ação do  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Pode-se observar que a concentração de ferrilHb formada diminui na presença de TFP, principalmente no início da reação. Em oposição, a percentagem de metaHb decai menos do que na ausência de TFP, principalmente nos primeiros 5 minutos de incubação com  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

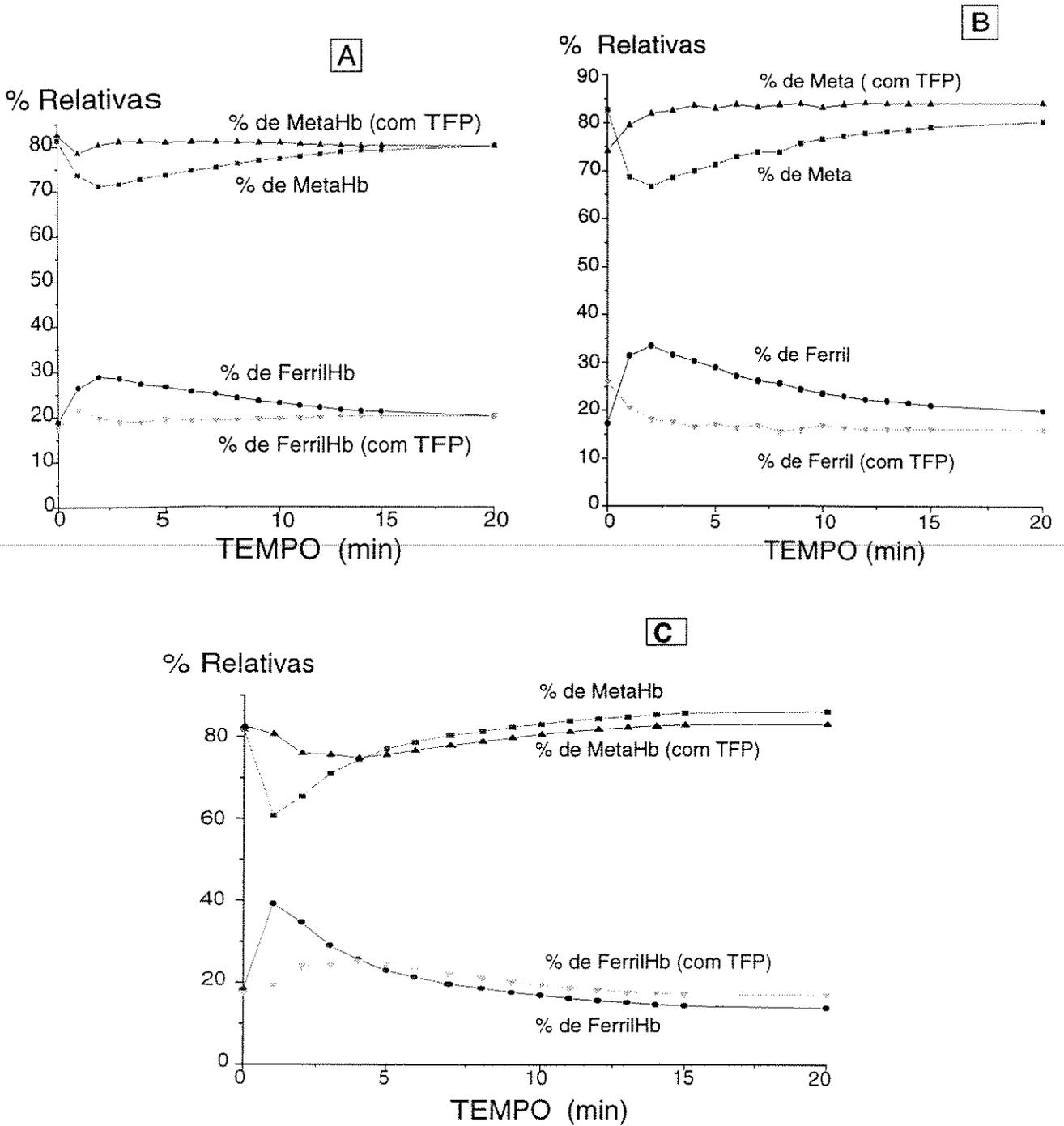


Fig. 18 - Ação da TFP sobre a formação de ferrilHb em soluções de metaHb (10  $\mu$ M). Às soluções de metaHb, foi adicionada TFP (100  $\mu$ M) e em seguida o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nas concentrações: (A) 0,10 mM, (B) 0,20 mM e (C) 2,00 mM. Fosfato 0,1M, pH 5 e temperatura 25 °C.

O efeito da TFP é mais pronunciado sobre a oxiHb, como pode-se observar na figura 19. As concentrações de ferril e metaHb produzidas pela ação do peróxido de hidrogênio são menores quando a solução de oxiHb purificada é tratada com 100  $\mu$ M de TFP antes da ação do  $H_2O_2$  (0,20 mM).

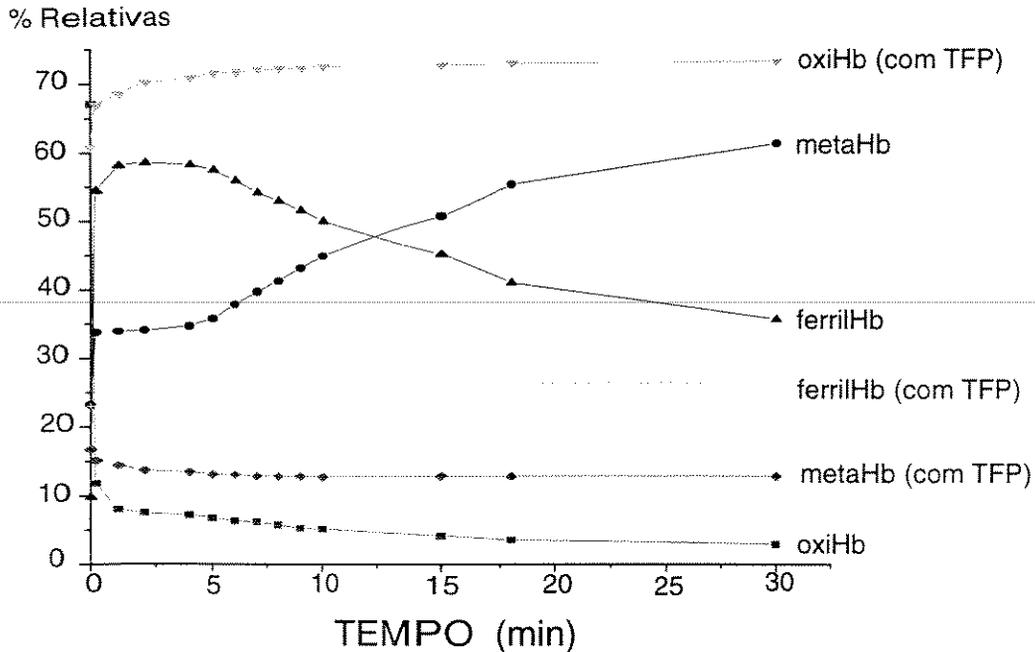


Fig. 19 - Ação da TFP na cinética de formação das espécies de hemoglobina produzidas pelo  $H_2O_2$  (0,2 mM) sobre uma solução de oxiHb (10  $\mu$ M), mesmas condições idênticas às das figuras anteriores.

#### 4.2. Ação de papaverina na formação de ferrilHb

A Papaverina não mostrou efeito significativo sobre a produção de ferrilHb, quando incubada em soluções de metaHb. A figura 16 apresenta as concentrações de metaHb e de ferril Hb, na presença de 100  $\mu$ M de PAV, para soluções tratadas com 0,10, 0,20 e 2,00 mM de  $H_2O_2$ . Podemos observar, comparando com a

figura 13, que a PAV não apresenta efeito protetor à Hb submetida à ação de  $H_2O_2$ . Não se observa percentagem menor de ferrilHb nas preparações de metaHb tratadas com PAV (0,10 mM), na concentração de peróxido de 0,10 mM, a PAV provoca um aumento da quantidade relativa de ferrilHb, com conseqüente percentagem menor de metaHb (Figura 20).

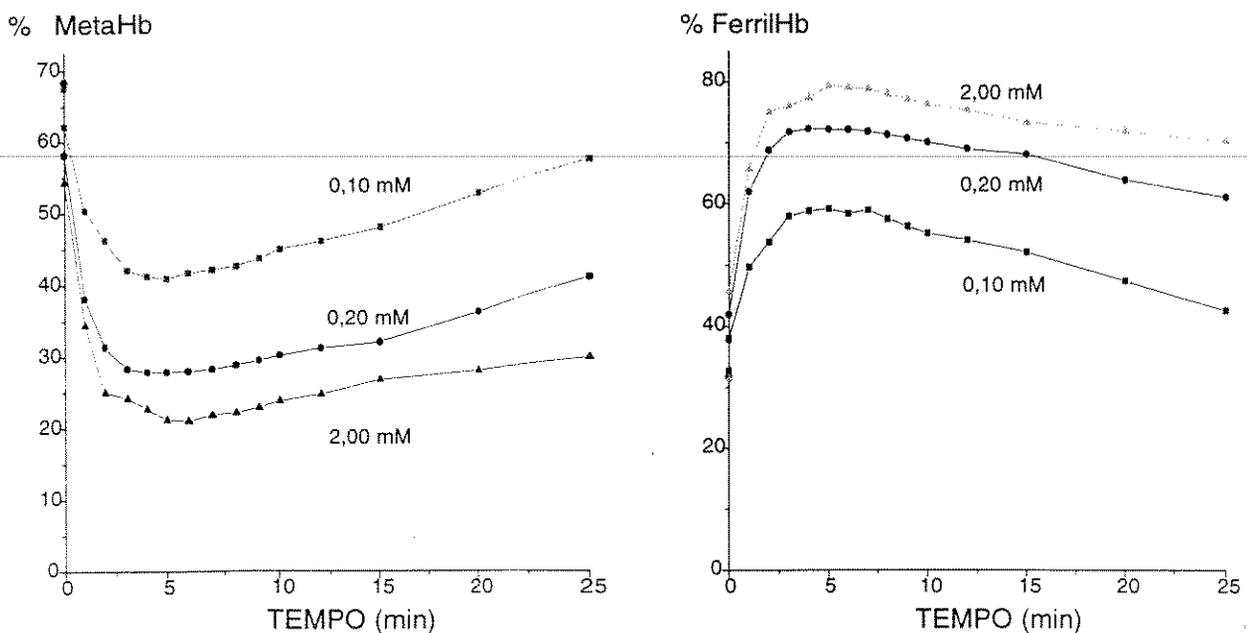


Fig.20 - Efeito da PAV (0,10 mM) na cinética de formação de ferrilHb, para soluções de metaHb, na presença de  $H_2O_2$ . (concentrações indicadas nos gráficos). Condições idênticas anteriores às das figuras anteriores.

#### 4.3. Medidas na banda de Soret

Outra maneira de acompanhar a oxidação da Hb é feita determinando-se a absorção da hemeproteína na banda de Soret,

isto é, entre 403 e 415 nm. A absorvância a 405 nm é diminuída após a reação da metaHb com  $H_2O_2$ . A diminuição na banda de Soret, devido à destruição do grupo heme, é mais acentuada para concentrações maiores de peróxido, como mostra a figura 21. A Trifluoperazina previne parcialmente a destruição do grupo heme como mostram a figura 21 e a Tabela 4. Os valores de absorvância (percentuais) são relativos à absorvância inicial (sem  $H_2O_2$ ).

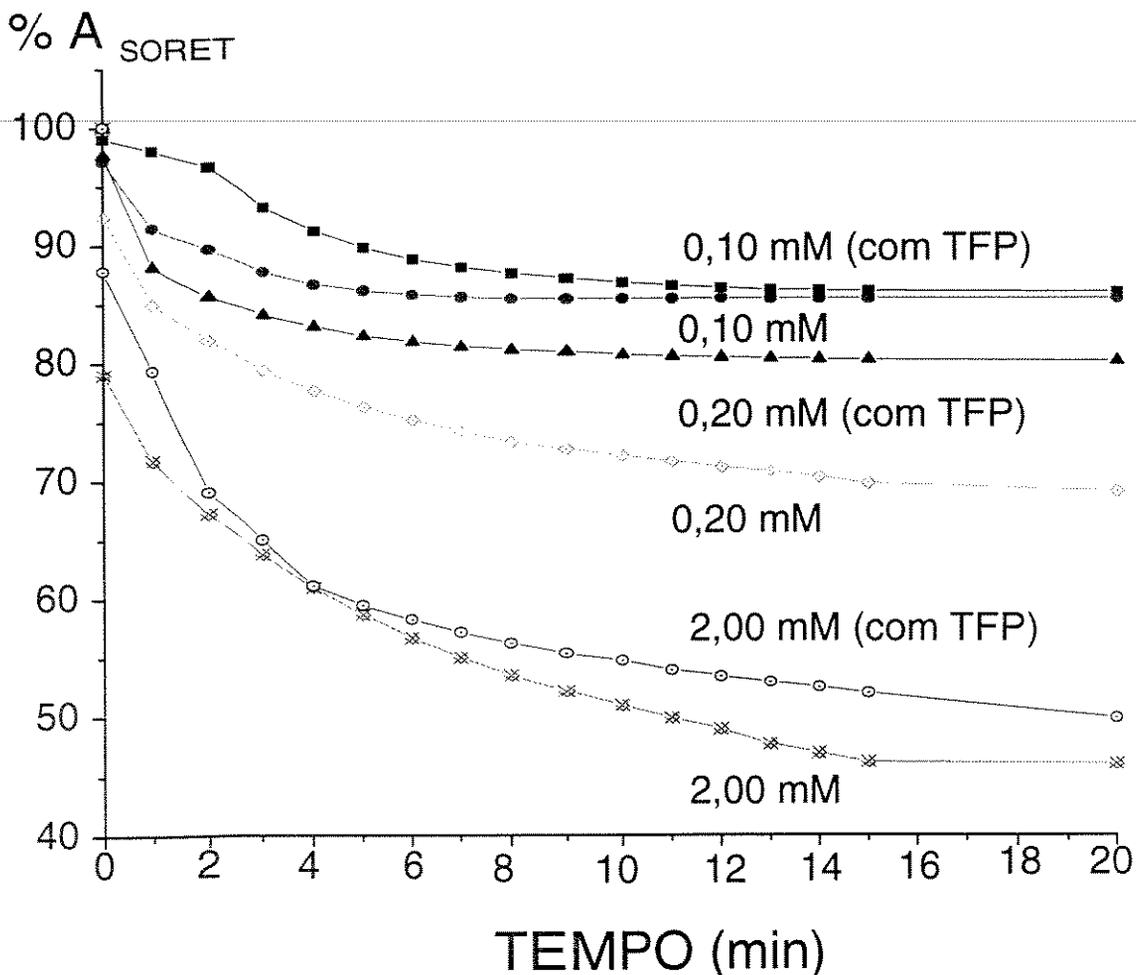


Fig.21 - Decaimento da Absorvância da banda de Soret, de soluções de metaHb por ação de  $H_2O_2$ , nas concentrações indicadas, na presença e na ausência de TFP (0,10 mM).

TABELA 4

DECAIMENTO DA ABSORÇÃO DA BANDA DE SORLET DE METAHb,  
POR AÇÃO DE H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> NA AUSÊNCIA E NA PRESENÇA DE TFP.

TEMPO (min)	CONTROLE <sup>a</sup>			TFP 0,10 mM <sup>b</sup>		
	0,10 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0,20 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	2,00mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0,10 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0,20 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	2,00 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
1	95,4±0,2	92.6±0.5	78.4±0.9	96.3±2.1	95.2±1.8	89.2±1.2
2	92.5±2.3	87.6±1.5	72.4±0.9	93.9±3.1	86.4±1.9	80.7±1.1
3	90.8±2.5	84.6±1.6	64.5±0.8	92.6±2.1	82.3±1.6	69.6±1.1
4	89.7±2.3	82.6±1.1	61.4±1.2	91.8±1.2	79.6±1.5	64.7±0.8
5	89.0±2.2	81.3±0.6	59.1±1.1	91.2±0.6	79.3±1.4	62.1±0.6
6	88.6±2.3	80.2±0.3	57.9±0.9	90.8±0.4	79.1±1.3	60.5±0.6
7	88.4±2.2	79.5±0.6	56.1±0.8	90.6±0.3	78.4±0.3	59.2±0.8
8	88.3±2.1	78.8±1.0	54.8±0.2	90.3±0.6	77.9±0.5	58.1±0.8
9	88.2±2.1	78.4±1.4	53.7±0.3	90.2±0.9	77.3±1.2	57.1±1.0
10	88.1±2.1	77.9±1.7	52.7±0.8	90.1±1.1	76.8±1.8	56.3±1.1
11	86.3±1.4	77.3±1.4	51.7±1.1	89.9±1.3	76.7±1.9	55.6±1.1
12	86.2±1.4	77.1±1.7	50.7±1.3	89.9±1.4	76.7±1.9	54.8±1.1
13	86.2±1.3	76.9±1.9	49.4±1.2	89.8±1.5	76.7±1.8	54.2±1.1
14	86.2±1.3	76.5±1.8	48.6±1.4	89.8±1.5	76.9±1.9	53.7±1.2
15	86.2±1.3	76.1±1.5	47.9±1.4	89.6±1.4	77.1±1.9	53.3±1.2
20	86.2±1.1	75.6±1.8	43.5±1.3	89.4±1.2	77.2±1.9	50.7±1.1

<sup>a</sup> Soluções controle, sem droga.

<sup>b</sup> Soluções tratadas com 0,10 mM de TFP, antes da adição de peróxido.

As concentrações de peróxido utilizadas foram: 0,10, 0,20 e 2,00 mM. As Valores percentuais em relação à absorbância inicial (tempo zero, logo após a adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

Os valores representam a média de no mínimo 5 determinações e são significativos para  $\alpha_T < 0,05$  (teste t-Student).

No mesmo teste, feito com soluções de oxiHb não se observou diferença na absorção da Hb para a concentração de 0,10 mM de  $H_2O_2$ ; mas em concentrações maiores de peróxido, a TFP apresenta um efeito protetor com relação a destruição do grupo heme, como observado para a metaHb. Esses resultados são apresentados na Figura 22 e tabela 5, para 0,2 mM de  $H_2O_2$ . Para a concentração de 2,00 mM de peróxido o efeito protetor é bem menor, como pode ser verificado na figura 23.

Com a PAV não obtivemos efeito protetor sobre a destruição do grupo heme, causado pelo  $H_2O_2$ , em nenhuma das concentrações de peróxido utilizadas.

% PERDA  $A_{SORET}$

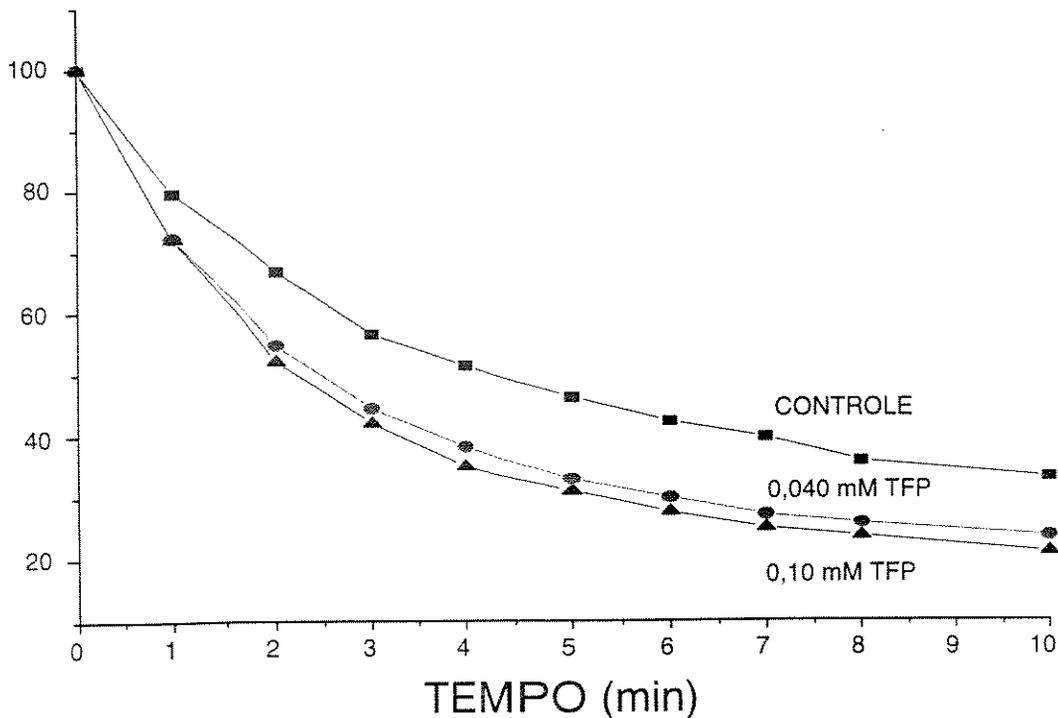


Figura 22 - Efeito protetor da TFP sobre a destruição do grupo heme pelo  $H_2O_2$  (0,20 mM), em soluções de oxiHb. Condições idênticas às das figuras anteriores.

TABELA 5

DECAIMENTO DA ABSORÇÃO DA BANDA DE SORET, EM SOLUÇÕES DE OXIHB.

TEMPO (MIN)	CONTROLE <sup>a</sup>	0,10 mM TFP <sup>b</sup>
1	86,9±1.9	98.8±1.3
2	84.8±0.9	95.6±1.1
3	79.7±2.2	93.8±1.6
4	78.1±2.1	91.7±0.9
5	76.8±2.1	91.1±1.1
6	74.1±1.5	90.4±1.6
7	73.0±1.1	89.3±0.9
8	72.3±1.1	88.9±0.9
9	71.7±1.2	88.5±1.2
10	71.1±1.5	88.1±1.3
15	69.0±1.2	86.3±1.1
20	66.9±1.1	85.3±1.9

<sup>a</sup> Soluções de oxiHb controle

<sup>b</sup> Soluções de oxiHb tratadas com TFP (0,10 mM), antes de serem submetidas à ação com  $H_2O_2$  (0,20 mM).

Condições idênticas às da tabela 4.

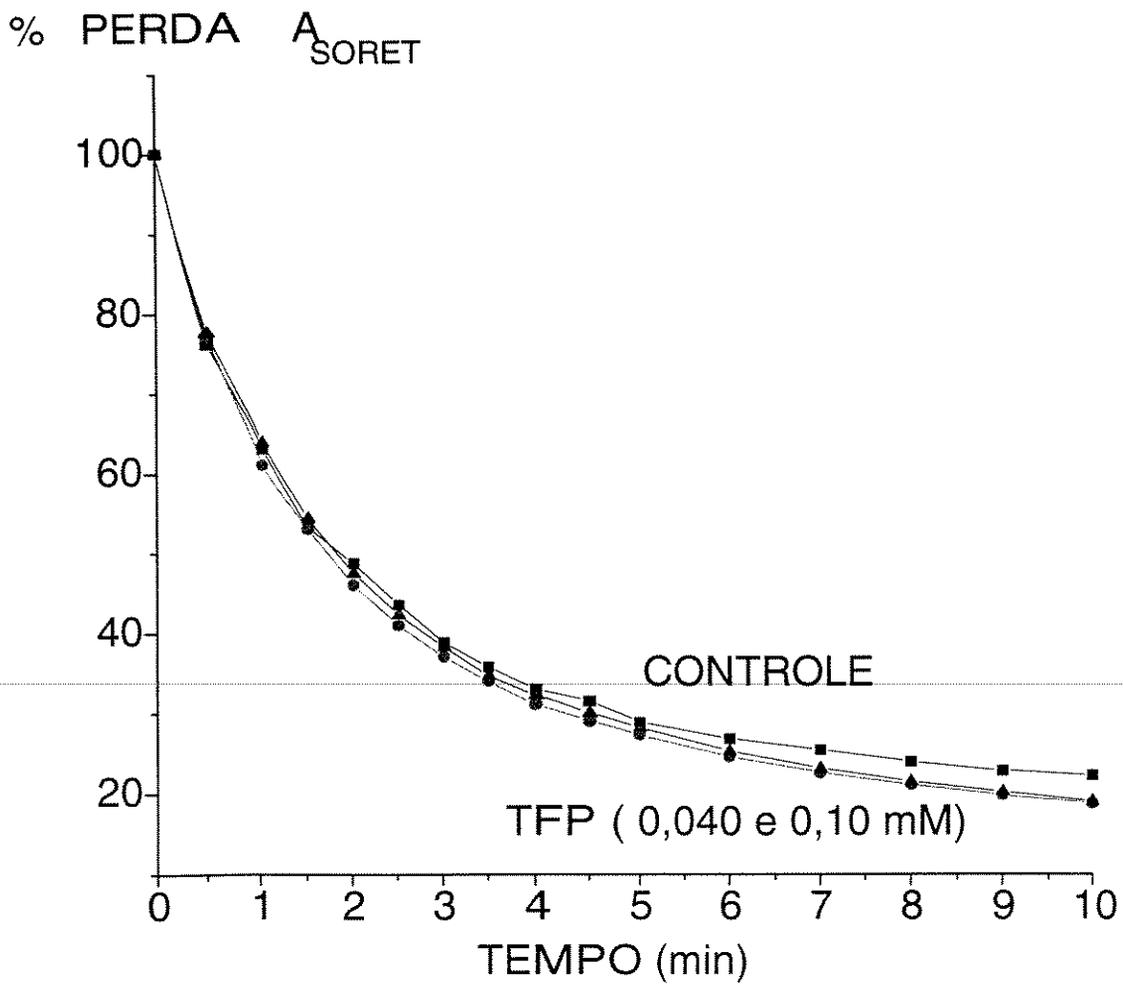


Fig.23 - Efeito protetor da TFP sobre a destruição do grupo heme pela  $\text{H}_2\text{O}_2$  (2,00 mM), em soluções de oxiHb. Condições idênticas às das figuras anteriores.

## 5. FLUORESCÊNCIA

Quando uma suspensão de ghosts é excitada, em 295 nm, obtém-se o espectro de fluorescência do triptofano, presente nas proteínas da membrana. Ao se adicionar concentrações crescentes de ANS à essa suspensão observa-se uma diminuição da intensidade de fluorescência (I) do triptofano supressão, causada pela transferência de energia do aminoácido para o fluoróforo adicionado.

A figura 24 mostra a emissão de fluorescência de uma suspensão de ghosts, com concentração de proteína de 150 µg/mL (PBS, pH 7,4) quando excitada em 295 nm, na ausência e na presença de diferentes concentrações de ANS. Na ausência de ANS observa-se uma banda de emissão de fluorescência bem definida na região de 350 nm, à medida que quantidades crescentes de ANS vão sendo adicionadas verifica-se uma diminuição na intensidade desta banda pela supressão, e o aparecimento de um segundo pico, na região de 460 nm, (referente ao ANS ligado).

Para verificar o efeito da TFP na estrutura das membranas eritrocitárias, as suspensões de ghosts foram tratadas com diferentes concentrações da droga (a 37°C por 1h), lavadas e novamente ressuspensas com PBS, para o mesmo volume inicial. Registrou-se, então os espectros de fluorescência dessas suspensões. A figura 25 mostra um espectro de fluorescência dessas suspensões de ghosts tratadas com TFP. Todas as

amostras foram excitadas a 295 nm e os espectros registrados de 305 a 580 nm, à temperatura ambiente.

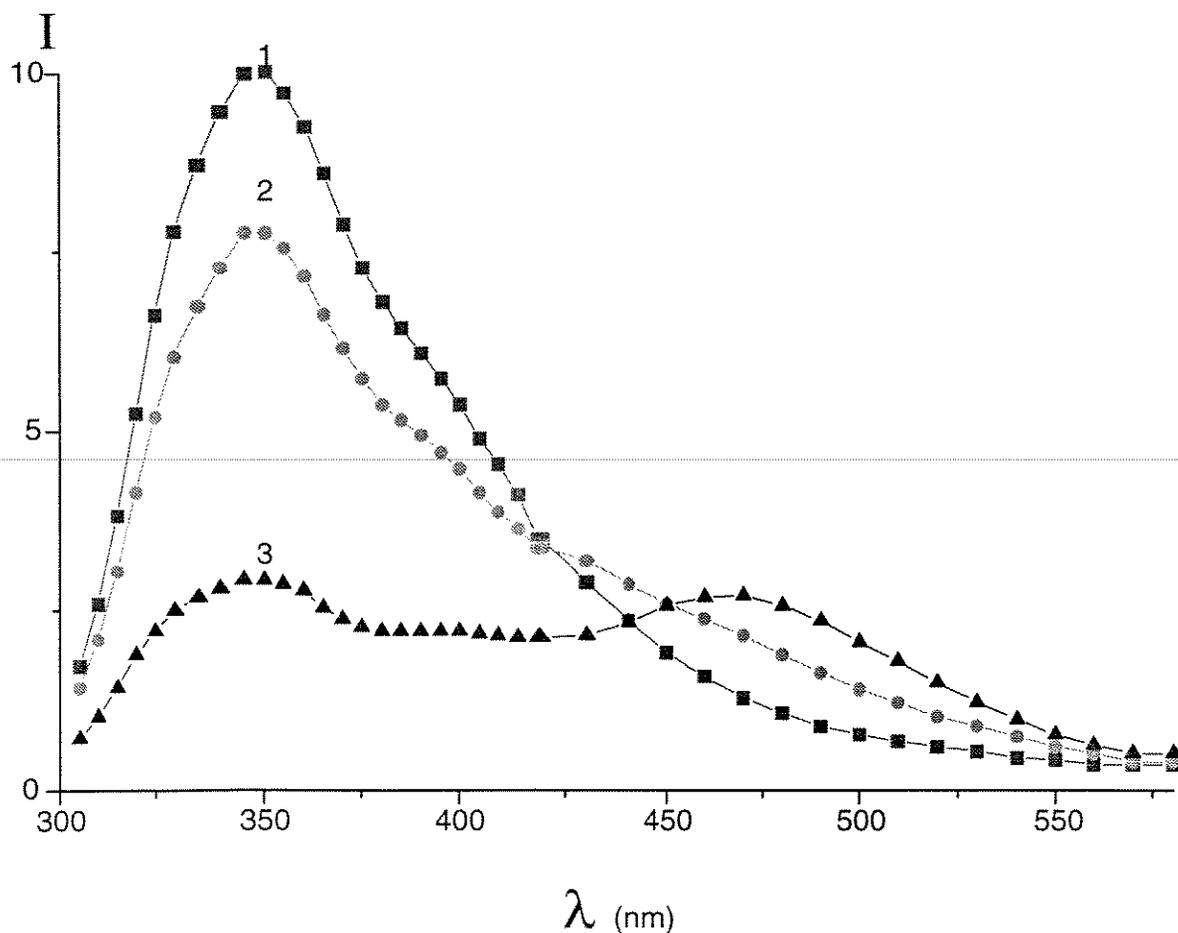


Figura 24 - (1): Espectro de fluorescência de uma suspensão de ghosts (150 µg proteína/mL) em PBS (pH 7,4), e na presença de (2) 20 µM de ANS e (3) 50 µM de ANS. Excitação: 295 nm. Emissão: 305 - 580, fendas de 2,5 nm, 23°C.

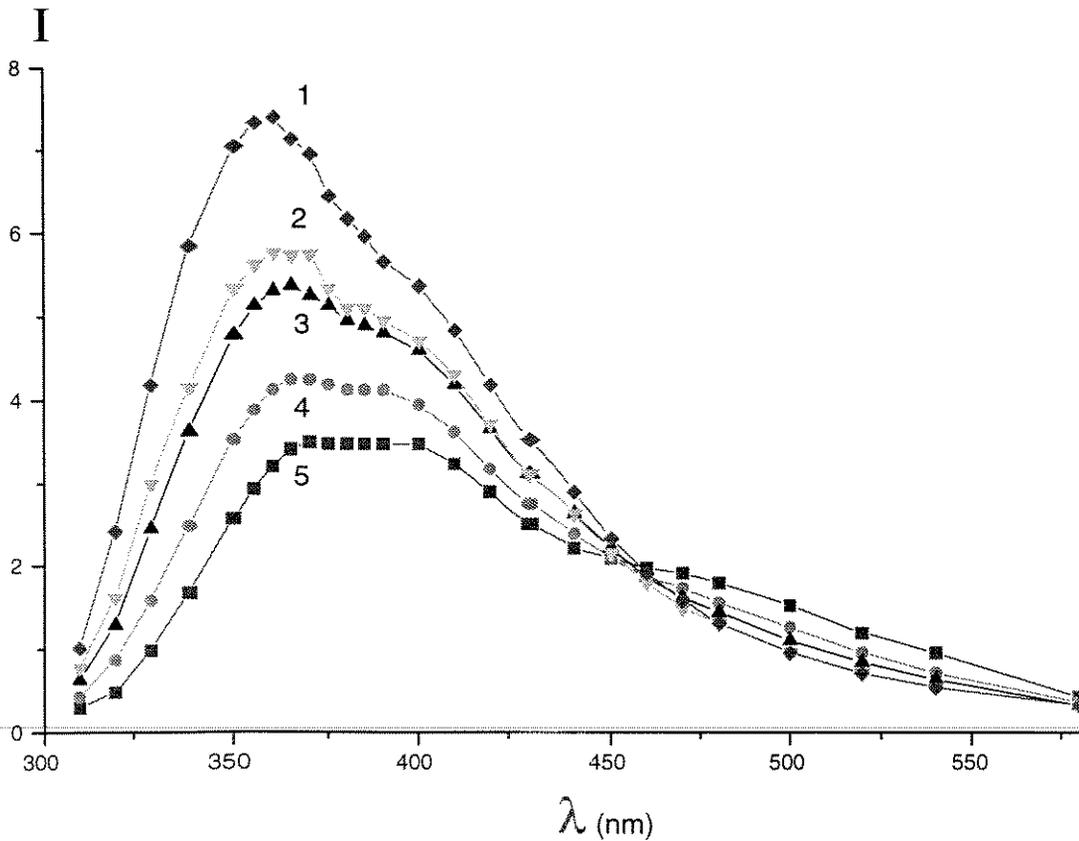


Figura 25 - Fluorescência de suspensões de ghosts em PBS (pH 7,4), tratadas com TFP por 1h a 37°C. Após a incubação as amostras foram lavadas e novamente ressuspensas em PBS. Excitação a 295 nm. (1) Controle, sem tratamento com TFP; (2) 20  $\mu\text{M}$  de TFP; (3) 40  $\mu\text{M}$  TFP; (4) 100  $\mu\text{M}$  TFP e (5) 200  $\mu\text{M}$  TFP. Todos os espectros foram registrados à temperatura ambiente e na ausência de ANS.

O efeito da TFP na fluorescência do triptofano envolve supressão e deslocamento do comprimento de onda de emissão máximo. O espectro de emissão do triptofano é muito sensível à polaridade do meio, bem como às interações específicas entre o solvente e o anel indol (Lacowitz, 1983). Isso significa que qualquer fator que afete a exposição dos resíduos de triptofano à fase aquosa, causará um deslocamento da banda de emissão máxima de fluorescência, dos resíduos de triptofano. À medida que a concentração de TFP aumenta, verifica-se uma diminuição na

intensidade de fluorescência dos resíduos de triptofano, bem como um deslocamento do pico de máxima intensidade de fluorescência (360 nm) para comprimentos de onda maiores (384 nm), indicando uma exposição dos resíduos de triptofano a regiões mais hidrofílicas na membrana eritrocitária.

Quando observamos a fluorescência do ANS em ghosts, verificamos um efeito inverso, ou seja, um aumento da banda de fluorescência da sonda, na região de 470 nm em membranas tratadas com TFP, como mostra a figura 26. Esse aumento na fluorescência do ANS indica que: 1) a TFP não se insere na membrana em região próxima a do ANS (não há supressão de fluorescência do ANS pela TFP) e 2) alterações na fluidez da membrana justificaria o aumento da fluorescência do ANS.

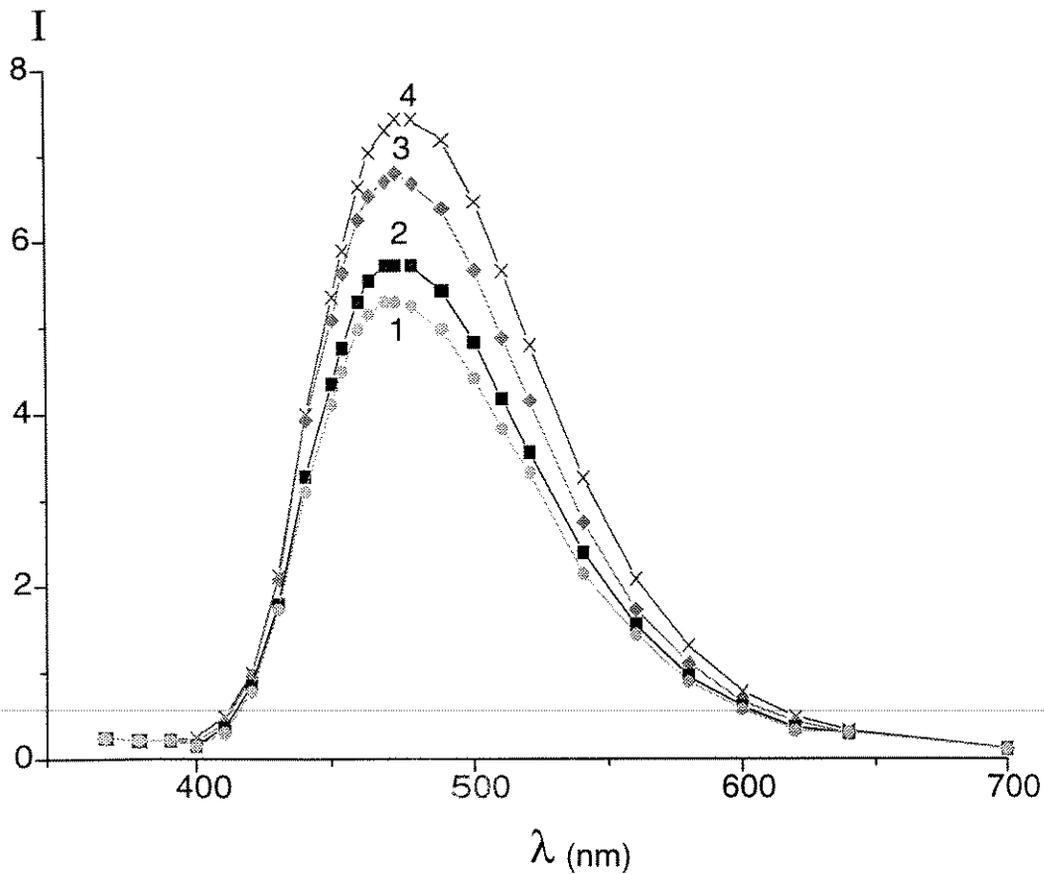


Fig.26 - Espectro de fluorescência de ANS ( $60 \mu\text{M}$ ) em ghosts (1); na presença de TFP:  $20 \mu\text{M}$  (2);  $40 \mu\text{M}$  (3);  $100 \mu\text{M}$  (4). Comprimento de onda de excitação  $360 \text{ nm}$ , demais condições como na figura 24.

O tratamento com Papaverina, não apresentou diferenças significativas, em relação às suspensões de ghosts controle, tanto para a fluorescência do triptofano, como para a fluorescência do ANS (figura 27 A e 27 B). Nas suspensões de ghosts tratadas com PAV não há deslocamento da banda de máxima emissão do triptofano. Nem supressão significativa da fluorescência do aminoácido ou do ANS. Pelo contrário, a fluorescência do triptofano é ligeiramente aumentada na presença de PAV, indicando que esses resíduos de aminoácido experimentam regiões de menor polaridade na membrana.

Esses resultados sugerem que a interação da PAV com a membrana do eritrócito é mais fraca que a da TFP (causa alterações menores).

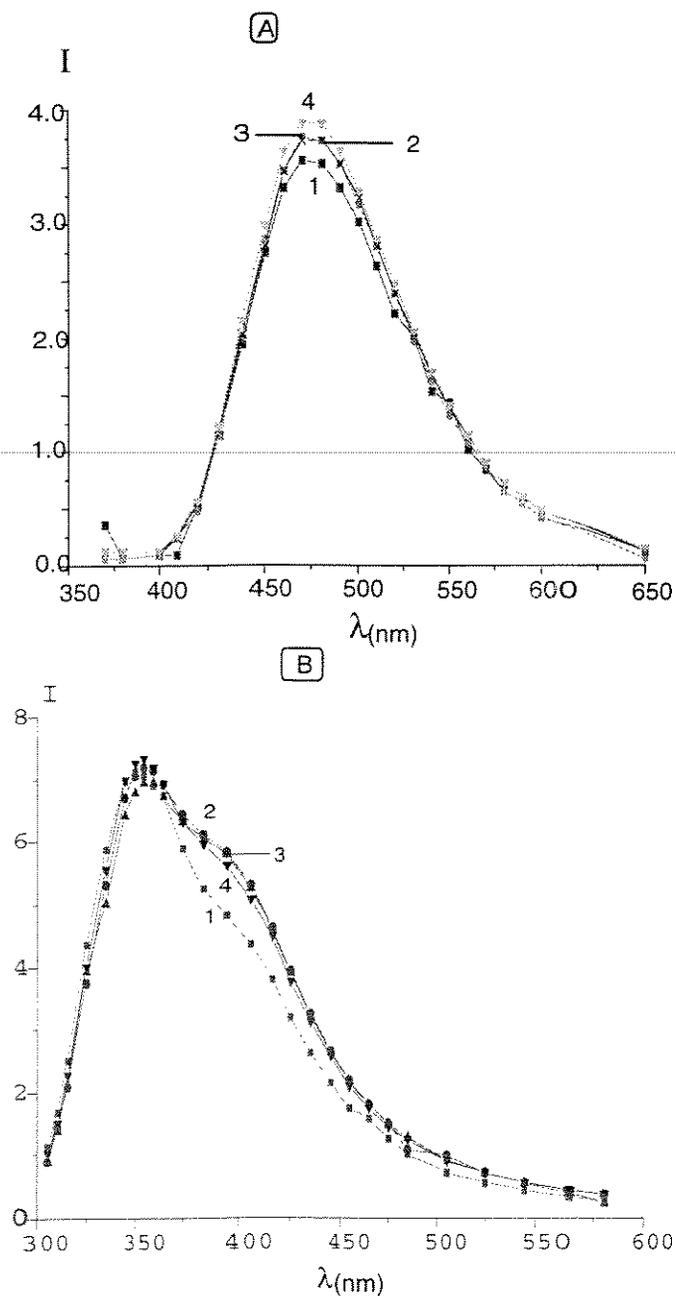


FIGURA 27 - Espectros de fluorescência do ANS (A) e do Triptofano (B) de suspensões de ghosts tratadas com diferentes concentrações de PAV; (1) controle, (2) 20  $\mu$ M, (3) 40  $\mu$ M, e (4) 100  $\mu$ M. Comprimentos de onda de excitação 360 e 295 nm, respectivamente para ANS e triptofano, demais condições idênticas à da figura 21.

## 5.1. DETERMINAÇÃO DA DISTÂNCIA ENTRE FLUORÓFOROS POR SUPRESSÃO DE FLUORESCÊNCIA

Na presença do ANS observa-se uma diminuição na intensidade da fluorescência devida aos triptofano da membrana, causada pela transferência de energia. Um gráfico duplo recíproco da diminuição da intensidade de fluorescência do triptofano em função da concentração do ANS é mostrado na figura 28. O intercepto da ordenada fornece o inverso do valor da eficiência máxima de transferência  $E_{max}$ , que corresponde a um estado de completa ocupação de todos os sítios de ligação do ANS na membrana (Andley e Chakrabarti, 1981). A partir desse valor é possível calcular a separação intercromóforos,  $R$  (em  $\text{Å}^\circ$ ), que é a distância que separa os resíduos de triptofano e das moléculas de ANS ligadas na membrana.  $R$  foi calculado segundo a equação 6.

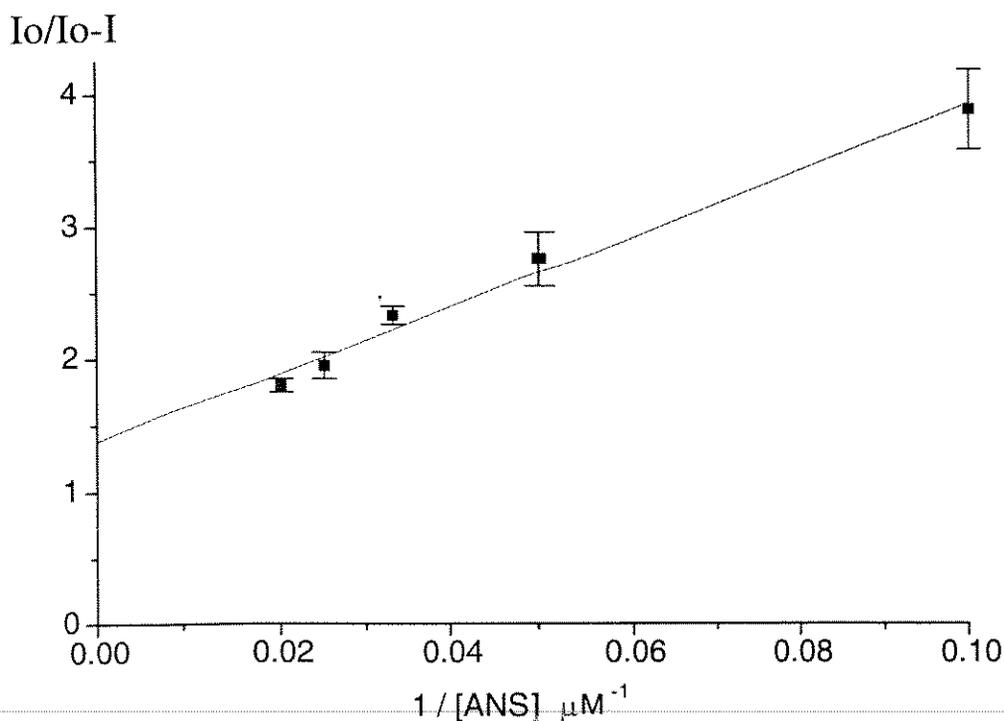


FIGURA 28 - Gráfico duplo-recíproco da diminuição da intensidade de fluorescência do triptofano em função da concentração de ANS, onde  $I_0$  e  $I$  representam respectivamente a intensidade de fluorescência das suspensões de membranas na ausência e na presença de ANS. Comprimento de onda de excitação 295 nm, temperatura ambiente e suspensões de membranas, com 150  $\mu g$  de proteína/mL, em PBS, pH 7,4.

As mesmas medidas foram efetuadas para suspensões de membranas submetidas à ação de diferentes concentrações de Trifluoperazina e Papaverina. Na figura 29-A verifica-se o efeito da TFP em suspensões de ghosts e em 29-B o efeito da Papaverina.

A TFP aumenta a supressão de fluorescência do Trp pelo ANS, porém esse efeito é menos evidente em concentrações maiores de TFP (100  $\mu M$ ) (figura 29-A).

Para verificar o efeito da depleção de ATP nessas interações nos ghosts, eritrócitos íntegros foram submetidos ao estresse

oxidativo brando, com inosina e iodoacetamida (descrito em Materiais e Métodos, item 3.1) e após o tratamento as membranas foram isoladas. Procurou-se identificar alterações que a ausência de ATP poderia estar causando na supressão de fluorescência do triptofano, causada pelo ANS. A figura 30-A mostra as determinações dos parâmetros E e R, isto é, a eficiência máxima de transferência de energia e a aparente separação intercromóforo, respectivamente,

Idênticas determinações foram realizadas para suspensões de ghosts isolados de eritrócitos previamente submetidos à ação de iodoacetamida (IAA), e ainda de suspensões de ghosts diretamente tratadas com IAA, sempre nas mesmas condições: concentração de IAA 5 mM, a 37°C, por 60 minutos, mostradas na figura 30-B.

Tanto a depleção de ATP (Figura 30-A) como o tratamento com IAA aumentam a supressão de fluorescência do Trp por ação do ANS.

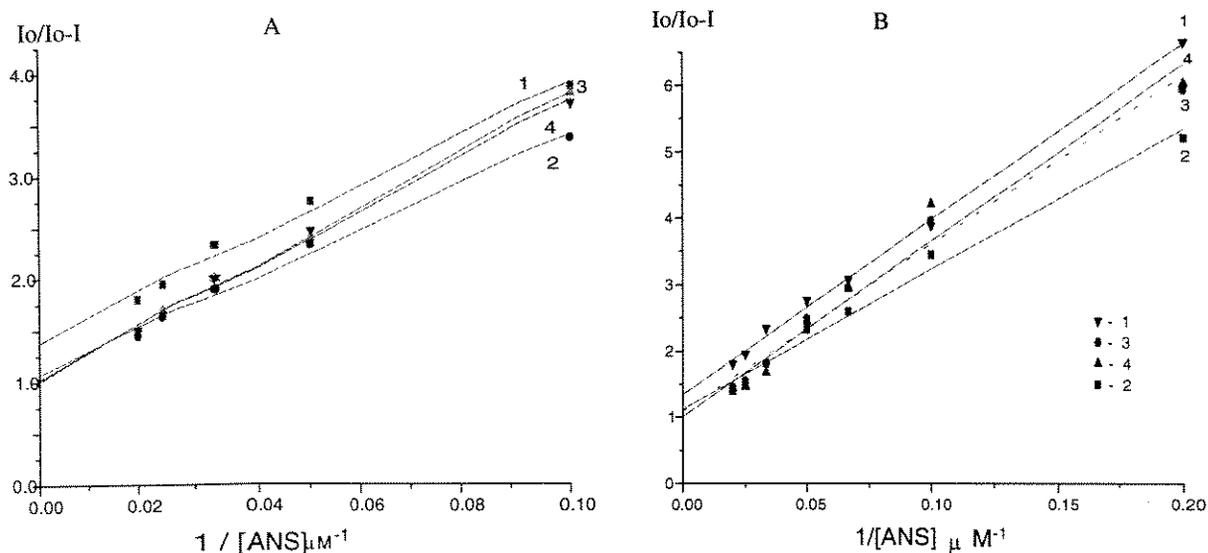


FIGURA 29 - Duplo-recíproco da intensidade de fluorescência do triptofano em função da concentração de ANS, na presença de TFP (A) e PAV (B).  $I_o$  e  $I$  indicam a fluorescência do triptofano na ausência e na presença de ANS, respectivamente. (A) Efeito da TFP: (1) Controle; (2)  $20 \mu M$ ; (3)  $40 \mu M$ ; (4)  $100 \mu M$  (B) Efeito da PAV: (1) Controle; (2)  $20 \mu M$ ; (3)  $40 \mu M$ ; (4)  $100 \mu M$ . Condições experimentais idênticas às da figura 24.

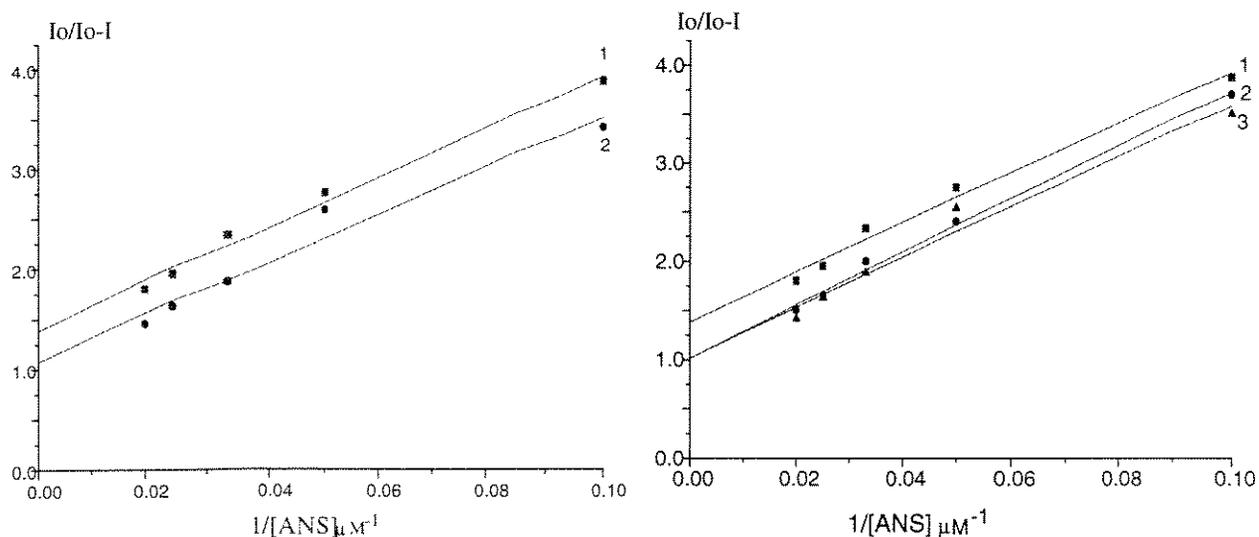


FIGURA 30 - Duplo-recíproco da intensidade de fluorescência do triptofano em função da concentração de ANS em ghosts depletados de ATP (A) e tratados com iodoacetamida (B).  $I_o$  e  $I$  indicam a fluorescência do triptofano na ausência e na presença de ANS, respectivamente. (A) Efeito da depleção de ATP: (1) Controle (2) Ghosts isolados de eritrócitos submetidos à depleção de ATP (Inosina  $30 \text{ mM}$ , iodoacetamida  $5 \text{ mM}$ ,  $1 \text{ h}$ ,  $37^\circ \text{C}$ ). (B) Efeito do tratamento com iodoacetamida: (1) Controle, (2) Suspensão de ghosts isolados de eritrócitos tratados com IAA ( $5 \text{ mM}$ ,  $1 \text{ h}$ ,  $37^\circ \text{C}$ ). (3) Suspensão de ghosts tratados com  $5 \text{ mM}$  de IAA por  $1 \text{ h}$  a  $37^\circ \text{C}$ , lavados e ressuspensos em PBS, pH  $7,4$ . Condições experimentais descritos na figura 24.

Para todas as determinações efetuou-se a regressão linear para obtenção os valores de E (correspondente ao inverso do intercepto, na ordenada, dos gráficos duplo-recíproco apresentados). Esses valores são apresentados na tabela 6. Os valores de R foram calculados a partir da fórmula, utilizando o valor de  $R_0$   $23,3 \text{ A}^\circ$ , e são também apresentados na tabela 6.

O tratamento com TFP, provoca um aumento no valor do parâmetro E, máxima eficiência de transferência de Energia) e, conseqüentemente um valor menor de R, aparente separação intercromóforo. Assim, a TFP diminui a separação entre os resíduos de triptofano e os sítios de ligação das moléculas de ANS, na membrana eritrocitária. Esses dados indicam mudanças na localização do ANS na membrana dos eritrócitos tratados com a droga; ou alterações na fluidez da membrana: esse efeito é maior para concentrações maiores de TFP.

Com a PAV, verifica-se também um aumento do valor do parâmetro E e portanto uma diminuição de R (em relação às amostras controle). Porém, inversamente à TFP, esse efeito não sofre grande modulação pela PAV e os valores obtidos são, dentro da margem de erro, semelhantes para as diferentes concentrações de PAV.

No entanto, os efeitos mais pronunciados foram obtidos para as amostras submetidas à depleção de ATP e ao bloqueio dos grupos SH (com iodoacetamida), indicando possíveis alterações na

organização lipídio-proteína das membranas, ocasionadas por esses tratamentos.

TABELA 6

VALORES MÁXIMA EFICIÊNCIA DE TRANSFERÊNCIA DE ENERGIA ( $E_{MAX}$ ) E DA APARENTE SEPARAÇÃO INTERCROMÓFORO (R)

	INTERCEPTO <sup>a</sup>	$E_{MAX}$ <sup>b</sup>	R (A°) <sup>c</sup>
CONTROLE	1.34±0.09	0.7470	18.5294
20 µM TFP	1.07±0.06	0.9355	14.7561
40 µM TFP	1.05±0.04	0.9553	13.8810
100 µM TFP	1.02±0.06	0.9796	12.1761
20 µM PAV	1.01±0.16	0.8917	16.0854
40 µM PAV	1.10±0.10	0.9091	15.6239
100 µM PAV	1.09±0.14	0.9162	15.4142
ERIT/IAA <sup>d</sup>	1.01±0.05	0.9856	11.4951
ERIT/DEPLE <sup>e</sup>	1.016±0.129	0.9842	11.6736
GHOST/IAA <sup>f</sup>	1.010±0.120	0.9897	10.8688

Valores calculados como descrito em Materiais e Métodos, em suspensões de ghosts controle, suspensões de ghosts tratadas previamente com TFP e PAV, nas concentrações indicadas. Os resultados são a média de 5 determinações.

<sup>a</sup> Intercepto a partir da regressão linear dos gráficos  $10/10-1$  em função do inverso da concentração de ANS, apresentados nas figuras 28-30.

<sup>b</sup> Valores da máxima eficiência de transferência de energia

<sup>c</sup> Valores da aparente separação intercromóforos (em A°)

<sup>d</sup> Ghosts isolados de eritrócitos tratados com IAA (5 mM)

<sup>e</sup> Ghosts isolados de hemácias submetidas à depleção de ATP

<sup>f</sup> Suspensões de ghosts tratadas com IAA (5 mM)

## 6. MEDIDAS DE RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA

As medidas de ressonância paramagnética eletrônica foram realizadas com o objetivo de verificar alterações na fluidez da membrana dos eritrócitos, pela ação das drogas Trifluoperazina e Papaverina, e pelo estresse oxidativo causado pela depleção de ATP. Nessas medidas foram utilizados marcadores de spin derivados do ácido esteárico, que se ligam aos lipídios da membrana em diferentes profundidades da bicamada lipídica.

Essas medidas foram efetuadas suspensões de eritrócitos íntegros, em hematócrito de 50% (em PBS, pH 7,4) sempre à temperatura de 37 °C, pois a temperatura tem grande influência no movimento dos marcadores de spin.

O parâmetro de ordem foi calculado (segundo a equação 7), nos espectros do 5-doxil estearato, que se apresenta mais imobilizado na membrana, possibilitando as medidas de  $2A_{//}$  e  $2A_{\perp}$  (item 4.5, Métodos).

Na tabela 7 estão apresentados os valores do parâmetro de ordem  $S$ , calculados como descrito em Materiais e Métodos (item 4.5), tanto para suspensões de hemácias controle, como para suspensões tratadas com TFP e PAV, à 37 °C. O parâmetro de ordem  $S$  varia de  $1 > S > 0$ , em sistemas totalmente ordenados até sistemas completamente isotrópicos.

TABELA 7

EFEITO DE TFP E PAV NO PARÂMETRO DE ORDEM, PARA O MARCADOR 5-DOXIL ESTEARATO

AMOSTRA	S
controle	0,77±0,03
40 $\mu$ M TFP	0,76±0,03
100 $\mu$ M TFP	0,76±0,03
100 $\mu$ M PAV	0,79±0,03
200 $\mu$ M PAV	0,80±0,05

Suspensões de eritrócitos (em hematócrito de 50%, PBS, pH 7,4) tratados com TFP e PAV a 37°C por 1 hora. Os valores de S foram calculados segundo a equação 7.

Os valores de S obtidos mostram que: 1) A membrana do eritrócito é altamente organizada e 2) Nem a TFP, nem a PAV alteram significativamente a ordem das membranas de eritrócitos.

A tabela 8 mostra os valores do parâmetro de ordem das suspensões de eritrócitos submetidas ao tratamento com Inosina e Iodoacetamida (para depleção de ATP) e Iodoacetamida (bloqueio dos grupos SH). Nem a depleção de ATP, nem o bloqueio dos grupos SH provocam alteração significativa do grau de ordem dos eritrócitos.

TABELA 8

EFEITO DA DEPLEÇÃO DE ATP E IODOACETAMIDA NO PARÂMETRO DE ORDEM, PARA O MARCADOR 5-DOXIL ESTEARATO

AMOSTRA	S
controle <sup>a</sup>	0,77±0,03
inosina/iodoacetamida <sup>b</sup>	0,78±0,01
iodoacetamida <sup>c</sup>	0,79±0,01

Suspensões de eritrócitos em hematócrito de 50% em PBS, pH 7,5. Espectros registrados à 37°C

<sup>a</sup> Controle

<sup>b</sup> Suspensões submetidas à depleção de ATP pelo tratamento com Inosina (30 mM) - Iodoacetamida (5mM), por 1h à 37°C

<sup>c</sup> Suspensões tratadas com Iodoacetamida (5mM), nas mesmas condições.

O parâmetro de ordem foi também calculado para suspensões de hemácias, submetidas à depleção de ATP ou ao tratamento com Iodoacetamida, e posteriormente tratadas com TFP, com o objetivo de se verificar alterações causadas pelo estresse oxidativo, na ligação da droga com a membrana. Esses valores são apresentados na tabela 9. Mais uma vez não foi detectada alteração no parâmetro de ordem medido pelo marcador de spin 5-doxil estearato.

TABELA 9

EFEITO DA TFP, EM SUSPENSÕES SUBMETIDAS À DEPLEÇÃO DE ATP OU TRATADAS IAA, NO PARÂMETRO DE ORDEM

AMOSTRA	DEPLETADAS ATP <sup>a</sup>	SH BLOQUEADOS <sup>b</sup>
CONTROLE <sup>c</sup>	0,78±0,02	0.79±0,01
40 µM TFP <sup>d</sup>	0,80±0,01	0,77±0,01
100 µM TFP <sup>e</sup>	0,78±0,01	0,77±0,01

Valores do parâmetro de ordem obtidos para suspensões de hemácias (Ht 50%, PBS, pH 7,4) com o marcador 5-doxil estearato, temperatura de 37°C

<sup>a</sup>Suspensões submetidas à depleção de ATP (mesmas condições anteriores)

<sup>b</sup>Suspensões tratadas com IAA (bloqueio dos grupos SH)

<sup>c</sup>Suspensões controle, sem o tratamento com a TFP.

<sup>d,e</sup>Suspensões submetidas a posterior tratamento com TFP, nas concentrações indicadas

Para o 12-doxil estearato não foi possível medir  $2A_{//}$  e  $2A_{\perp}$  com precisão, devido a maior liberdade de movimentação na região monitorada pelo grupamento NO. Por isso outros parâmetros foram obtidos dos espectros:  $I_1$  e  $I_2$ , (ver item 4.5, Métodos) apresentados na figura 31.

No caso do 12-doxil estearato o marcador livre tem uma contribuição significativa ao espectro observado, dificultando a determinação do valor de  $2A_{//}$  com precisão. Assim a determinação de  $I_1$  e  $I_2$  fornece informações com relação ao efeito da droga sobre a membrana.  $I_1$  e  $I_2$  estão relacionados com a solubilidade do marcador na membrana. A tabela 10 apresenta os valores da relação  $I_1/I_2$ .

A razão  $I_1/I_2$  dobrou de valor na presença de TFP, indicando maior incorporação do marcador 12-doxil. Efeito menos pronunciado foi verificado por ação da PAV e nas hemácias depletadas de ATP e SH-bloqueados.

A mobilidade do marcador 12-doxil diminui, por ação da TFP, PAV e nas hemácias tratadas. O efeito é bem mais evidente, porém, para a PAV e nos eritrócitos depletados.

Esses resultados sobre a dinâmica membranar estão de acordo com as medidas estruturais (parâmetro de ordem) das tabelas 7 e 8; aqueles resultados mostravam que, à exceção da TFP, em todos os casos estudados havia aumento da ordem da membrana, compatível com a maior anisotropia do 12-doxil.

TABELA 10.

VALORES DO PARÂMETRO  $I_1/I_2$ , PARA O 12-DOXIL ESTEARATO

AMOSTRA	$I_1/I_2$
CONTROLE	0,30 ± 0,03
40 $\mu$ M TFP	0,56 ± 0,06
100 $\mu$ M TFP	0,73 ± 0,05
100 $\mu$ M PAV	0,33 ± 0,05
200 $\mu$ M PAV	0,36 ± 0,05
INOSINA/IAA	0,37 ± 0,02
IAA	0,43 ± 0,12

Valores obtidos dos espectros do marcador 1-doxil estearato, para suspensões de eritrócitos controle, tratadas com TFP e com PAV e submetidas à depleção de ATP ou ao bloqueio de grupamentos SH. PBS, pH 7,4, 37°C.

Para o 16 doxil estearato também foram determinados os parâmetros  $I_1/I_2$ . Os valores obtidos com eritrócitos normais e tratados para depleção de ATP e bloqueio de grupos SH, são apresentados na tabela 11.

Como observado para o 12-doxil o tratamento dos eritrócitos promove aumento da relação  $I_1/I_2$ , indicando maior incorporação do marcador à membrana.

TABELA 11

VALOR DO PARÂMETRO  $I_1/I_2$ , PARA O 16-DOXIL ESTEARATO

AMOSTRA	$I_1/I_2$
CONTROLE	$0,88 \pm 0.08$
INO/IAA	$1,34 \pm 0.08$
IAA	$1,33 \pm 0.08$

Parâmetro calculado nos espectros com o marcador 16-doxil estearato para suspensões de eritrócitos controle; submetidas à depleção de ATP (com inosina e iodoacetamida) e submetidas ao bloqueio dos grupos SH. Tampão PBS, pH 7,4 e  $T = 37^\circ\text{C}$ .

Medidas do tempo de correlação rotacional,  $\tau_c$ , foram obtidas nos espectros do marcador 12-doxil em membranas, conforme a equação 9. Os valores de  $\tau_c$  obtidos para as suspensões de eritrócitos são apresentados na tabela 12.

TABELA 12

VALORES DO TEMPO DE CORRELAÇÃO PARA O 12-DOXIL ESTEARATO

AMOSTRA	$\tau_c \times 10^{-9}$ (segundos)
controle	6,88±0,81
40 $\mu$ M TFP	6,18±0,34
100 $\mu$ M TFP	6,07±0,61
100 $\mu$ M PAV	7,64±0,76
200 $\mu$ M PAV	6,65±0,73
INO/IAA	6,43±0,16
IAA	5,67±0,89

Valores de  $\tau_c$  (em segundos) calculados a partir dos espectros com o 12-doxil estearato, para suspensões de eritrócitos tratados com TFP ou PAV, ou submetidas à depleção de ATP ou bloqueio de grupamentos SH. PBS, pH 7,4, Temperatura - 37°C.

## DISCUSSÃO

### 1. PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DA PAPAVERINA

A Papaverina (PAV) é uma droga vasodilatadora utilizada largamente alguns anos atrás. Atualmente, seu uso clínico, é considerado obsoleto, devido a seu efeito inespecífico. Substitutos mais adequados foram desenvolvidos e são usados para as patologias nas quais a PAV era recomendada: isquemias cardíacas, angina péctoris, entre outras (Kaverina e Chumburidze, 1979). Porém, trabalhos recentes de nosso laboratório mostraram que a PAV a afinidade ao oxigênio da hemoglobina humana em soluções de proteína purificada bem como em eritrócitos intactos. (Paula & Meirelles, 1992). Outros trabalhos (Templeton & Chilson, 1981 e Campbell & Taylor, 1981) mostram efeitos da PAV, que envolvem a interação com as membranas celulares

Procurando aprofundar os estudos sobre a interação da PAV com a hemoglobina, medimos o valor do pKa da PAV em água. O valor encontrado do pKA do grupamento amina, 6,4 está de acordo com valores da literatura (Sakamoto, 1983).

Moléculas anfifílicas como a PAV, que possuem grupamento protonável apresentam afinidades diferentes pelas membranas biológicas, quando na forma protonada ou neutra. Essa ligação preferencial de uma das formas pode levar a alterações no valor do

pKa da droga, medido na presença da membrana (Lee, 1978; Schreier et alii, 1984).

Micelas de agentes surfactantes, como o SDS e o CTAC, são usadas como sistemas modelo para o estudo de alguns aspectos das membranas. O SDS é um surfactante aniônico e o CTAC catiônico. Ao estudar a interação da PAV com esses agentes surfactantes procuramos comparar a ligação da droga, em diferentes valores de pH e nas duas micelas, com a ligação da PAV em membranas.

Utilizamos concentrações elevadas dos surfactantes (bem acima da CMC), garantindo assim a presença de micelas. Primeiramente observamos (Figura 9) um deslocamento do pico máximo de absorbância da PAV quando na presença dos agentes surfactantes, em relação à droga em solução. Essa variação acompanhou alterações do valor de pKa da droga para os dois agentes surfactantes empregados: 7,99 na presença de SDS e 4,46 na presença de CTAC. A alteração do pKa é causada pela afinidade diferente das formas ionizadas da molécula e geralmente indica formação de complexo entre moléculas carregadas. De fato, o valor de pKa (4,46) encontrado para a interação da PAV com o CTAC (catiônico) é menor que o pKa (6,4) da PAV em água. Já o pKa na presença de SDS (aniônico) é maior (7,99). O papel das interações de grupos carregados está principalmente na modulação da interação eletrostática alterando a afinidade da PAV às micelas (Yushmanov et alii, 1994).

## 2. EFEITO DE DROGAS E DEPLEÇÃO DE ATP SOBRE O ERITRÓCITO

### 2.1. TRIFLUOPERAZINA

A trifluoperazina (TFP), derivado fenotiazínico, tem valor de pKa de 8.1. Os derivados fenotiazínicos são principalmente utilizados clinicamente como neuroléticos em processos de esquizofrenia. Seu efeito sobre a membrana tem sido descrito (Thompson et alii, 1993; Rosso et alii, 1988; Minetti & Di Stasi, 1987; Yamaguchi et alii, 1985; Lieber et alii, 1984; Seeman, 1972).

Em nossos experimentos observamos um efeito protetor da TFP à lise hiposmótica ( $[NaCl] = 0,077 M$ ) de eritrócitos (Ht 4%) em concentrações de TFP na faixa de 20-100  $\mu M$ , com efeito mais pronunciado em concentrações de 35-45  $\mu M$  (Tabela 2). Esses resultados estão de acordo com os dados da literatura, desde os trabalhos de Seeman (1966) e Seeman e Weinstein (1966), que demonstraram o efeito protetor à lise hipotônica de derivados fenotiazínicos, em baixas concentrações. Por outro lado, em concentrações maiores (acima de 0,3 mM) essas drogas produzem buracos na membrana (lise) e a fusão das células (Lieber et alii, 1984).

Minetti e Di Stasi (1987), sugerem que o sítio de ligação para os fenotiazínicos, na membrana, seriam as proteínas que formam o citoesqueleto, e que essa ligação interfere com a interação lipídio-proteína da membrana. Essa hipótese é compartilhada por Marroun e Curry (1993), que tentando relacionar o caráter lipofílico dos fenotiazínicos à sua partição nos eritrócitos, não encontraram nenhuma correlação, sugerindo que a droga não sofre partição simplesmente, mas se liga a algum componente da membrana celular ou do interior da célula.

Nós observamos que a fluorescência devido aos resíduos de triptofano das proteínas da membrana eritrocitária é suprimida na presença de TFP (Figura 25). A intensidade de fluorescência diminui com o aumento da concentração de droga, indicando a interação de TFP com as proteínas da membrana.

Além da diminuição da intensidade de fluorescência podemos observar também um deslocamento da banda de emissão dos resíduos de triptofano para comprimentos de onda maiores ("red shift"). Sendo o espectro de emissão de fluorescência do triptofano sensível à polaridade do meio, bem como às interações específicas entre o solvente e o anel indol, qualquer fator que afete a exposição os resíduos de triptofano à fase aquosa, causará um deslocamento da banda de emissão máxima de fluorescência desses resíduos (Lakowicz 1983). Desvios para o vermelho indicam que o triptofano experimenta ambiente mais polar (Slavik, 1982). Podemos portanto concluir que a ligação da TFP às proteínas da

membrana causa uma exposição dos resíduos de triptofano ao meio mais hidrofílico da membrana (superfície).

A supressão de fluorescência pode ser causada por diferentes processos, que incluem reações no estado excitado: transferência de energia, formação de complexos ou colisão entre o fluoróforo e o supressor. Em qualquer dessas situações deve ocorrer um contato molecular entre o fluoróforo e a molécula supressora (Lakowicz, 1983). Assim, a trifluoperazina deve ligar-se em alguma região da membrana, provavelmente na parte proteica, próxima (até  $5 \text{ \AA}$ ) a uma ou mais resíduos de triptofano, o que causa a supressão da fluorescência destes. O mecanismo da supressão pode também envolver por transferência de cargas (Lakowicz, 1983). Uma vez que a TFP em pH 7,4 está protonada (Marroun e Curry, 1993), esse pode ser o principal mecanismo do efeito da TFP na supressão. Por outro lado, como já observado, a TFP pode estar expondo os resíduos de triptofano ao meio aquoso, e essa exposição alterando de uma forma geral a interação lipídio-proteína da membrana.

Outro aspecto observado é que há um efeito inverso, na fluorescência do ANS (sonda incorporada à membrana), para as suspensões de "ghosts" tratadas com TFP. A intensidade da fluorescência do ANS aumenta nas suspensões tratadas com TFP, efeito esse também dependente da concentração (Figura 26). Como o ANS não fluoresce em meio aquoso, o aumento da fluorescência observado para suspensões tratadas com diferentes concentrações de TFP, é semelhante ao efeito observado quando se diminui a polaridade do solvente (Slavik, 1982). De alguma forma, a TFP, em

concentrações aumentadas facilita a ligação do ANS à membrana, aumentando dessa forma a intensidade de fluorescência da sonda.

A fluorescência reflete as várias interações da sonda com as moléculas ao seu redor, especialmente aquelas presentes durante seu estado excitado. Na membrana eritrocitária, bem como em algumas outras membranas, o ANS tem um aumento bifásico da intensidade de fluorescência, um rápido, que foi interpretado como sendo devido a existência de dois sítios de ligação para a sonda, um rápido e um segundo, com equilíbrio mais lento (que pode ser devido ao transporte do ANS para o interior da membrana, ou para o interior da célula). O ANS pode interagir com as proteínas, bem como com os lipídios da membrana sendo que, a baixas concentrações da sonda, a ligação às proteínas está favorecida. A ligação aos lipídios acontece em concentrações maiores de ANS (Slavik, 1982).

Na concentração de ANS utilizada no experimento (80  $\mu$ M), provavelmente todos os sítios de ligação proteicos tenham sido ocupados, e a contribuição da interação ANS-lipídio esteja também presente na fluorescência.

Outro fator que contribui para o aumento da fluorescência do ANS é a presença de cátions na superfície da membrana. Como também já mencionamos, em nossas condições experimentais a TFP se encontra protonada, e pode ser que essa carga positiva, se encontre próxima dos sítios de ligação do ANS, favorecendo a ligação à membrana. Em consequência haveria um aumento na

intensidade de fluorescência da sonda, como de fato foi observado (Figura 26).

Na ausência de ANS, a fluorescência dos resíduos de triptofano tem uma banda máxima de emissão a 330 nm ( $\lambda_{exc} = 295$  nm). Quando ANS é adicionado à amostra, em concentrações elevadas, a fluorescência do triptofano ( $\lambda_{exc} = 295$  nm) a 330 nm é suprimida e uma segunda banda de fluorescência surge, a 470 nm. A excitação em 295 nm não promove a fluorescência do ANS, e assim, a banda a 470 nm representa a fluorescência de um complexo formado entre triptofano excitado-ANS (Andley & Chakrabarti, 1981).

O tratamento dos ghosts com TFP mostra um aumento na transferência de energia do triptofano para o ANS ligado, em relação ao controle (Figura 29). Conseqüentemente, a distância entre eles (R) é menor (tabela 7). A distância diminui ainda mais quando se aumenta a concentração de TFP. Em membranas submetidas à ação da trifluoperazina, as moléculas de ANS podem se ligar com maior eficiência e subseqüentemente, ocupar seus sítios lipídicos, além dos proteicos (Slavik, 1982). Assim, nossos dados indicam que nas amostras tratadas com TFP os resíduos de triptofano tem menor rendimento quântico de fluorescência porque: 1) estão mais expostos ao solvente, devido a modificações estruturais da membrana (causadas pela TFP) e maior incorporação do ANS; 2) Mais moléculas de ANS estão nas proximidades do

triptofano, dada a maior incorporação desses pela ação da TFP (Figura 26).

De nossos experimento com fluorescência, podemos concluir que o tratamento com concentrações maiores de TFP: 1) diminui o rendimento quântico de fluorescência dos resíduos de triptofano da membrana ; 2) favorece a interação da sonda à membrana, ocupando também os sítios lipídicos da membrana, além dos proteicos, o que indica uma alteração na interação lipídio-proteína da membrana, como já sugerido por Minetti & di Stasi (1987).

Nos experimentos com marcadores de spin observamos uma diminuição no valor do parâmetro de ordem para o 5-doxil esterato, nas suspensões de eritrócitos íntegros tratados com TFP (em relação ao controle). Os valores foram submetidos ao teste t-Student, com  $p < 0,05$ , e são significativamente diferentes. A diminuição do valor do parâmetro de ordem indica uma diminuição na ordem da membrana, causada pela ação da droga.

O marcador 12-doxil experimenta ambiente mais isotrópico e não há definição das contribuições das moléculas orientadas a  $90^\circ$ - $180^\circ$ . Assim não se tem os extremos internos e externos definidos ( $2A_{//}$  e  $2A_{\perp}$ ). Nesse caso, determinou-se a relação  $I_1/I_2$ , que caracteriza a partição do marcador entre a membrana e a fase aquosa. Se a membrana é mais fluida, observa-se um valor menor para  $I_1/I_2$ , já que mais marcador é solubilizado na membrana. Por outro lado uma membrana mais rígida apresenta um valor menor de  $I_1/I_2$ . Pela tabela 10 pode-se verificar que, em suspensões

tratadas com TFP, há um aumento acentuado do parâmetro  $I_1/I_2$ , indicando um aumento na fluidez da membrana, em concordância com as medidas do parâmetro de ordem (para o 5-doxil estearato). Os valores observados foram também submetidos ao teste t-Student (pareado) e são significativamente diferentes para  $p < 0,05$ .

O termo fluidez é genérico e refere-se a alterações na ordem e mobilidade dos componentes da membrana. Este termo é usado quando não se pode distinguir entre alterações estruturais (ordem da bicamada) e dinâmicas (mobilidade das moléculas)

O tempo de correlação rotacional foi também calculado, utilizando os espectros do 12-doxil estearato, que possui alto grau de liberdade de rotação interna (o grupamento NO está inserido no core lipídico da membrana, a região de menor organização da bicamada). Os valores obtidos (Tabela 12), mostram uma diminuição de  $\tau_c$  para as suspensões submetidas à ação de TFP, indicando mudanças nas vizinhanças do marcador, isto é, um movimento do marcador mais rápido nas suspensões tratadas com TFP em relação ao controle. Embora as variações nos valores de  $\tau_c$  medidos sejam pequenas (cerca de 10%) esses resultados mais uma vez estão de acordo com as medidas do parâmetro de ordem (Tabela 7) e fluidez da membrana (Tabela 11). Portanto, as medidas de RPE mostraram que a interação da TFP com a membrana causa alterações estruturais e dinâmicas nessa.

Em relação aos processos oxidativos do eritrócito: não obtivemos nenhum indicativo consistente de efeito da TFP na peroxidação lipídica, como mostra a figura 14. Para a concentração de droga de 40  $\mu\text{M}$ , a curva está acima da curva controle, indicando um aumento da concentração de TBARS, e para as outras concentrações as curvas se encontram abaixo da curva controle. Esse dado deve ser melhor trabalhado para se demonstrar claramente se a TFP protege os eritrócitos da peroxidação lipídica, causada por peróxido de hidrogênio.

Com referência a oxidação da hemoglobina: na reação com  $\text{H}_2\text{O}_2$ , metaHb é transformada em ferrilHb. Kelder et alii (1991-a) propõem um ciclo catalítico para essa transformação onde, numa primeira etapa, metaHb é oxidada pelo  $\text{H}_2\text{O}_2$ , a espécie semelhante ao composto I da peroxidase. Essas espécies contem um grupo oxo-ferroIV e um radical catiônico de protoporfirina  $\pi$  (intermediário de reação). Essa espécie nunca foi isolada, mas sua existência tem sido postulada, como um composto intermediário na formação de ferrilHb. Esse intermediário, segundo os autores pode então interagir com fenotiazínicos ou ser transformado em um radical ferrilHb proteico, que estaria provavelmente localizado em um resíduo de tirosina, acessível aos derivados fenotiazínicos. O radical proteico estaria envolvido nas reações que causam modificações na metaHb, como reações de desnaturação e reação com oxigênio formando radicais peroxil proteicos. Ainda, segundo os autores, os derivados fenotiazínicos seriam capazes de doar elétrons para a proteína radicalar, evitando os processos de

desnaturação da Hb e produzindo a molécula de ferrilHb, estável. Como consequência da transferência de elétrons há a formação de um derivado catiônico radicalar do fenotiazínico, que se liga irreversivelmente à apoproteína ou sofre transformação, sendo o sulfóxido um dos produtos dessa transformação. Outro caminho alternativo apontado, é a transferência de elétrons do derivado fenotiazínico para o intermediário formado na primeira etapa, numa reação de competição entre o fenotiazínico e o resíduo de amino ácido para a transferência de elétrons para o radical porfirina.

Nossos resultados com a metaHb sob ação do peróxido de hidrogênio na presença de TFP, estão de acordo com o ciclo catalítico proposto por Kelder et alii (1991-a), cujo resultado final produz uma metaHb (FeIII), modificada pela ação dos fenotiazínicos sobre os radicais formados e sobre a ferrilHb. Observamos, no início da reação, uma porcentagem menor de ferrilHb na presença de TFP.

O efeito é mais pronunciado para soluções de oxiHb "stripped", mostrado na figura 19. A concentração de peróxido de 200  $\mu$ M foi a única que apresentou resultados, provavelmente, por que para concentrações menores, todo peróxido foi consumido, e provavelmente a ferrilHb formada sofreu reação com a oxiHb ainda presente, produzindo metaHb, ( reação 4, Introdução)

Na figura 17 estudamos a oxidação da hemoglobina purificada, pelo  $H_2O_2$ . Observa-se uma diminuição acentuada da quantidade de

oxiHb pela transformação desta em meta e ferrilHb, sendo que após cerca de 5 minutos de reação, tem início o processo de transformação da ferril em metaHb, consumindo o que havia ainda restado de oxiHb. Esse resultado está de acordo com as reações propostas por Guilivi e Davies (1990). A transformação de ferrilHb em metaHb, implica em transferência de elétrons do ferro hêmico (Fe II) para o complexo oxoferril (Fe IV) entre duas moléculas de Hb, para produzir a metaHb (FeIII). A formação de um radical de Hb foi descrito há alguns anos e vários autores (ex. Guilivi e Davies, 1990) tem proposto que no caso da mioglobina, o radical livre está localizado nos resíduos de tirosina, e os radicais Tyr tem sido indicados como as espécies iniciadoras na formação de di-tirosina intermolecular. A posição I de alguns resíduos de tirosina na estrutura terciária da mioglobina, próximo ao heme e expostos ao meio, facilitam a reação com O<sub>2</sub>, para formar um radical peroxil.

Na presença de TFP observamos que a quantidade de oxiHb transformada é muito pequena, sendo que cerca de 70% permanece na forma original, em contraste com o controle, onde a porcentagem relativa de oxiHb cai para menos de 10% do original. Conseqüentemente, as percentagens relativas de meta e ferrilHb são bem menores, na presença de TFP, que no controle. De alguma forma a TFP se liga à oxiHb, protegendo a molécula de Hb da ação do peróxido, antes da formação de qualquer intermediário apontado para a metaHb. Se houvesse a transferência de elétrons da TFP para a ferrilHb, numa reação semelhante à demonstrada por Guilivi e Davies, para a transferência de elétrons da oxiHb para a

ferrilHb, teríamos um aumento da porcentagem de metaHb, o que não ocorreu em nossas determinações; a porcentagem de ferrilHb se apresentou maior que a de metaHb, ficando praticamente estável a de oxiHb, quando na presença da trifluoperazina. Kelder et alii (1991-b) apontam uma transferência de elétrons entre a clorpromazina e o radical livre apoproteico, de ferrilHb. Se essa espécie radicalar é formada também na reação entre a oxiHb e o peróxido de hidrogênio, temos uma explicação para a porcentagem maior de ferril, em relação à metaHb, mas ainda sem uma explicação para a concentração elevada de oxiHb. Esse resultado deve ser melhor explorado para se tentar elucidar o mecanismo de ação da droga na proteção quanto a oxidação da oxiHb.

Na reação da metaHb com  $H_2O_2$  há diminuição na absorbância da banda de Soret, pela destruição do heme, parcialmente prevenida pelos derivados fenotiazínicos (Kelder et alii, 1991-a). Esse efeito também é verificado para a TFP (Figura 21, e tabela 4). Pode-se observar que essa proteção é mais efetiva para concentrações de peróxido da ordem de 200  $\mu M$ . Esse efeito protetor foi também observado para a oxiHb, nas mesmas condições (Figura 22 e tabela 5).

## 2.2.PAPAVERINA

Em trabalhos do nosso laboratório (Meirelles et alii, 1985; Paula e Meirelles, 1992), observou-se que a PAV reduz a afinidade hemoglobina-oxigênio, tanto no sangue total como em preparações

de Hb purificada. Além disso, a interação da PAV com a hemoglobina se dá preferencialmente, na forma protonada da droga (De Paula e Meirelles 1992). Dados de RPE, indicam que a PAV interage ainda com os grupos heme da Hb de adultos (Meirelles et alii, 1985).

Para que a PAV exerça seu efeito na afinidade Hb-oxigênio no sangue total ela deve penetrar no eritrócito, atravessando a membrana. Nesse trabalho tentamos observar alterações produzidas pelo vasodilatador na membrana, bem como mudanças nas propriedades da PAV, mediadas pela membrana ( $\Delta pK_a$ ).

O tratamento das suspensões de ghosts com diferentes concentrações de papaverina não apresentou efeito significativo na intensidade de fluorescência do triptofano, bem como na intensidade de fluorescência do ANS (Figura 27). Na verdade, a ligação da PAV à membrana provoca um pequeno aumento na intensidade de fluorescência do Trp. como se esse experimentasse um ambiente químico menos polar (Figura 27), em contraste com os resultados com TFP. Observa-se ainda um aumento no valor da máxima transferência de energia (E) entre o triptofano e o ANS, com conseqüente diminuição da distância intercromóforos (tabela 6). Esse resultado indica que a ligação da PAV à membrana promove alterações na membrana que resultam, provavelmente, em maior fluidez. Isso explicaria a maior supressão, já que não há maior incorporação de ANA por ação da PAV (Figura 27).

No entanto, nas medidas com RPE com marcadores de spin lipídicos observamos um ligeiro aumento no valor do parâmetro de ordem (tabela 7), pouco relacionado com a concentração de PAV. Esse aumento do valor de  $S$ , em relação ao controle, indica uma membrana mais ordenada, em contraste com as indicações de resultados da tabela 6 (fluorescência).

Já nos valores obtidos para os parâmetros calculados dos espectros de RPE do 12-doxil estearato (tabela 10), verifica-se um ligeiro aumento de  $I_1/I_2$  em relação ao controle, o que indica um aumento da solubilidade do marcador na membrana, compatível com uma membrana menos rígida.

Finalmente os valores obtidos para o tempo de correlação rotacional são também controvertidos, para a concentração de  $100\mu\text{M}$  de PAV verifica-se um aumento do valor de  $\tau_c$  (em relação ao controle) e, para a concentração de  $200\mu\text{M}$ , valor ligeiramente inferior ao controle. Em ambos os casos, esses valores se encontram dentro da margem de erro estatístico, e não podem ser considerados como alteração do movimento do marcador nas células tratadas com a droga.

Em suma, nossos resultados de fluorescência indicavam provável efeito da PAV em aumentar a fluidez da membrana (o que explicaria a maior transferência de energia entre o triptofano e ANS, tabela 6). as medidas de RPE não foram capazes de demonstrar esse aumento de fluidez, provavelmente devido: 1) ao pequeno efeito da PAV na membrana e 2) às regiões monitoradas

- com o 5-doxil, 12-doxil e 16-doxil estearatos - não refletiriam a região monitorada pela fluorescência (superfície da membrana).

De acordo com dados de Yushmanov et alii (1994-a), utilizando  $^1\text{H-NMR}$ , a PAV se liga a micelas de surfactantes (CTAC e SDS) e diferentes complexos são formados devido a interação do anel heterocíclico da PAV e a cabeça polar dos surfactantes.

Além disso, a ligação da PAV a micelas de surfactantes resulta em alteração no seu valor de  $\text{pKa}$  aparente (medido em água e na presença de membranas). Essa alteração é favorável à interação com o SDS (aniônico,  $\Delta\text{pKa} = +1,6$ ) e desfavorável à interação com o CTAC (catiônico,  $\Delta\text{pKa} = -0,9$ ), o que indica a formação de complexos entre moléculas carregadas. O papel das interações de grupos carregados se dá principalmente na modulação da interação eletrostática que resulta na variação da afinidade da PAV às micelas (Yushmanov et alii, 1994-b)

De acordo com os resultados obtidos com os agentes surfactantes esperávamos encontrar alterações significativas, de estrutura da membrana, principalmente nos espectros de RPE, com os marcadores de spin lipídicos. No entanto, somente foram observadas alterações discretas nos valores dos parâmetros medidos dos espectros. Cabe notar que as suspensões foram preparadas em PBS, a pH 7,4 onde a maior parte das moléculas de PAV se encontra no estado desprotonado.

A PAV também não apresenta efeito significativo sobre a produção de ferrilHb, como verificado em soluções de metaHb submetidas à ação de diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio (Figura 20).

### 2.3. DEPLEÇÃO DE ATP

Dados da literatura tem mostrado o efeito da depleção de ATP nas propriedades morfológicas e mecânicas dos eritrócitos (Mosior et alii, 1990). Além disso, células com níveis de ATP reduzidos mostram um aumento na extensão e duração da equinocitose (Daleke e Huestis, 1985).

O tratamento das suspensões de eritrócitos com inosina e iodoacetamida leva à depleção de ATP (Lew, 1971). A inosina é um ativador da síntese de ATP: no eritrócito, a inosina liga-se aos fosfatos inorgânicos fornecendo cofatores para a enzima gliceraldeído fosfato desidrogenase, enquanto a iodoacetamida inibe especificamente esta enzima ligando-se ao grupo -SH do sítio ativo da enzima e impedindo a continuidade da glicólise. Assim, por um lado a inosina esgota os substratos necessários para a síntese de ATP presentes na célula, enquanto por outro lado, a IAA interrompe a via glicolítica (Lew, 1971).

Observamos um discreto deslocamento da curva de hemólise, de eritrócitos submetidos à depleção de ATP, o que indica uma fragilidade osmótica aumentada (Figura 12, tabela 2). Além disso, em eritrócitos depletados de ATP, a trifluoperazina continua exercendo o seu efeito protetor contra hemólise hiposmótica. Nas suspensões de eritrócitos normais obtivemos cerca de 43 % de proteção máxima, enquanto que para os eritrócitos submetidos à depleção somente cerca de 13% (Tabela 2).

De acordo com os trabalhos de Jain (1989) e Rajeswari et alii (1991) a glicose induz à peroxidação lipídica dos eritrócitos humanos e causa fragilidade osmótica, além de inativar as enzimas  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  e  $\text{Ca}^{2+}\text{-ATPase}$  (Gonzalez-Flecha et alii, 1990), por interação não covalente. Em células isoladas, a glicose pode sofrer enolização e produzir, com intermediários nesse processo, radicais livres de oxigênio (Wolff & Dean, 1988) e causar peroxidação dos ácidos graxos insaturados dos fosfolipídios da membrana eritrocitária (Carrel et alii, 1975). Mosior et alii (1990-a) ativando a glicólise com fosfato em alta concentração com conseqüente aumento na concentração intracelular de ATP, obtiveram resultados que indicam um aumento do volume celular e uma diminuição da fragilidade osmótica. Esses dados sugerem que essas alterações, ATP dependentes, podem ser causadas por mudanças na capacidade expansão da membrana, devido à mudanças nas interações citoesqueleto-bicamada lipídica, da membrana eritrocitária.

do citoesqueleto participam do mecanismo de regulação da forma eritrocitária (Mosior et alii, 1999).do fosfatidilinositol,

Clari et alii. (1990) mostram que a fosforilação dos resíduos Tyr e Ser da principal proteína transmembranar (a banda 3) do citoesqueleto da membrana eritrocitária humana, está diminuída durante a depleção metabólica, sendo que o efeito no resíduo da tirosina não é reversível, resultando em inativação irreversível de quinases ligadas à membrana e citossólica.

Quando tratamos os ghosts isolados somente com iodoacetamida (que se liga aos grupamentos SH expostos da membrana) encontramos valor mais elevado para a eficiência máxima de transferência de energia e portanto uma aparente separação intercromóforos bem menor, em relação ao controle. A iodoacetamida reage com grupos SH dos resíduos de cisteína ou com o grupo imidazol dos resíduos de histidina. Na ligação da iodoacetamida com esses resíduos, provavelmente há uma alteração na região dos resíduos de triptofano, tornando-os mais acessíveis à sonda ANS, o que resulta no aumento da supressão de fluorescência (tabela 6).

As medidas de RPE revelaram um pequeno aumento no valor do parâmetro de ordem S (calculado para o 5-doxil estearato), tanto para as suspensões de células submetidas à depleção de ATP, como para as tratadas com IAA, em relação ao controle. Esse aumento no parâmetro de ordem indica um aumento da rigidez (empacotamento) das membranas.

Por outro lado, quando observamos os valores de  $I_1/I_2$  (determinados nos espectros do marcador 12-doxil estearato), verifica-se um aumento, em relação às suspensões controle. Esse parâmetro está relacionado com a solubilidade do marcador na membrana, e um aumento na razão  $I_1/I_2$  indica que uma quantidade maior de marcador foi solubilizado na membrana e, portanto, ela deve estar mais fluida.

Para o 16-doxil estearato foram determinados os mesmos parâmetros que para o 12-doxil e observamos um aumento acentuado no valor de  $I_1/I_2$  indicando uma solubilização maior para o marcador na membrana.

Embora os dados com RPE quando se submete os eritrócitos à depleção de ATP sejam, ainda controversos entre os marcadores utilizados, algumas informações podem ser tiradas, isto é. 1) o sinal do marcador imobilizado aumenta ( $I_1/I_2$ ) na depleção de ATP como observado para o 12 e 16 doxil, 2) as alterações de ordem e mobilidade são pequenas e variam com a região da bicamada. Além disso, como os marcadores se intercalam na bicamada lipídica e o fragmento nitróxido se encontra ligado em diferentes posições no ácido esteárico, (e portanto, irá sentir o movimento dos lipídios da membrana em diferentes graus de profundidade da bicamada), poderíamos especular que as alterações causadas pela depleção de ATP na membrana, tem efeitos diferenciados nas regiões da bicamada.

Mosior et alii (1990-b) utilizando também ressonância paramagnética eletrônica e marcadores de spin lipídicos mostraram que a ordem lipídica (medida do parâmetro de ordem, S) não depende do nível de ATP, mas a mobilidade lipídica (tempo de correlação,  $\tau_c$ ) é maior em células com concentrações maiores de ATP. Nossos resultados de movimento de marcador ( $\tau_c$ ) também indicam aumento da mobilidade do marcador nas membranas depletadas de ATP e com os grupos SH bloqueados (Tabela 12). Assim a depleção de ATP, parece estar relacionada com mudanças estruturais na membrana celular.

## CONCLUSÕES

### 1. A TRIFUOPERAZINA:

- Protege a hemólise hiposmótica dos eritrócitos (Ht 4%) em faixa de concentração que varia de 20-100  $\mu$ M.
- Liga-se às proteínas da membrana e causa alterações no arranjo proteico (expondo os resíduos de triptofano ao meio mais hidrofílico e/ou facilitando acesso de supressores).
- Nas concentrações utilizadas nesse trabalho ( máximo de 0,20 mM) a interação da droga com a membrana, ocasiona um aumento da fluidez da membrana, isto é, aumento da mobilidade das moléculas (Tabelas 14 e 16).
- Protege a oxidação da Hb, induzida por peróxido de hidrogênio 0,20 mM, com efeito mais pronunciado sobre a oxiHb. A produção de espécies oxidadas de Hb (meta e ferril) são menores na presença de TFP (Figura 19).
- Protege o grupo heme da Hb da destruição causada pelo peróxido de hidrogênio, tanto para oxi como para metaHb (Tabela 4, figura 19).

## 2. A PAPAVERINA:

- A ligação da droga com agentes surfactantes (SDS e CTAC) provoca alteração no valor do pKa da droga, por alteração na afinidade da PAV às micelas. A ligação com o surfactante aniônico (SDS) é favorecida e com o CTAC (aniônico) é desfavorecida, provocando alterações no pKa de +1,6 e -0,9, respectivamente.
- Aumenta a supressão de fluorescência do triptofano por ANS (Tabela 6), sugerindo maior fluidez da membrana.
- Não altera significativamente a fluidez da membrana (Resultados de RPE).
- Não altera significativamente os processos oxidativos da Hb, induzidos pelo peróxido de hidrogênio.

## 3. A DEPLEÇÃO DE ATP:

- Provoca um discreto aumento na fragilidade osmótica do eritrócito.
- Aumenta a exposição dos resíduos de triptofano da membrana, à supressão.

- Causa efeitos diferenciados nas regiões da bicamada, em relação à fluidez da membrana.
- Não causa alterações evidentes nos processos de peroxidação lipídica, mesmo quando as hemácias são estocadas por uma semana.

**BIBLIOGRAFIA**

- ANDLEY, U.P. and CHAKRABARTI, B. (1981) Interaction of 8-anilino-1-naphthalenesulfonate with rod outer segment membrane. *Biochemistry* **20**: 1687-1693.
- BERMAN, M.; BENESCH, R. and BENESCH, R.E. (1977). The removal of organic phosphates from Hb. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **26**: 162-167.
- BROCKLEHURST, J.R.; FREEDMAN, R.B.; HANCOCK, D.J. and RADDA, G.K. (1970) Membrane studies with polarity-dependent and excimer-forming fluorescent probes. *Biochem. J.* **116**: 721-731.
- BUEGE, J. and AUST, S.D. (1979) Microsomal lipid peroxidation. *Method. Enzymol.* **52**: 302-310.
- CAMPBELL, I.L. and TAYLOR, K.W. (1981) The effect of metabolites, papaverine, and probenecid on cyclic AMP efflux from isolated rat islets of Langerhans. *Biochim. Biophys. Acta* **677**: 357-364.
- CARREL, R.W.; WINTERBURN, C.C. and RECHMILEWITZ, E.A. (1975) Activated oxygen and haemolysis. *Br. J. Haematol.* **30**: 259-264.
- CHANCE, B.; SIES, H. and BOVEERIS, A (1979) Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev.* **59**: 527:605.
- CHASIS J.A. and SHOHET S.B. (1987) Red cell biochemical anatomy and membrane properties. *Ann. Rev. Physiol.* **49**: 237-248.
- CHEN, M; SORETTE, M.P.; CHIU, D.T.Y. and CLARK (1991) Prehemolytic effects of hydrogen peroxide and t-butylhydroperoxide on selected red cells properties. *Biochem. Biophys. Acta* **1066**: 193-200.

- CLARI,G and MORET,V. (1989) Comparative characterization of membrane-associated and cytosolic Tyr-protein kinases in human erythrocytes. *Eur.J.Biochem.***179**: 581-588.
- CLARI,G.; MARZARO,G. and MORET,V. (1990) Metabolic depletion effect on serine/threonine- and tyrosine-phosphorylations of membrane proteins in human erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta* **1023**: 319-324.
- CLARK, M. R.(1988). Senescence of red blood cells: Progress and Problems. *Physiol. Rev.* **68**: 503-554.
- CLEMENS,M.R. and WALLER,H.D. (1987) Lipid peroxidation in erythrocytes. *Chem.Phys. Lipids* **45**: 251-268.
- COHEN,G. and HOCHSTEIN,P. (1965) In vivo generation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in mouse erythrocytes by hemolytic agents. *J. Pharmac. Exp. Ther.***147**: 139-145.
- CONNOR J.; GILLUM K. and SCHROIT A.J. (1990). Maintenance of lipid asymmetry in red blood cells and ghosts: effect of divalent cations and serum albumin on the transbilayer distribution of phosphatidylserine. *Biochim. Biophys. Acta* **1025**: 82-86.
- DALEKE,D.L. and HUESTIS,W.H. (1985) Incorporation and translocation of aminophospholipids in human erythrocytes. *Biochemistry* **24**: 5406-5416.
- DAVIES,K.J.A. and GOLDBERG,A.L.(1987) Oxygen radicals stimulate proteolysis and lipid peroxidation by independent mechanisms in erythrocytes. *J. Biol. Chem.* **26**: 8220-8226.
- DEVAUX, P.F. (1991) Static and dynamic lipid asymmetry in cell membranes. *Biochemistry* **30**: 1163-1173.

- FERRARI, M. (1974) Effects of papaverine on smooth muscle and their mechanism. *Pharmacol. Res. Comm.* **6**: 50-57.
- FORREST, I.S. and GREEN, D.E. (1972) Phenothiazines: metabolism and analytical detection *J. Forensic. Sci* **17**: 592-617.
- GIULIVI, C. and DAVIES, K.J.A. (1990) A novel antioxidant role for hemoglobin. *J. Biol. Chem.* **265**: 19453-19460.
- GIULIVI, C; HOCHSTEIN, P and DAVIES, K.J.A. (1994) Hydrogen peroxide production by red blood cells. *Free Rad. Biol. Med.* **16**: 123-129.
- GONZALEZ-FLECHA, F.L.; BERMUDEZ, M.C.; CEDOLA, N.V.; GAGLIARDINO, J.J. and ROSSI, J.P.F.C. (1990) Decreased Ca ATPase activity after glycosylation of erythrocyte membranes in vivo and in vitro. *Diabetes*, **39**:707-711.
- GOODMAN, L.S. and GILMAN, A. (1975) **The Pharmacological Basis of Therapeutics**. McMillan, New York.
- GRATZER, W.B. (1981) The red cell membrane and its cytoskeleton. *Biochem. J.* **198**: 1-8.
- GRIFFITH, O.H. and JOST, O.P. (1976) Lipid Spin Label in Biological Membranes. In: **Spin Labeling - theory and applications**, (Berliner, L.J., ed), pp.453-5223, Academic Press, New York.
- GROLLMAN, A. (1951) In: **Pharmacology and Therapeutics**. Lea & Febigerr, Philadelphia, pp.106.
- HALLIWELL, B and GUTTERIDGE, C. (1989) Lipid peroxidation: a radical chain reaction In: **Free Radical Biology and Medicine** (B.Halliwell and J.M.C. Gutteridge eds) 139-189; Clarendon Press-Oxford.

- HITZEMANN, R.J. (1989) Effects of non-electrolyte molecules with anesthetic activity on the physical properties of DMPC multilamellar liposomes. *Bioch. Biophys. Acta* **983**: 205-211.
- HUBBELL, M and McCONNELL, M. (1976) Molecular motion in Biological Membranes. In: **Spin Labeling Theory and Applications**, (Lawrence J. Berliner, ed) Academic Press - New York, San Francisco, London. 525-558.
- IMANISHI, H.; NAKAI, T.; ABE, T. and TAKINO, T. (1985) Glutathione metabolism in red cell aging. *Mech. Ageing Dev.* **32**: 57-62.
- JAIN, S. K. (1988). Evidence for membrane lipid peroxidation during the in vivo aging of human erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta*, **937**: 205-210.
- JAIN, S.K. (1989) Hyperglycemia can cause membrane lipid peroxidation and osmotic fragility in human red blood cells. *J. Biol. Chem.* **264**: 21340-21345.
- JONES, O.T. and LEE, A.G. (1985) Interactions of hexachlorocyclohexanes with lipid bilayers. *Biochim. Biophys. Acta* **812**: 731-739.
- JORGENSEN, K.; IPSEN, J.H.; MOURITSEN, O.G.; BENNETT, D. and ZUCKERMANN, M.J. (1991) A general model for the interaction of foreign molecules with lipid membranes: drugs and anaesthetics. *Biochim. Biophys. Acta* **1062**: 227-238.
- KAHANA E.; STREICHMAN S. and SILVER B.L. (1991) The role of electrostatic forces in the interaction between the membrane and cytoskeleton of human erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta* **1066**: 1-5.
- KAVERINA, N.V and CHUMBURIDZE (1979) Antianginal drugs. *Pharm. Therap.* **4**: 109-153.

- KELDER, P.P.; FISCHER, M.J.E.; MOL, N.J. and JANSSEN, L.H.M. (1991-a) Oxidation of chlorpromazine by methemoglobin in the presence of hydrogen peroxide. Formation of chlorpromazine radical cation and its covalent binding to methemoglobin. *Arch. Biochem. Biophys.* **284**: 313-319.
- KELDER, P.P.; MOL, N.J. and JANSSEN, L.H.M. (1991-b) Mechanistic aspects of the oxidation of phenothiazine by methemoglobin in the presence of hydrogen peroxide. *Biochem. Pharmacol.* **42**: 1551-1559.
- KELDER, P.P.; MOL, N.J.; FISCHER, M.J.E. and JANSSEN, L.H.M. (1994). Kinetic evaluation of oxidation of phenothiazine derivatives by methemoglobin and horseradish peroxidase in the presence of hydrogen peroxide. Implications for the reaction mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta.* **1205**: 230-238.
- LAKOWICZ, J.R. (1983), Factors affecting the emission spectra of proteins, In: **Principles of fluorescence spectroscopy**, cap.11:354-379. (Plenum press, New York).
- LEE P.; KIRK G. and HOFFMAM J.F. (1984). Interrelations among Na and K content, cell volume, and bouyant density in human red blood cell populations. *J. Membr. Biol.* **79**: 119-126.
- LEE B.; McKENNA K. and BRAMHALL J. (1985) Kinetic studies of human erythrocyte membrane resealing. *Biochim. Biophys. Acta* **15**: 128-134.
- LEW, V.L (1971) On the ATP dependence of the Ca<sup>2+</sup>-induced increase in K<sup>+</sup> permeability observed in human red cells. *Biochim. Biophys. Acta.* **233**: 827-830.
- LICHTENBERG, D.; ROBSON, R.J. and DENNIS, E.A. (1983) Solubilization of phospholipids by detergents: Structural and kinectic aspects. *Biochim. Biophys. Acta* **737**: 285-304.

- LIEBER, M. R.; LANGE, Y.; WEINSTEIN, R. and STECK, T. L. (1984) Interaction of Chlorpromazine with the human erythrocyte membrane. *J. Biol. Chem.* **259**: 9225-9234.
- LISSI, E.; BIANCONI, M. L.; AMARAL, A. T., PAULA, E.; BLANCH, L. E. B. and 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
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FURR, A. L. and RANDALL, R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-273
- LUXNAT, M. and GALLA H-J (1986) Partition of chlorpromazine into lipid bilayer membranes: the effect of membrane structure and composition. *Biochim. Biophys. Acta* **856**: 274-282.
- MARROUM, P. J. and CURRY, S. H. (1993) Red blood cell partitioning, protein binding and lipophilicity of six phenothiazines. *J. Pharm. Pharmacol.* **45**: 39-42.
- MEIRELLES, N. C.; NASCIMENTO, O. R. and TABAK, M. (1985) 6,7-Dimethoxy-veratrylisoquinoline alters the oxygen dissociation properties of human hemoglobin: an ESR study. *Intern. J. Hemoglobin Research* **9**: 399-403.
- MIDDELKOOP E.; LUBIN B. H.; BEVERS E. M.; Op den KEMP J. A. F.; COMFURIUS P.; CHIU D. T. Y.; ZWALL R. F. A.; DEENEN L. L. M. and ROELOFSEN B. (1988). Studies on sickled erythrocytes provide evidence that the asymmetric distribution of phosphatidylserine in the red cell membrane is maintained by both ATP-dependent translocation and interaction with membrane skeletal proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **937**: 281-288.

- MINETTI, M. and DI STASI, A.M.M. (1987) Involvement of erythrocyte skeletal proteins in the modulation of membrane fluidity by phenothiazines. *Biochemistry*. **26**: 8133-8137.
- MOSIOR, M; BOBROWSKA, M. and GOMULKIEWICZ, J. (1990-a). Effect of the level of ATP and of the state of spectrin on osmotic properties of bovine erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta* **1022**: 355-360.
- MOSIOR, M.; MIKOLAJCZAK, A. and GOMULKIEWICZ, J. (1990-b) The effect of ATP on order and mobility of lipids in the bovine erythrocyte membrane. *Biochim. Biophys. Acta* **1022**: 361-364.
- NASH, G.B. and MEISRLMN, H.J. (1983) .Red cell and ghost viscoelasticity. Effects of hemoglobin concentration and in vivo aging. *Biophys.J.* **17**: 63-73.
- NOJI S.; TANIGUCHI, S. and KON, H. (1991). An EPR study on erythrocyte deformability. *Prog. Biophys. Molec. Biol.* **55**: 85-105.
- OHKANA, H; NOBUKO, O. and YAGI, K. (1979) Assay for lipid peroxidation in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* **95**: 351-358.
- ONDRIAS, K.; STASKO, A.; MISIK, V.; REGULI, J. and SVAJDLENKA, E. (1991) Comparison of perturbation effect of propanolol, verapamil, chlorpromazine and carbisocaine on lecithin liposomes and brain total lipid liposomes. *Chem.Biol.Interactions* **79**: 197-206.
- PAULA, E. and MEIRELLES, N.C. (1992) Interactions between vasodilator drugs and human hemoglobin. *Brazilian J.Med.Biol,Res.* **25**: 557-565.
- PEREZ-GILABERT, M; FERRER, A.S. and CARMONA, F.G. (1994) Enzymatic oxidation of phenothiazines by lipoxygenase/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> system. *Biochem. Pharmac.* **47**: 2227-2232.

- PLATT O.S.; LUX S.E. and FALCONE J.F. (1993). A highly conserved region of human erythrocyte ankyrin contains the capacity to bind spectrin. *J. Biol. Chem.* **268**: 24421-24426.
- RAJESWARI,R.; NATARAJAN,R; NADLER,J.L.; KUMAR,D. and KALRA,V.K. (1991) Glucose induces lipid peroxidation and inactivation of membrane-associated ion-transport enzymes in human erythrocytes in vivo and in vitro. *J. Cell. Physiol.* **149**: 100-109.
- RIGGS,A. (1981) Preparation of blood hemoglobin of vertebrates. *Methods Enzym.* **76**: 5-29.
- ROSSO,J.; ZACHOWSKI,A. and DEVAUX,P.F. (1988) Influence of chlorpromazine on the transverse mobility of phospholipids in the human erythrocyte membrane: relation to shape changes. *Biochim. Biophys. Acta* **942**: 271-279.
- SAKAMOTO,M.M. (1983) Efeitos farmacológicos de alcaloides benzil-isoquinolínicos sobre a musculatura traqueal de cobaias. Dissertação de mestrado, UNICAMP, Campinas, SP.
- SCHRIER,S.L.; ZACHOWSKI,A.; HERVÉ,P.; KADER,J.C. and DEVAUX,P.F. (1992) Transmembrane redistribution of phospholipids of the human red cell membrane during hypotonic hemolysis. *Biochem. Biophys. Acta.* **1105**: 170-176.
- SCHROIT,A.J. and ZWALL,R.F.A. (1991). Transbilayer movement of phospholipids in red cell and platelet membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **1071**: 313-329.
- SEEMAN,P. and WEINSTEIN, J. (1966) I. Erythrocyte membrane stabilization by tranquilizers and antihistamines. *Biochem. Pharmacol.* **15**: 1737-1752.

- SEEMAN,P. (1966). II. Erythrocyte membrane stabilization by local anesthetics and tranquilizers. *Biochem. Pharmacol.* **15**: 1753-1766.
- SEEMAN,P. (1972) Membrane actions of anesthetics and tranquilizers. *Pharmac. Rev.* **24**: 583-594.
- SLAVIK,J.(1982) Anilinonaphthalene sulfonate as a probe of membrane composition and function. *Biochim. Biophys. Acta* **694**: 1-25.
- SOLAR,I and SHAKLAI,N. (1989) Association of hemin with protein 4.1 as compared to spectrin and actin. *Bioch. Biophys. Acta* **983**: 199-204.
- SOLLMANN,A. (1949) In: **A Manual of Pharmacology**. W.B. Saunders & Co., Philadelphia, pp.255.
- SPINEDI,A.; PACINI,L.; LIMATOLA,C.; LULY,P. and FARIAS,R.N. (1991) A study of human erythrocyte acetylcholinesterase inhibition by chlorpromazine. *Biochem J.* **278**: 461-463.
- SPINEDI,A.; PACINI,L.; LIMATOLA,C.; LULY,P. and FARIAS,R.N. (1992) Phenothiazines inhibit acetylcholinesterase by concentration-dependent-type kinetics. *Biochem Pharmacol.* **44**: 1511-1514.
- STOCCHI,V.; KOLB, N.; CUCCHIARINI,L.; SEGNI,M.; MAGNANI,M. and FORNAINI,G. (1987). Adenine and pyridine nucleotides during rabbit reticulocyte maturation and cell aging. *Mech. Ageing Dev.***39**: 29-44.
- STORCH,J. and KLEINFELD,A.M. (1985) The lipid structure of biological membranes. *Trends Biochem. Sci.* **10**: 418-421.

- STREICHMAN S. ; KAHANA E. and SILVER B.L. (1991). EPR study of hydrophobic interaction of spectrin with fatty acids. *Biochim. Biophys. Acta* **1066**: 9-13.
- SULLIVAN, S.G.; BAYSAL,E and STERN,A. (1992) Inhibition of hemin-induced hemolysis by desferrioxamine: binding of hemin to red cell membranes and the effects of alteration of membrane sulfhydryl groups. *Biochim. Biophys. Acta* **1104**: 38-44.
- TEMPLETON,B.A. and CHILSON,O.P. (1981) Adenine transport by mature rabbit erythrocytes. *J. Biol. Chem.* **256**: 285-290.
- THOMPSON,A.A.; CORNELIUS,A.S.; ASAKURA,T. and HORIUCHI,K. (1993). Comparative studies of phenothiazine derivatives for their effects on swelling of normal and sickle erythrocytes. *Gen. Pharmacol.* **24**: 999-1006.
- TOZER,T.N. and TUCK,L.D. (1965) Substituent effects on oxidation and stabilization of phenothiazine semiquinone free radicals. *J. Pharm. Sci.* **54**: 1169-1175.
- VAN DEN BERG, J.J.M.; OP DEN KAMP,J.A.F.; LUBIN, B. H.; ROELOFSEN,B. and KUYPERS,F.A. (1992) Kinetics and site specificity of hydroperoxide-induced oxidative damage in red blood cells. *Free Radical Biol. Med.* **12**: 487-498.
- VAN DEN BERG,J.J.M.; KUYPERS,F.A.; LUBIN,B.H.; ROELOFSEN, B. and OP DEN KAMP,J.A.F. (1991). Direct and continuous measurement of hydroperoxide-induced oxidative stress on the membrane of intact erythrocytes. *Free Radical Biol. Med.* **11**: 255-261.
- VAZQUEZ,A.; TUDELA,J.; VARON,R. and CANOVAS,F.G. (1992) A kinetic study of the generation and decomposition of some phenothiazine free radicals formed during enzymatic oxidation of

- phenothiazines by peroxidase-hydrogen peroxide. *Biochem. Pharmacol.* **44**: 889-894.
- WATALA, C. and GWOZDZINSKI, K. (1993) Effect of aspirin on conformation and dynamics of membrane proteins in platelets and erythrocytes. *Biochem. Pharmacol.* **46**: 1343-1349.
- WILSON M.J.; RICHTER-LOWNWY K and DALEKE D.L.(1993) Hyperglycemia induces a loss of phospholipid asymmetry in human erythrocytes. *Biochemistry* **32**: 11302-11310.
- WINTERBOURN, C.C. (1985). Free-Radical production and oxidative reactions of hemoglobin. *Environ. Health Perspec.* **64**: 321-330.
- WINTERBOURN, C.C. (1990). Oxidative reactions of hemoglobin. *Methods in Enzymology*, **186**: 265-272.
- WOLFF, S.P. and DEAN, R.T. (1988) Glucose autoxidation and protein modification. The potential role of "autoxidative glycosylation" in diabetes. *Biochem. J.* **245**: 243-250.
- WYSE, J.W. and BUTTERFIELD, D.A. (1989) Interaction of hemin with erythrocyte membranes: alterations in the physical state of the major sialoglycoprotein. *Biochim. Biophys. Acta* **979**: 121-126.
- YAGI, K. (1976) A simple fluorimetric assay for lipoperoxide in blood plasma. *Biochem. Med.* **15**: 212-216.
- YAMAGUCHI, T.; WATANABE, S. and KIMOTO, E. (1985). ESR spectral changes induced by chlorpromazine in spin-labeled erythrocyte ghost membranes. *Biochim. Biophys. Acta.* **820**: 157-164.
- YUSHMANOV, V.E.; PERUSSI, J.R.; IMASATO, H. and TABAK, M (1994-a) Interaction of papaverine with micelles of surfactants with different charge studied by <sup>1</sup>H-NMR. *Biochim. Biophys. Acta* **1189**: 74-80.

YUSHMANOV, V.E.; PERUSSI, J.R.; IMASATO, H.; RUGGIERO, A.C. and TABAK, M (1994-b). Ionization and binding equilibria of papaverine in ionic micelles studied by  $^1\text{H-NMR}$  and optical absorption spectroscopy. *Biophys. Chem.* no prelo.

ZACHOWSKI, A. and DURAND, P. (1988) Biphasic nature of the binding of cationic amphipaths with artificial and biological membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **937**: 411-416.

## COMUNICAÇÕES EM CONGRESSOS

RUGGIERO,A.C e MEIRELLES,N.C. - Lipid peroxidation in aging on oxidative stress of red blood cells - XX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), Caxambú, MG - 20 a 23 de abril de 1991.

RUGGIERO,A.C. e MEIRELLES,N.C.- The effect of trifluoperazine in oxidative stress of red blood cells. XXI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), 16 a 19 de maio de 1992, Caxambú, MG.

RUGGIERO,A.C., ALONSO,A e MEIRELLES,N.C. - Effect of TFP on oxidative damage of red blood cells induced by hydrogen peroxide. XXII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia molecular (SBBq), 20 a 22 de maio de 1993, Caxambú, MG.

RUGGIERO,A.C. e MEIRELLES,N.C. - Effect of Trifluoperazine on dynamics of erythrocyte membranes. XXIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), 15 a 17 de maio de 1994, Caxambú, MG.