

SÔNIA VALÉRIA PINHEIRO MALHEIROS

CONTRIBUIÇÃO DO SISTEMA MICROSSOMAL
HEPÁTICO NA HEMÓLISE INDUZIDA POR
TRIFLUOPERAZINE (TFP)

Tese de Mestrado apresentada ao Curso
de Pós-Graduação do Departamento de
Bioquímica - I.B., Universidade de
Campinas, UNICAMP

ORIENTADORA:

Prof.^a Dr.^a NILCE CORREA MEIRELLES

CAMPINAS - SP
1995

exemplar corresponde à redação final
tese defendida pelo (a) candidato (a)
<i>Sônia Valéria Pinheiro Malheiros</i>
aprovada pela Comissão Julgadora. <i>[assinatura]</i>
<i>20/02/95</i>

AGRADECIMENTOS

A meus pais, por me dar a vida e todas as ferramentas essenciais, vindas do amor, que me permitem oportunidades muitas inclusive o cumprimento desta tarefa.

À Prof. Dra. Nilce Correa Meirelles, pela acolhida, confiança e apoio que possibilitou concretização deste projeto.

Ao Prof. Dr. Igor A. Degterev, pelo intensivo acompanhamento sem o qual este trabalho não seria realizado.

Ao Prof. Dr. Urbano Meirelles pelas sugestões e cuidadosa revisão desse manuscrito.

Aos caros colegas do laboratório: Alessandro, Ana Célia, Eduardo, Luciane, Mariza e Ricardo, cujo inestimável companheirismo amenizou os momentos de cansaço.

Ao apoio técnico: Edu e Mauro (computador), Ednaldo (estatística), Antonio e Airton (desenhos), Marcos (cromatografia e eletroforese), Marina, Míriam e Andréia (secretaria), D. Jedida e Alessandro (quebra-galhos sem fim), que mostraram quão mais proveitoso é o trabalho feito em colaboração.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. BIOTRANSFORMAÇÃO DE DROGAS	1
1.2. COMPOSTOS FENOTIAZÍNICOS	8
2. OBJETIVOS.....	14
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	15
3.1. MATERIAIS	15
3.2. ESTUDOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS.....	15
3.3. DETERMINAÇÃO DO CITOCROMO P-450	15
3.4. DETERMINAÇÃO DO CITOCROMO B5	15
3.5. DETERMINAÇÃO DA PROTEÍNA TOTAL.....	15
3.6. EXPERIMENTOS DE BIOTRANSFORMAÇÃO.....	15
3.6.1. <i>Animais</i>	15
3.6.2. <i>Preparo do Sistema Microsomal Hepático (SMH)</i>	16
3.6.3. <i>Teste da Atividade Microsomal - Consumo de O₂</i>	16
3.6.4. <i>Biotransformação da TFP</i>	16
3.7. EXPERIMENTOS COM ERITRÓCITOS.....	17
3.7.1. <i>Animais</i>	17
3.7.2. <i>Preparo da Suspensão de Eritrócitos</i>	17
3.7.3. <i>Determinação da Curva de Hemólise Induzida por TFP</i>	17
3.8. HEMÓLISE E BIOTRANSFORMAÇÃO DA TFP	18
3.8.1. <i>Preparo das Amostras</i>	18
3.8.2. <i>Ensaio Hemolítico</i>	18
3.8.3. <i>Cálculo da TFP Residual</i>	19
3.8.4. <i>Cálculo do Coeficiente de Partição (P)</i>	19
3.9. EXPERIMENTOS COM O SOBRENADANTE PÓS MICROSSOMAL (SPM)	20
3.9.1. <i>Preparo do SPM</i>	20
3.9.2. <i>Determinação da Condutividade</i>	20
3.9.3. <i>Análise por Ressonância Magnética Nuclear de Prótons (¹H-RMN)</i>	20
3.9.4. <i>Análise Cromatográfica do SPM</i>	21
3.9.5. <i>Eletroforese do SPM</i>	21
3.9.6. <i>Ensaio Hemolítico com o SPM</i>	21
3.9.7. <i>Determinação de RNA</i>	21
4. RESULTADOS.....	23

4.1. TESTE DA ATIVIDADE MICROSSOMAL	23
4.1.1. <i>Consumo de Oxigênio</i>	23
4.2. BIOTRANSFORMAÇÃO DA TFP	23
4.3. EXPERIMENTOS COM ERITRÓCITOS	24
4.3.1. <i>Determinação da Curva de Hemólise Induzida pela TFP</i>	24
4.3.2. <i>Hemólise e Biotransformação de TFP</i>	24
4.4. CARACTERIZAÇÃO DO SPM	32
4.4.1. <i>Propriedades Físico-Químicas do SPM</i>	32
4.4.2. <i>Análise do SPM por ¹H-RMN</i>	35
4.4.3. <i>Análise Cromatográfica do SPM</i>	35
4.4.4. <i>Eletroforese do SPM e suas frações</i>	35
4.5. TESTE DE PROTEÇÃO HEMOLÍTICA COM O SPM	40
4.5.1. <i>Proteção Contra Hemólise Mecânica</i>	40
4.5.2. <i>Proteção Contra Hemólise Induzida pela TFP</i>	40
4.6. PROTEÇÃO DAS FRAÇÕES DO SPM CONTRA HEMÓLISE	40
4.6.1. <i>Proteção Contra Hemólise Mecânica</i>	41
4.6.2. <i>Proteção Contra Hemólise Induzida pela TFP</i>	41
5. DISCUSSÃO	47
6. CONCLUSÃO	55
7. RESUMO	56
8. SUMMARY	57
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58
10. COMUNICAÇÕES CIENTÍFICAS	64

ABREVIATURAS

BSA → soro albumina bovina

CPZ → clorpromazina

DSS → 2,2-dimetil, 2-silapentano - 5 - sulfonato

FAD → flavina-adenina-dinucleotídeo

FMN → flavina- mononucleotídeo

NADH → nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida

NADPH → nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida

NCHC → nitrocompostos heterocíclicos

PAGE → eletroforese em gel de poliacrilamida

PBS → solução salina tamponada

RMN → ressonância magnética nuclear

RNA → ácido ribonucleico

RPE → ressonância paramagnética eletrônica

SMH → sistema microssomal hepático

SPM → sobrenadante pós microssomal

TFP → trifluoperazina

TFPNO → nitróxido de trifluoperazina

TFPZ → triflupromazina

1. INTRODUÇÃO

1.1. BIOTRANSFORMAÇÃO DE DROGAS

Os compostos orgânicos vem sendo utilizados indiscriminadamente pela humanidade nos mais diferentes empregos: como medicamentos, pesticidas, conservantes, corantes, emulsificantes, solventes, etc. Além de resíduos industriais não desejados, que contaminam águas, alimentos e o ar. Os compostos orgânicos são normamente considerados estranhos ao organismo (xenobióticos). A grande maioria dos compostos orgânicos sintéticos sofre uma ação transformadora do organismo que promove alterações químicas resultando na excreção, usualmente renal, de metabólitos específicos. Este processo é denominado biotransformação (WILLIAMS, 1959). A biotransformação é um dos mais significativos aspectos da interação de drogas com seres vivos e pode ser evidenciada tanto nos organismos, como em células isoladas e em sistemas modelo (microsomas). O resultado final das reações de biotransformação pode tanto levar ao aumento como à diminuição da atividade farmacológica, sendo, portanto, um parâmetro essencial na clínica médica. As reações de oxidação são dominantes na biotransformação de drogas e as enzimas citocromo P-450 foram reconhecidas desde cedo como as principais responsáveis por estas reações. Por volta de 1950 variações nas taxas de biotransformação começaram a ser estudadas em humanos. Subseqüentemente, essas variações foram atribuídas à presença de diferentes formas de citocromo P-450 e a indutibilidade destas enzimas (GUENGERICH, 1977).

Embora estas enzimas tenham um importante papel na biotransformação de muitas drogas, carcinógenos químicos e outros agentes tóxicos, favorecendo sua eliminação, elas são responsáveis pela ativação metabólica de alguns substratos altamente reativos como: radicais livres de oxigênio, intermediários alquilantes ou arilantes, os quais reagem com macromoléculas e iniciam eventos tóxicos e ou carcinogênicos (HOLLENBERG, 1992).

As enzimas citocromo P-450 (EC 1.14.14.1 monoxigenases não específicas) catalisam uma surpreendente variedade de reações químicas incluindo biotransformação de compostos endógenos e de xenobióticos. Seus substratos fisiológicos mais importantes são os esteróides, eicosanóides, ácidos

graxos, hidroperóxidos lipídicos, acetonas e acetóis. Dentre os xenobióticos que servem de substrato para as enzimas P-450 temos medicamentos, procarcinógenos, antioxidantes, solventes orgânicos, anestésicos, corantes, pesticidas, álcoois e flavorizantes, além de um enorme número de substâncias químicas sintéticas que são potenciais substratos do complexo citocromo P-450. A maioria dos substratos das P-450 são lipofílicos e não há evidências que interações de cargas contribuam para a ligação com o citocromo. Particularmente tratando-se dos xenobióticos, há sempre a formação de compostos mais polares que serão excretados direta ou indiretamente, após conjugação com agentes hidrosolúveis como o ácido glicurônico e glutatona (PORTER & COON, 1991).

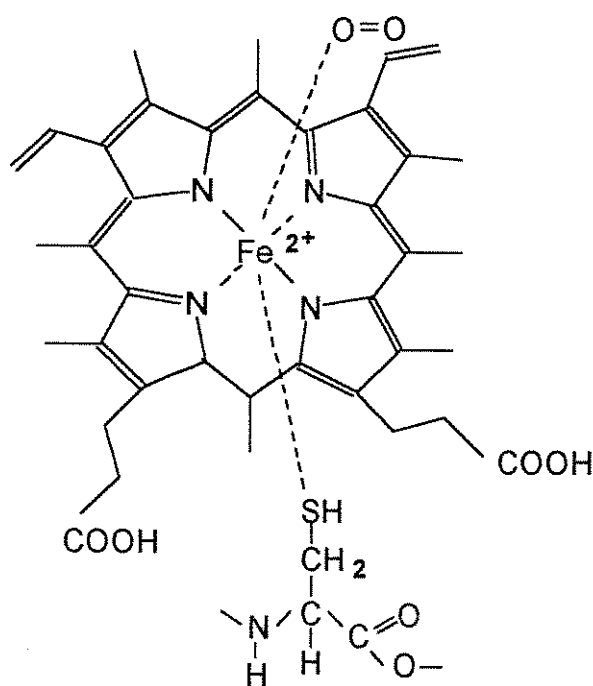
São conhecidas 150 isoenzimas de citocromo P-450 advindas da expressão de 28 diferentes genes, 11 dos quais estão presentes em todos os mamíferos. O complexo enzimático citocromo P-450, responsável pela biotransformação de fármacos, está localizado principalmente no fígado denominado do ponto de vista operacional, fração microssômica. Tais enzimas também são encontradas em outros órgãos como rins, pulmões e epitélio gastrointestinal, porém em menores concentrações. O complexo enzimático citocromo P-450 apresenta homologia variável de 10 - 90% e é encontrado em microrganismos, plantas e animais. Nos mamíferos encontra-se em várias organelas, predominantemente no retículo endoplasmático e mitocôndria (COON et alii, 1992).

O preparo de microssomas é um procedimento simples que corresponde a centrifugações diferenciais sucessivas e permite o estudo "in vitro" da biotransformação promovida pelo sistema microssomal de maneira inespecífica. Já o isolamento e purificação de enzimas citocromo-P450 específicas (isoenzimas) envolve procedimentos mais complexos desde a solubilização das enzimas pela utilização de detergentes e de sucessivas colunas cromatográficas, até a utilização de métodos imunoquímicos que empregam anticorpos específicos para o isolamento das diversas P-450 (RAUCY & LASKER, 1991).

As enzimas são produtos gênicos de cerca de 57.000 daltons o que corresponde a aproximadamente 500 resíduos de aminoácidos. O sítio ativo da citocromo P-450 possui como grupo prostético a ferroprotoporfirina IX (ESQUEMA 1). O átomo de ferro é ligado a 4 nitrogênios dos anéis pirrólicos da ferroprotoporfirina e tem como quinto ligante o ânion tiolato, que pertence a um resíduo de cisteína invariavelmente, fato este que contribui para as propriedades

catalíticas e espectrais características das enzimas P-450. A sexta posição de coordenação do ferro pode ser ocupada por uma molécula de água, pelo oxigênio molecular ou ainda pelo monóxido de carbono, nos dois últimos casos, quando o átomo de ferro encontra-se no estado reduzido (PORTER & COON, 1991).

Até o momento, somente a estrutura terciária da P-450 101 solúvel (P-450 cam) da bactéria *Pseudomonas putida* foi determinada e tem sido utilizada como um arquétipo para as enzimas citocromos P-450 de mamíferos (BLACK, 1992). Considera-se que a estrutura terciária das P-450 está conservada nas imediações do sítio de ligação do oxigênio o que permitiria a manutenção do seu crucial papel de monoxigenase (IMAI et alii, 1993).



ESQUEMA 1: MODELO DE FERROPROTOPORFIRINA IX

Preparações purificadas de P-450 exibem um elevado caráter anfipático com forte tendência de formação de agregados micelares de aproximadamente 6 monômeros (KUNZ et alii, 1991). Sequências do citocromo microssomal começam com um segmento hidrofóbico de aproximadamente 20 resíduos de aminoácidos que é seguido por um curto segmento policationico, e a sequência

remanescente exibe alternadamente caráter hidrofóbico e hidrofílico, mas sem que ocorra região de tão acentuada apolaridade quanto a região amino terminal (KUNZ et alii, 1991).

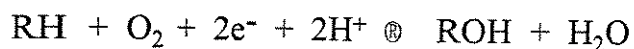
Como as citocromo P-450 eucarióticas estão inseridas na membrana mitocondrial ou no retículo endoplasmático, isso dificulta a obtenção de informações mais detalhadas referentes à estrutura tridimensional. A localização dos sítios de ligação de substratos e à própria localização do grupo prostético são ainda assuntos controversos. De maneira geral aceita-se que as citocromo P-450 eucarióticas estão organizadas em dois grandes domínios estruturais: um domínio transmembrana, formado por até 40 amino-ácidos da região amino terminal, e um domínio citossólico onde se ligam o grupo prostético e os substratos (BROWN & BLACK, 1989; UVAROV et alii, 1994).

As enzimas P-450 do retículo endoplasmático são proteínas integrais de membrana, ancoradas por um ou dois segmentos transmembranares localizados na porção amino-terminal. Esta região serve como um sinal de inserção, como âncora, e como sinal de finalização. Aparentemente nenhuma outra porção da estrutura primária poderia servir para fixar a translocação polipeptídica (SZCZESNA-SKORUPA & KEMPER, 1993). As citocromos P-450 também se ligam à membrana do retículo endoplasmático por um ou mais contatos periféricos. O grande domínio que contém o heme, provavelmente utiliza-se de hélices anfipáticas para se ligar à superfície citossólica da membrana assumindo uma característica rígida. No entanto, a natureza exata das interações periféricas não foram caracterizadas em detalhe (BLACK, 1992).

Uma grande controvérsia no estudo das enzimas citocromo P-450 é referente à orientação do sítio ativo do citocromo P-450 (grupo prostético) em relação a interface água/lipídeo (CENTENO & GUTIÉRREZ-MERINO, 1992). Se considerarmos as dimensões totais do citocromo P-450 e que a orientação do grupo heme seja paralela à superfície da membrana, o grupo heme estaria relativamente próximo da interface água-lipídeo. Esta situação favorece a hipótese de que substratos hidrofóbicos tenham acesso ao sítio catalítico via difusão através da bicamada lipídica, na qual estariam acumulados devido a sua natureza hidrofóbica (PARRY et alii, 1976; EBEL & O'KEEFE, 1978; KUEHN-VETEN et alii, 1989). No entanto, muitos grupos (KAWATO et alii, 1982; GUT et alii, 1982; EDWARDS et alii, 1991; CENTENO & GUTIÉRREZ-MERINO, 1992)

em trabalhos independentes, têm obtido evidências experimentais favorecendo a hipótese de que o grupo heme esteja localizado perpendicularmente à superfície da membrana, e portanto longe da interface água-lípido. Neste caso, o acesso de substratos hidrofóbicos ao sítio catalítico dar-se-ia por intermédio de proteínas citossólicas, proteínas microsomais ou por lipídeos que formariam uma fase hidrofóbica contígua, na qual o substrato pode particionar e atingir o sítio ativo da enzima (EDWARDS et alii, 1991).

O sistema enzimático citocromo P-450 catalisa a biotransformação de uma grande variedade de compostos de ocorrência natural bem como de xenobióticos requerendo para tal NAD(P)H e O₂. As P-450 podem também catalisar hidroxilações peróxido-dependentes de substratos em ausência de NADPH e O₂. Estas enzimas conhecidas como oxigenases de função mista, catalisam a incorporação de um átomo de oxigênio molecular no substrato (RH), enquanto o outro átomo de oxigênio é reduzido por dois elétrons resultando na formação de uma molécula de água (HOLLENBERG, 1992).

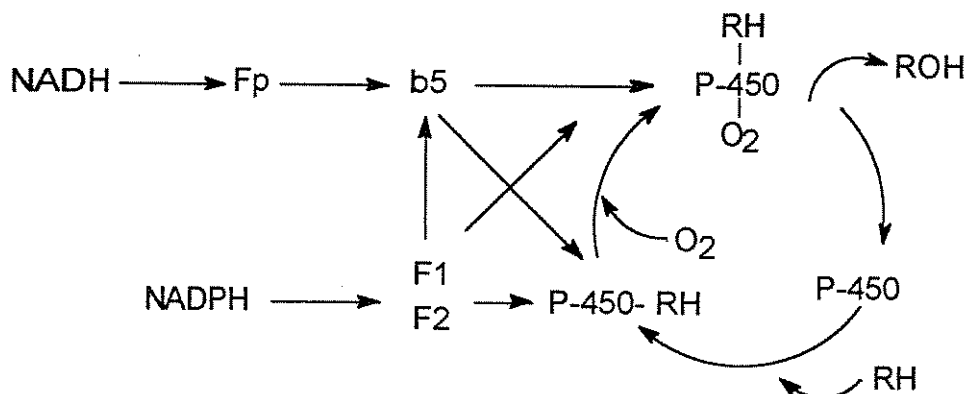


Dentre as reações catalisadas pelas P-450 oxigenases de função mista estão: epoxidações, N-desalquilações, O-desalquilações, S-oxidações e hidroxilações de compostos alifáticos e aromáticos. A diversidade de reações catalisadas pode ser entendida se considerarmos uma reação inicial que, em todos os casos, envolve a inserção de um grupo hidroxila para formar um intermediário, o qual dependendo da natureza do substrato e da sua própria estabilidade, passa à desalquilação, desaminação, etc. Esta hipótese leva a sugestão de haver um passo crítico na catálise promovida pelas P-450 que é a formação de um doador de hidroxila, o qual pode transferir o grupo hidroxila para a posição adequada no substrato (WHITE & COON, 1980).

Os processos oxidativos ocorrem graças a existência de um elevado nível de organização estrutural que permite o transporte de elétrons em presença de oxigênio e cofatores adequados (NAD(P)H).

Nos mamíferos a principal fonte de elétrons são os nucleotídeos piridínicos (NADPH e NADH). A cadeia transportadora destes elétrons no retículo endoplasmático é composta por duas flavoproteínas (a NADPH-citocromo-P-450-

redutase e a NADH-citocromo-b5-redutase) além dos citocromos b5 e P-450 (ESQUEMA 2). A flavoproteína complexa NADPH-citocromo-P-450-redutase tem como grupos prostéticos a flavina-adenina-dinucleotídeo (FAD) e a flavina-mononucleotídeo (FMN). O FAD serve como aceptor de elétrons do NADPH e o FMN reduz o citocromo P-450 e em determinadas situações pode reduzir também o citocromo b5 (PETERSON & PROUGH, 1986).



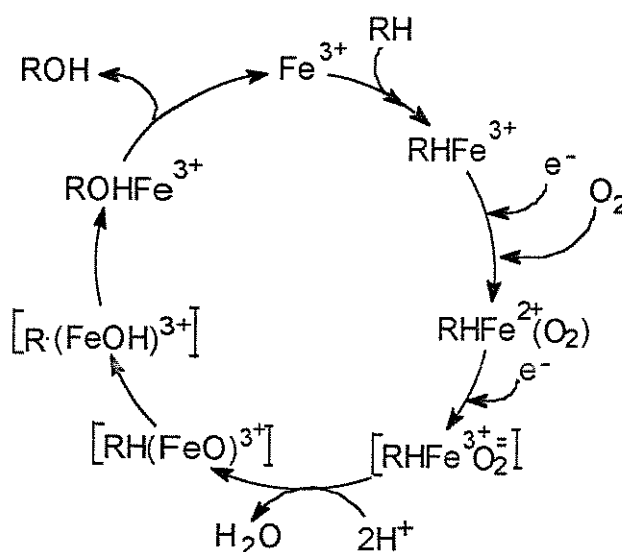
ESQUEMA 2: TRANSPORTE DE ELÉTRONS NO SISTEMA MICROSSOMAL HEPÁTICO. Onde RH é o substrato a ser oxidado, F1F2 é a enzima NADPH-citocromo-P-450-redutase e Fp é a enzima NADH-citocromo-b5-redutase.

O citocromo b5 é uma proteína anfipática ubiquamente distribuída pelos tecidos dos mamíferos. Ele está presente no retículo endoplasmático da maioria das células e também na membrana externa da mitocôndria enquanto que nos eritrócitos apresenta-se em forma solúvel. O citocromo b5 participa preferencialmente da transferência do segundo elétron das reações típicas de monoxigenases (KOOP, 1992) embora excepcionalmente possa doar os dois elétrons (PETERSON & PROUGH, 1986). Pode ser reduzido por duas hemoproteínas: a NADH-citocromo-b5-redutase e a NADPH-citocromo-P-450-redutase (ESQUEMA 2). Este fato explica porque o citocromo P-450 pode ser reduzido tanto em presença de NADH ou NADPH, já que ambos os nucleotídeos piridínicos podem servir como doadores de elétrons nas reações que envolvem o citocromo b5 (PETERSON & PROUGH, 1986).

O mecanismo catalítico pelo qual as várias isoformas de P-450 ativam o oxigênio molecular parece ser muito semelhante. Um substrato hidrofóbico (RH) liga-se inicialmente a citocromo P-450 oxidada (Fe^{3+}). O complexo resultante substrato-citocromo é reduzido pela redutase e o complexo reduzido combina-se

então com o oxigênio molecular. Alguns autores estabeleceram a presença do substrato como condição essencial para a entrada do primeiro elétron, pressupondo que o substrato ao se ligar ao sítio catalítico da P-450 altera o estado de spin do ferro que passaria de spin baixo a alto o que favoreceria o recebimento do elétron doado pelo cofator (MC MURRY & GROVES, 1986; PORTER & COON, 1991). O ferro então reduzido ($\text{Fe}^{3+} \rightleftharpoons \text{Fe}^{2+}$) é capaz de ligar o O_2 . Um segundo elétron e dois íons de hidrogênio são adquiridos do sistema doador, e os produtos são água e o metabólito oxidado (ESQUEMA 3).

Considerando as propriedades redox do ferro, oxigênio e átomos de enxofre, numerosas formas ressonantes podem ser sugeridas para a ativação do oxigênio intermediário. O oxigênio ativado pode assumir uma variedade de formas incluindo superóxido, oxeno e peróxidos (peroxiácido e ácido peroxímico). A inserção do oxigênio no substrato envolve abstração do hidrogênio do substrato seguida pela recombinação do carbono transiente e radicais hidroxila para formar o produto. O produto é então liberado, regenerando a forma nativa do ferro da P-450 que está apto à iniciar outro processo catalítico (HOLLENBERG, 1992) (ESQUEMA 3).

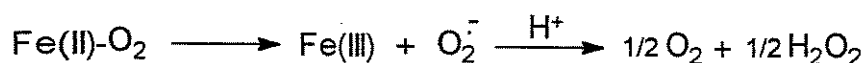


ESQUEMA 3: MECANISMO CATALÍTICO DAS ENZIMAS P-450 NOS PROCESSOS OXIDATIVOS

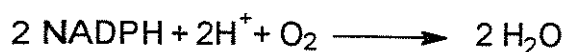
A P-450 pode usar peróxidos, hidroperóxidos e perácidos para promover N- e O-desalquilações, hidroxilações alifáticas e epoxidações olefinicas em ausência de NADPH e O_2 , o que sugere certa semelhança com a atividade de

peroxidases. A adição de um elétron, uma molécula de O_2 , um segundo elétron e dois prótons durante o ciclo catalítico é formalmente equivalente à adição de uma molécula de peróxido de hidrogênio. O mecanismo envolvendo a substituição de NADPH e O_2 por um composto peróxido é conhecido como via dos peróxidos (HOLLENBERG, 1992).

As enzimas P-450 podem formar H_2O_2 quando o processo de oxidação de substratos não está firmemente acoplado ao fluxo de elétrons. Muitas evidências levam a crer que o peróxido de hidrogênio é formado pela dismutação não enzimática do ânion superóxido, $O_2^{\cdot-}$, o qual é um produto formado a partir do complexo $Fe(II)-O_2$.



No entanto, em alguns casos o ânion superóxido não têm sido detectado na decomposição do complexo P-450- $Fe(II)-O_2$. A completa redução do O_2 a H_2O pelo P-450 tem sido documentada (GUENGERICH, 1977).



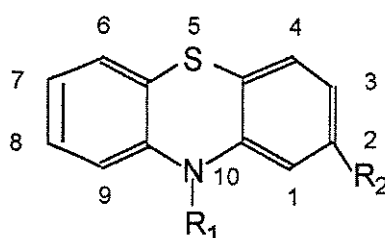
Quando a tensão de oxigênio é baixa a transferência de elétrons para substratos redutíveis pode competir com a ativação do oxigênio molecular, e, nessas condições, as reações de redução catalisadas pelas citocromo P-450 são favorecidas. No entanto, as reações de redução constituem fração muito pequena comparada ao grande número de reações de oxidação que as P-450 catalisam (MONTELLANO, 1989).

1.2. COMPOSTOS FENOTIAZÍNICOS

Dentre os compostos antipsicóticos mais eficazes estão as fenotiazinas, os tioxantenos, os dibenzodiazepínicos e os dibenzoazepínicos. Os agentes antipsicóticos são prescritos basicamente para pacientes com distúrbios psicóticos e outras enfermidades psiquiátricas graves (principalmente esquizofrenias), entretanto, podem apresentar outras propriedades clinicamente importantes,

incluindo efeitos antieméticos, antinauseantes e anti-histamínicos além da capacidade de potencializar analgésicos, sedativos e anestésicos gerais (BALDESSARINI, 1990).

A fenotiazina tem uma estrutura cíclica com três anéis na qual dois anéis benzênicos estão ligados por um átomo de nitrogênio e por um átomo de enxofre (ESQUEMA 4). Se o nitrogênio da posição 10 for substituído por um átomo de carbono com uma dupla ligação com a cadeia lateral, o composto torna-se um tioxanteno (BALDESSARINI, 1990).



ESQUEMA 4: ESTRUTURA GERAL DOS FENOTIAZÍNICOS

A atividade farmacológica e a potência dos fenotiazínicos variam de acordo com substituições por halogênios e outros grupos funcionais no núcleo fenotiazínico, bem como com o substituinte na posição 2 e com a cadeia lateral na posição 10. Os fenotiazínicos podem ser divididos em três grupos de acordo com a substituição na posição 10: a) cadeia lateral alifática, como a clorpromazina (CPZ) e a triflupromazina (TFPZ), de baixa potência antipsicótica mas boa eficácia clínica, b) uma porção piperidínica na cadeia lateral, como a tioridazina e a mesoridazina que produzem menores efeitos colaterais extrapiramidais, c) uma substituição lateral por um grupamento piperazina como a trifluoperazina (TFP) e a flufenazina. Esses últimos são os mais potentes fenotiazínicos e seu uso implica risco maior de efeitos extrapiramidais agudos, mas menor tendência à sedação ou efeitos colaterais autônomos como hipotensão, a menos que sejam usados em doses incomumente elevadas (VÁZQUEZ et alii, 1992).

As fenotiazinas provocam parkinsonismo e outros efeitos extrapiramidais, ações sobre o sistema cardiovascular, sistema nervoso autônomo e funções endócrinas. Os antipsicóticos fenotiazínicos atuam no sistema nervoso central por antagonismo da dopamina nos gânglios da base e nas regiões límbicas do

prosencéfalo, mais especificamente nos receptores dopaminérgicos do tipo D₂ (MELTZER & NASH, 1991; FROIMOWITZ & CODY, 1993).

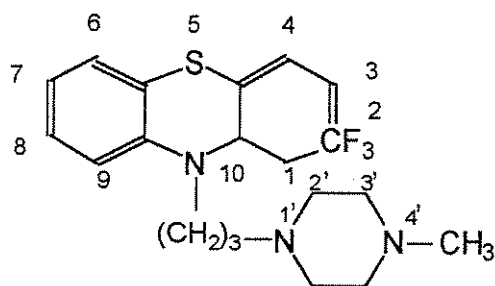
Os agentes antipsicóticos fenotiazínicos são extremamente lipofílicos, acumulam-se no cérebro, nos pulmões e em outros tecidos com suprimento sanguíneo elevado. Um aspecto crucial e freqüentemente negligenciado na disposição de drogas é a penetração e ligação nas células vermelhas do sangue. Drogas podem entrar nos eritrócitos ou mesmo interagir com elementos preferenciais na membrana, o que culmina em uma distribuição governada na membrana celular. Estas considerações podem afetar marcadamente a taxa de distribuição entre células vermelhas e sangue total (MARROUM & CURRY, 1993). A ligação de fenotiazínicos à proteínas plasmáticas é outro importante parâmetro farmacológico que pode afetar sua distribuição, eliminação, e com isso, a intensidade e duração dos seus efeitos. Os fenotiazínicos catiônicos ligam-se moderadamente a albumina e mais avidamente a outras proteínas de caráter ácido como a glicoproteína α 1-ácida e lipoproteínas. A TFP, por exemplo, tem afinidade 100 vezes maior pela glicoproteína α 1-ácida do que pela albumina (VERBEECK et alii, 1983). Estas características contribuem para a difícil compreensão da distribuição, biodisponibilidade e mesmo efeitos farmacológicos dos fenotiazínicos.

A TFP tem pico na concentração sanguínea 3 a 4 horas após sua administração oral, a meia vida biológica média é de 11 horas (JORGENSEN, 1986) embora ocorram padrões complexos de distribuição como por exemplo: ligação a eritrócitos, à proteínas plasmáticas, absorção de metabólitos pelo ciclo entero-hepático, etc. É comum encontrar metabólitos na urina por até vários meses após a interrupção do tratamento. A retirada lenta destas substâncias do organismo contribui para a taxa tipicamente lenta de exacerbação da psicose após interrupção do tratamento farmacológico (BALDESSARINI, 1990).

Os antipsicóticos fenotiazínicos são extensivamente biotransformados pelas enzimas microssomais hepáticas e produzem grande variedade de metabólitos. As reações oxidativas nos átomos de carbono, nitrogênio e enxofre lideram a produção de metabólitos da "fase 1", gerando: fenóis, alcóois, sulfóxidos, sulfonas, nitróxidos e produtos de degradação como grupamentos N-desalquilados ou metabólitos desaminados. Os metabólitos da "fase 1" podem ser objeto de conjugação com moléculas como ácido glicurônico, ácido sulfúrico ou glutathiona

para formar metabólitos ainda mais polares que são chamados, então, de metabólitos de “fase 2”. Alguns dos metabólitos de “fase 1” são metabolicamente ativos e contribuem para a atividade terapêutica e ou toxicidade da substância original (BALDESSARINI, 1990). Por sua vez os metabólitos hidrofílicos da “fase 2” são excretados pela urina e, em certo grau, pela bile. Considerando a excreção biliar, os metabólitos retornam ao intestino onde podem sofrer hidrólise por enzimas das bactérias intestinais e ser novamente reabsorvidos para a corrente circulatória num processo chamado de ciclo entero-hepático. Este processo contribui para a atividade biológica da substância original, porém dificulta estabelecer a relação entre níveis sanguíneos do fármaco e seus efeitos clínicos (HUBBARD et alii, 1993).

A trifluoperazina aparece como um dos compostos antipsicóticos mais potentes, o que está relacionado com sua estrutura química: a) têm uma substituição piperazínica na posição 10, b) possui um grupamento altamente eletrofílico ($-CF_3$) na posição 2, c) possui 3 átomos de carbono entre o N da posição 10 e o N do anel piperazínico (BALDESSARINI, 1990) (ESQUEMA 5).



ESQUEMA 5: ESTRUTURA DA TFP

Os fenotiazínicos piperazínicos como a trifluoperazina, além dos principais metabólitos 7-hidróxido-trifluoperazina, sulfóxido de trifluoperazina, podem apresentar oxidações em um ou ambos nitrogênios do núcleo piperazínico. Estudos *in vitro* indicam que oxidações ocorrem preferencialmente no nitrogênio da posição 4 da cadeia substituinte (N_4) e que a TFPNO é o principal metabólito da TFP em animais. Além disso foi demonstrado que os fenotiazínicos piperazínicos N_4 -óxidos possuem atividade antidopaminérgica (ARAVAGIRI et alii, 1986).

A complexidade das interações de drogas com sistemas biológicos correlaciona-se com propriedades físico-químicas das moléculas como o pKa e a lipofilicidade. Sendo especialmente verdadeiro quando tratamos de drogas que atuam no nível de sistema nervoso central como anestésicos, sedativos e tranquilizantes. Isto aplica-se as drogas originais bem como a seus metabólitos. A respeito dos fenotiazínicos, suas propriedades anticolinérgicas, antidopaminérgicas, antihistamínicas e antiadrenérgicas estão correlacionadas com o grau de lipofilicidade que a droga apresenta (MARROUM & CURRY, 1993).

THOMPSON et alii (1993) estudando o efeito de entumescimento de eritrócitos em presença de fenotiazínicos, mostraram que este efeito dependia de outros fatores como pH e hematócrito. O valor do pKa para a TFP (8,1) é mais baixo que o de outros fenotiazínicos como a CPZ e TFPZ. Isto significa que em pH fisiológico a TFP encontra-se menos ionizada que outros fenotiazínicos e poderia particionar mais facilmente nas células vermelhas e produzir maior efeito lítico.

Os coeficientes de partição da TFP entre hexano-água (pH 7,4) e entre eritrócitos-água são, respectivamente, 193 ± 32 e 5,53 (MARROUM & CURRY, 1993), e a ligação em proteínas nas células vermelhas é de 82,3 %. Os fenotiazínicos podem perturbar a estrutura lipídica da membrana eritrocitária através de dois possíveis mecanismos segundo MINETTI & DI STASI (1987): por interação direta da droga com alguma proteína da membrana, refletindo na bicamada ou por uma perturbação na estrutura lipídica que leva a alteração nas proteínas via interações lipídeo-proteína. Em pesquisas feitas neste laboratório RUGGIERO (1994) demonstrou por estudos de RPE que a TFP promove diminuição na ordem da membrana eritrocitária, verificou ainda que a TFP interage com as proteínas da membrana do eritrócito suprimindo a fluorescência derivada dos resíduos de triptofano. Outros autores também concordam que a interação da TFP com as membranas biológicas dá-se principalmente através de proteínas (MINETTI & DI STASI, 1987; PEREIRA & VERCESI, 1992).

A interação dos derivados fenotiazínicos com membranas plasmáticas têm sido extensivamente estudada. Estudos "in vitro" revelam que os fenotiazínicos estabilizam eritrócitos quando em baixas concentrações (SEEMAN & WEINSTEIN, 1966; SEEMAN, 1972; CORNELIUS et alii, 1987). O mecanismo

específico pelo qual alterações na permeabilidade ocorrem permanece ainda desconhecido. LIEBER et alii (1984) notaram a formação de pequenos poros na membrana de eritrócitos quando saturadas com CPZ, e sugeriram que isto levaria ao entumescimento celular e posterior hemólise. A dependência da captação de vários fenotiazínicos em função de volume total das células vermelhas e do coeficiente de partição de cada composto particular, também foi relatada neste trabalho.

2. OBJETIVOS

Objetivamos, neste trabalho:

- 1) Determinar a curva hemolítica induzida pela TFP em condição isotônica.
- 2) Investigar a ação da biotransformação dirigida pelo sistema microsomal hepático sobre a ação hemolítica induzida por TFP, na condição acima descrita.
- 3) Identificar a natureza e caracterizar bioquimicamente o sobrenadante pós-microsomal encontrado.
- 4) Investigar a proteção contra hemólise promovida pelo sobrenadante pós-microsomal (SPM).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. MATERIAIS

Trifluoperazina, Nifurtimox (4-[5-nitrofurfurilideno]amino]-3-metiltiomorfolina-1,1-dióxido), NADH, NADPH e RNA foram obtidos da Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA.

3.2. ESTUDOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS

Os espectros de absorção UV-Visível foram registrados em um espectrofotômetro BECKMAN DU-70 à temperatura ambiente (salvo as reações cinéticas de biotransformação que eram realizadas à 37° C).

3.3. DETERMINAÇÃO DO CITOCROMO P-450

A concentração de citocromo P-450 foi determinada pela diferença de absorbância em 450 nm do citocromo P-450 reduzido e saturado com CO e da forma reduzida do citocromo P-450 em 490 nm, utilizando um coeficiente de extinção molar de 91 mM⁻¹.cm⁻¹ (OMURA & SATO, 1964).

3.4. DETERMINAÇÃO DO CITOCROMO b5

O citocromo b5 foi determinado pela diferença do espectro reduzido por ditionito e o espectro oxidado utilizando um coeficiente de extinção molar de 118 mM⁻¹.cm⁻¹ a 423 nm (OZOLS, 1974).

3.5. DETERMINAÇÃO DA PROTEÍNA TOTAL

As determinações proteicas das preparações microssomais (SMH) bem como do sobrenadante pós microssomal (SPM) foram estimadas pelo método de Lowry, utilizando curva padrão de BSA (LOWRY et alii, 1951).

3.6. EXPERIMENTOS DE BIOTRANSFORMAÇÃO

3.6.1. ANIMAIS

Utilizamos camundongos Swiss, machos, de 60 dias, obtidos do Biotério Central da UNICAMP, alimentados com ração padrão, água *ad libitum* e submetidos a jejum por aproximadamente 18 horas antes dos experimentos.

3.6.2. PREPARO DO SISTEMA MICROSSOMAL HEPÁTICO (SMH)

A cada preparo 20 camundongos Swiss foram sacrificados por destroncamento cervical para retirada do fígado. O "pool" de fígados foi lavado em solução salina (NaCl 0,9%) resfriada à 4°C e homogeneizado em um Potter-Elvehjem com três volumes de tampão fosfato 0,1M EDTA 0,1 mM, pH 7,4, também resfriado. O homogenato foi centrifugado a 1.000xg por 20 minutos e o sobrenadante utilizado para nova centrifugação a 20.000xg por 40 minutos consecutivamente. O sobrenadante final foi centrifugado a 105.000xg por 1 hora. O "pellet" (fração microssomal) foi então lavado com 10 mL de tampão fosfato para remoção de hemoglobina e de contaminantes citossólicos e novamente centrifugado a 105.000xg. Finalmente, os microssomas foram ressuspensos no mesmo tampão. Usualmente alíquotas de 0,5 mL eram estocadas em nitrogênio líquido por até 60 dias sem perda de atividade e diluídas até a concentração de trabalho, no momento do uso (DEGTEREV, et alii, 1990).

A suspensão microssomal somente era utilizada após determinação da concentração dos citocromos P-450 e b5 (valores aceitáveis entre 0,8 e 1,0 μM / mg de proteína microssomal) (GUENGUERICH, 1977) o que garantia a qualidade da preparação.

3.6.3. TESTE DA ATIVIDADE MICROSSOMAL - CONSUMO DE O₂

O consumo de oxigênio foi determinado polarograficamente com eletrodo especial tipo Clark (Yellow Springs Instruments Co.) ligado a um oxígrafo Gilson. O ensaio foi feito a 25° C e o volume final da mistura foi de 1,2 mL. Para tal foi colocado na cela do oxígrafo SMH 1mg/mL e foi adicionado NADH (540 μM) seguida da adição do substrato Nifurtimox (290 μM) e de nova adição de cofator NADH (540 μM).

3.6.4. BIOTRANSFORMAÇÃO DA TFP

Suspensões microssomais de 1mg/ml foram incubadas à 37° C com 200 μM de TFP e cofator (NADPH ou NADH) em concentração equimolar à de TFP. Os espectros eram registrados entre 220 e 700 nm, em diferentes intervalos de tempo contra controle

apropriado (somente contra SMH ou contra SMH mais o cofator, nas mesmas concentrações que na mistura de trabalho).

3.7. EXPERIMENTOS COM ERITRÓCITOS

3.7.1. ANIMAIS

Utilizamos ratos Wistar isogênicos, de 90 dias, obtidos do Biotério Central da UNICAMP, alimentados com ração padrão, água *ad libitum*, e submetidos a jejum 18 horas antes dos experimentos.

3.7.2. PREPARO DA SUSPENSÃO DE ERITRÓCITOS

O sangue foi coletado por punção cardíaca em solução anticoagulante Alsiver (citrato sódico 0,027 M, NaCl 0,072 M, glicose 0,114 M e ácido cítrico 2,6 mM), e centrifugado a 4° C por 10 minutos a 700xg. O plasma, células da série branca e gorduras foram removidas por aspiração. As células vermelhas foram ressuspensas em PBS 5mM ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 2mM, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 3mM e NaCl 0,15M), pH 7,4, tampão de osmolaridade e pH fisiológicos, sendo novamente centrifugadas nas mesmas condições. Após três repetições consecutivas desse processo obtinha-se o concentrado de hemácias que era mantido sob refrigeração (4°C). A suspensão de trabalho era preparada num hematócrito de 50% no mesmo tampão e utilizada imediatamente após a preparação.

3.7.3. DETERMINAÇÃO DA CURVA DE HEMÓLISE INDUZIDA POR TFP

O ensaio hemolítico consistia na adição de 50 μL da suspensão de hemácias 50% (v/v) a 5 mL das amostras de trabalho e controles, resultando num hematócrito final de 0,5 %. Nas amostras de trabalho as hemácias foram adicionadas a tubos contendo concentrações crescentes de TFP (1-200 μM). As amostras de trabalho e controles permaneciam à temperatura ambiente (22-25°C) por 10 minutos antes de serem submetidas à centrifugação por dois minutos a 1.500xg, e o sobrenadante utilizado para determinação da hemoglobina (pico de absorção em 412nm). Foram feitas pelo menos 10 medidas para cada concentração de TFP, com os seguintes controles utilizados em triplicata: Controle 1 (C^1) →eritrócitos em PBS (controle de hemólise mecânica), Controle 2 (C^2) →eritrócitos em H_2O destilada (controle da hemólise total).

O efeito hemolítico (A_{412}^R) foi acompanhado medindo-se a concentração de hemoglobina no sobrenadante de acordo com:

$$A_{412}^R = \frac{A_a^{412} - A_{c1}^{412}}{A_{c2}^{412} - A_{c1}^{412}}$$

onde A_a^{412} , A_{c1}^{412} e A_{c2}^{412} são respectivamente as absorbâncias da amostra, do controle C_1 e do C_2 , em 412nm.

3.8. HEMÓLISE E BIOTRANSFORMAÇÃO DA TFP

3.8.1. PREPARO DAS AMOSTRAS

As amostras de trabalho eram constituídas de: SMH (em concentrações que variavam de 0,01 a 1 mg proteína microssomal / mL), em presença ou ausência de NAD(P)H (em concentrações equimolares às de TFP) e TFP (150-200 μ M).

As amostras controles eram as seguintes:

C_1 → eritrócitos em PBS (controle da hemólise mecânica).

C_2 → eritrócitos em H_2O destilada (controle da hemólise total).

C_3 → eritrócitos em PBS e TFP 150 μ M (controle da hemólise total induzida pela TFP).

Cada série experimental foi zerada contra um branco que continha SMH e cofator (NAD(P)H), nas mesmas concentrações que as amostras de trabalho e foram submetidas ao mesmo tratamento (tempo de incubação, temperatura, precipitação do SMH anterior ao ensaio hemolítico, etc.). A única diferença entre as amostras de trabalho e o branco era portanto, a presença de TFP.

3.8.2. ENSAIO HEMOLÍTICO

O ensaio hemolítico foi feito utilizando-se um hematócrito de 0,5 %, num volume final de 1 mL. As amostras de trabalho e controles foram homogeneizadas

cuidadosamente e mantidas à temperatura ambiente (22-25° C) por 10 minutos. Essas amostras foram então centrifugadas por dois minutos a 1.500xg e o sobrenadante utilizado para determinação da concentração de hemoglobina, pelo pico de absorção em 412nm.

O efeito hemolítico da TFP após as incubações com SMH era dado pela mesma relação utilizada para a curva hemolítica induzida pela TFP (item 3.7.3), sendo que neste caso a absorbância obtida no controle C₃ em 412nm pode ser utilizada em lugar da obtida no controle C₂, já que ambas representam os valores totais de hemólise.

O efeito protetor contra a hemólise mecânica após as incubações com SMH era dado pela seguinte relação:

$$(A_{412}^R)_M = A_a^{412} / A_{c1}^{412}$$

Onde A_a^{412} e A_{c1}^{412} correspondem respectivamente as absorbâncias da amostra de trabalho e do controle C₁ em 412nm.

3.8.3. CÁLCULO DA TFP RESIDUAL

Em alguns experimentos, após o ensaio hemolítico, as amostras eram ultracentrifugadas a 105.000xg por 1 hora para cálculo da concentração da TFP residual. O cálculo é feito por comparação com uma curva de calibração, de concentrações conhecidas de TFP em PBS, que se manteve linear nas concentrações utilizadas (1-200 µM). Observamos que, para os experimentos nos quais se utilizava como cofator NADH ou NADPH cuja absorção máxima encontra-se em 340 nm o cálculo da concentração residual de TFP (absorção máxima em 317 nm) tornava-se impossível devido a sobreposição espectral.

3.8.4. CÁLCULO DO COEFICIENTE DE PARTIÇÃO (P)

O coeficiente de partição (P) da TFP em microssoma / água, pH 7,4, foi calculado segundo a equação:

$$P = \frac{(n\text{TFP})_{mb} / V_{mb}}{(n\text{TFP})_a / V_a}$$

onde n é o número de moles de TFP e V é o volume da fase, mb e a correspondem, respectivamente, a fase apolar (membrana microssomal) e fase polar (aquosa). Obteve-se a concentração da TFP na membrana pela diferença entre a concentração em água (TFP residual) e a concentração inicial. O volume da fase apolar (V m) foi calculado assumindo que a densidade na membrana microssomal é igual a 1 g/mL e considerando que a massa de proteína na membrana corresponde a 70 % da massa da membrana microssomal (HIRD et alii, 1963).

3.9. EXPERIMENTOS COM O SOBRENADANTE PÓS MICROSSOMAL (SPM)

3.9.1. PREPARO DO SPM

Aliquotas de 0,5 mL de suspensão microssomal (item 3.6.2.) eram divididas em porções de 0,5 mL e estocadas em Nitrogênio líquido. Antes do experimento, uma porção era cuidadosamente ressuspensa em 5-10 mL de água destilada ou PBS 5mM, pH 7,4, e incubada por 20 minutos à temperatura ambiente, e então centrifugada a 105.000xg por 1 hora a fim de precipitar os microssomas. O sobrenadante era resguardado e o procedimento repetido por três ou quatro vezes até que a densidade óptica (máximo de absorbância observado em 258nm) e a concentração proteica indicassem o final da extração. A este sobrenadante proveniente do sistema microssomal hepático denominamos sobrenadante pós microssomal (SPM). Era feito um “pool” do SPM obtido das consecutivas precipitações que era então dialisado a 5 °C em solução de bicarbonato de amônia 5mM, pH 7,0, por 24 horas com duas trocas de 12 horas, sendo posteriormente liofilizado e mantido sob refrigeração. O “pool” do SPM somente era redissolvido em PBS no momento do uso.

3.9.2. DETERMINAÇÃO DA CONDUTIVIDADE

A condutividade do SPM foi medida em um Condutivímetro CDM2b e por um eletrodo Radiômetro CDC1104.

3.9.3. ANÁLISE POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE PRÓTONS (¹H-RMN)

O espectro de ^1H RMN do SPM total e suas frações foram analisados em um espectrômetro Bruker AC-200 pertencente ao Instituto de Química e Física de São . A frequência de ressonância era de 200 Mhz. Os espectros foram tirados em 22° C após pré-saturação na frequência de ressonância da água e utilizando-se DSS como padrão de referência.

3.9.4. ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DO SPM

O sobrenadante pós microsomal total (3,0 mg foi dissolvido em 150 μL de tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0) foi purificado no sistema APPS-LC 650 (Advanced Protein Purification System - Waters), usando-se uma coluna de exclusão molecular (SW 300 Protein Glass, Waters), previamente equilibrada com tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0. A corrida cromatográfica foi realizada em condições isocráticas, num fluxo constante de 0,1mL/minuto, sendo monitorada a 280 nm. As frações obtidas foram então recolhidas, dialisadas em solução de bicarbonato de amônio 5mM, pH7,0, liofilizadas e estocadas a -20°C até o momento do ensaio biológico.

3.9.5. ELETROFORESE DO SPM

O método utilizado foi o descrito por SHAGGER & JAGOW (1987) que utiliza géis de 16 x 10 cm (Might Small II SE 250). O gel de separação de 10% foi sobreposto por uma camada de gel de concentração de 4% de acrilamida. Foram utilizados dois tampões de corrida, o anódico (Tris-HCl 0,2 M, pH 8,9) e o tampão catódico (Tris 0,1M, Tricina 0,1M e SDS 0,1%, pH 8,3). A massa molecular aparente foi calculada por comparação com os seguintes padrões: albumina bovina (66 kDa), albumina de ovo (45 kDa), pepsina (34 kDa), tripsinogênio (24 kDa), β -lactoglobulina (18 kDa), lisozima (14 kDa) e citocromo C (12 kDa). A coloração utilizada foi a Comassie Blue.

3.9.6. ENSAIO HEMOLÍTICO COM O SPM

O teste de proteção hemolítica com o SPM bem como com as frações obtidas pela análise cromatográfica foi feito segundo o mesmo procedimento descrito para o ensaio hemolítico utilizando SMH (item 3.8.2.). Para todos os ensaios hemolíticos com o SPM e suas frações foi feito um tratamento estatístico que corresponde a análise de variâncias e o teste de comparações múltiplas de Tukey (OSTLE, 1973).

3.9.7. DETERMINAÇÃO DE RNA

O nível RNA foi determinado pelo método colorimétrico de determinação de ribose pelo reagente de Orcinol (BROWN, 1946).

4. RESULTADOS

4.1. TESTE DA ATIVIDADE MICROSSOMAL

4.1.1. CONSUMO DE OXIGÊNIO

Iniciamos os experimentos de atividade microssomal testando a capacidade do sistema microssomal hepático de catalisar reações de oxidação. Pode-se observar na FIGURA 1 que com a adição do cofator o SMH (1mg/mL) inicia um pequeno consumo de O_2 (6,38 ng átomo/min), este pequeno consumo deve-se provavelmente a oxidação de substratos endógenos presentes em baixas concentrações. Em seguida à adição do substrato Nifurtimox (290 μ M) observamos um aumento no consumo de O_2 correspondente a 15,2 ng átomo/min, até a exaustão de cofator e, neste momento, o consumo de O_2 caiu para 4,13 ng átomo/min. Com nova adição de NADPH (540 μ M) observa-se outro aumento no consumo de O_2 (equivalente a 37 ng átomo/min).

4.2. BIOTRANSFORMAÇÃO DA TFP

Existem duas maneiras de monitorar espectrofotometricamente a biotransformação da TFP pelas enzimas microssomais hepáticas: -pela diminuição da concentração da TFP (observada pelo máximo de absorbância da droga em 317 nm) (FIGURA 2) ou pelo consumo do cofator reduzido (NADPH ou NADH) (FIGURA 3) que têm o máximo de absorbância em 340 nm. Em ambos os casos pode-se acompanhar o aparecimento do pico de absorção característico do citocromo b5 reduzido em 424 nm, quando em presença de cofator.

O estudo cinético da transformação da TFP dependente de NADH pelo SMH, quando monitorado contra a própria suspensão microssomal, mostra (FIGURA 2) o consumo do cofator NADH (acompanhado pela diminuição da absorbância em 340 nm) e mostra também o deslocamento do pico de absorção da TFP em suspensão microssomal (em 317nm) antes de iniciada a reação (T_0) e após a biotransformação (exaustão do cofator, T_6). O aparecimento de um ombro em 300 nm, indica alteração estrutural da TFP em função do processo de biotransformação.

Alternativamente, a biotransformação da TFP pelo SMH pode ser monitorada indiretamente pelo consumo de NADH, observada quando a amostra é zerada contra

SMH e TFP (FIGURA 3). Pode-se observar que quando a concentração de NADH está bem diminuída ($T=6$) o citocromo b5 não se encontra mais na forma reduzida desaparecendo seu pico característico em 424 nm.

4.3. EXPERIMENTOS COM ERITRÓCITOS

4.3.1. DETERMINAÇÃO DA CURVA DE HEMÓLISE INDUZIDA PELA TFP

O efeito de TFP, hemolítico ou protetor, na estabilidade isosmótica de eritrócitos é apresentado na FIGURA 4. A TFP adicionada à suspensão de hemácias (0,5 %) causa proteção contra hemólise mecânica na faixa de 1-40 μM e induz hemólise concentração dependente na faixa que varia de 50-100 μM . As suspensões de eritrócitos com concentrações finais de TFP de 100-200 μM apresentaram hemólise total. A linha descontínua na FIGURA 4 em $A_{412}^R = 0$ mostra o limite abaixo do qual os valores de A_{412}^R na amostra são menores que os valores de hemólise em condição isosmótica, indicando a proteção dos eritrócitos pela TFP. Na linha descontínua em $A_{412}^R = 1$ o valor de hemólise na amostra é o mesmo que em água destilada, portanto, hemólise total.

O "inset" B na FIGURA 4 mostra o espectro da hemoglobina liberada após a incubação com diferentes concentrações de TFP contra o controle C_1 (eritrócitos em PBS) assim pode-se observar proteção contra a hemólise mecânica quando as concentrações de TFP são 20 e 40 μM (1 e 2, respectivamente) e indução hemolítica quando as concentrações de TFP são 50 e 60 μM (3 e 4, respectivamente).

4.3.2. HEMÓLISE E BIOTRANSFORMAÇÃO DE TFP

Num primeiro experimento amostras de SMH em diferentes concentrações (0,01, 0,1, 0,5 e 1,0 mg de proteína/mL) foram preparadas em PBS 0,5 mM. TFP (200 μM) foi adicionada simultaneamente com os eritrócitos (hematócrito 0,5% v/v). Depois de 10 minutos de incubação eritrócitos e microssomas foram separados por centrifugação. Os espectros de absorção óptica eram registrados contra os controles apropriados, após o ensaio hemolítico e após precipitação do SMH. A concentração de TFP residual no sobrenadante após o ensaio foi determinada como descrito em 3.8.3.

Os dados apresentados na FIGURA 5 mostram que o SMH protege eritrócitos contra a hemólise induzida pela TFP de maneira concentração dependente. Uma

proteção completa é vista nas concentrações 1,0 e 0,5 mg de proteína microsomal/mL. Nestes casos os valores de hemólise estão abaixo dos valores da hemólise mecânica. Na concentração 0,1 mg de proteína microsomal/mL há uma diminuição da hemólise induzida por TFP em quase três vezes (de 1,0 para 0,28 em A_{412}^R), e a concentração de TFP residual encontrada após a precipitação do SMH por ultracentrifugação é de 110 μM , o que seria suficiente para indução de hemólise total conforme demonstrado na FIGURA 4. Na concentração 0,01 mg de proteína microsomal/mL temos 150 μM de TFP^{RES} e 0,9 de A_{412}^R , ou seja, quase nenhuma proteção contra a hemólise induzida pela TFP é observada.

Utilizando o valor de TFP^{res} nas concentrações 0,5 e 1 mg proteína /mL (FIGURA 5) o coeficiente de partição (P) da TFP em microsoma / água, pH 7,4, foi calculado segundo a equação descrita no item 3.9.5. Assim, $P = 9950 \pm 100$.

Experimentos com o SMH e TFP em presença ou ausência de NAD(P)H foram feitos no sentido de elucidar a participação da biotransformação oxidativa induzida pelas enzimas P-450 nos processos hemolíticos induzidos pela TFP. A FIGURA 6 mostra um experimento em que amostras de SMH (0,01 e 0,1 mg de proteína/mL, respectivamente A e B) foram incubadas com TFP 170 μM em presença e em ausência de cofator (NADPH) em concentração equimolar a TFP. Os ensaios hemolíticos foram realizados no tempo zero (1) e após 150 minutos de incubação (2 e 3), sendo que em (3) o ensaio não continha NADPH. Após a precipitação dos eritrócitos registravam-se espectros contra os controles apropriados. Um controle adicional contendo NADPH e TFP (170 μM) em presença de eritrócitos (dados não mostrados) confirmou que a presença de cofator não interfere com o grau de hemólise induzido pela TFP.

Pode-se observar na FIGURA 6 que o conteúdo de hemoglobina livre diminui com o tempo de incubação (A_{412}^R em 1' > que em 2' e em 3') e que este efeito (proteção contra hemólise) é maior em presença de NADPH (A_{412}^R em 3 > que em 2) e ainda que o valor de A_{412}^R (% de hemólise) depende da concentração de SMH (hemólise em A > B).

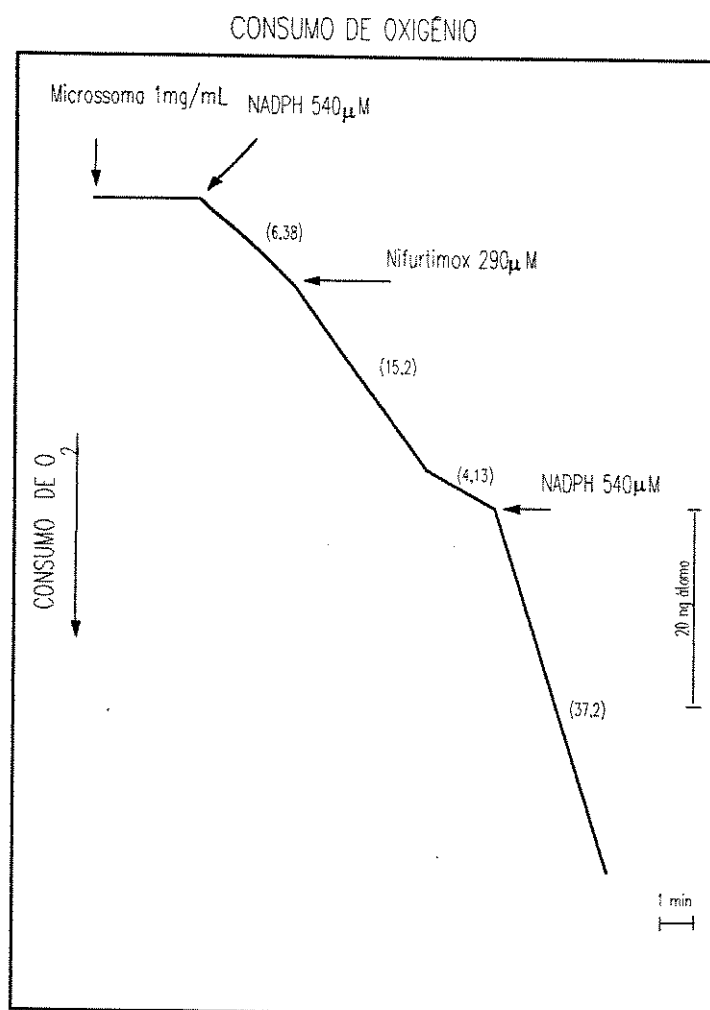


FIGURA 1: CONSUMO DE O₂ PELO SMH NA BIOTRANSFORMAÇÃO DE NIFURTIMOX. SMH (1mg/mL) contendo 1 μ M de citocromo P-450 e 1 μ M de citocromo b5. A reação foi iniciada pela adição de NADPH (540 μ M), seguida da adição do substrato Nifurtimox (290 μ M) e nova adição de cofator.

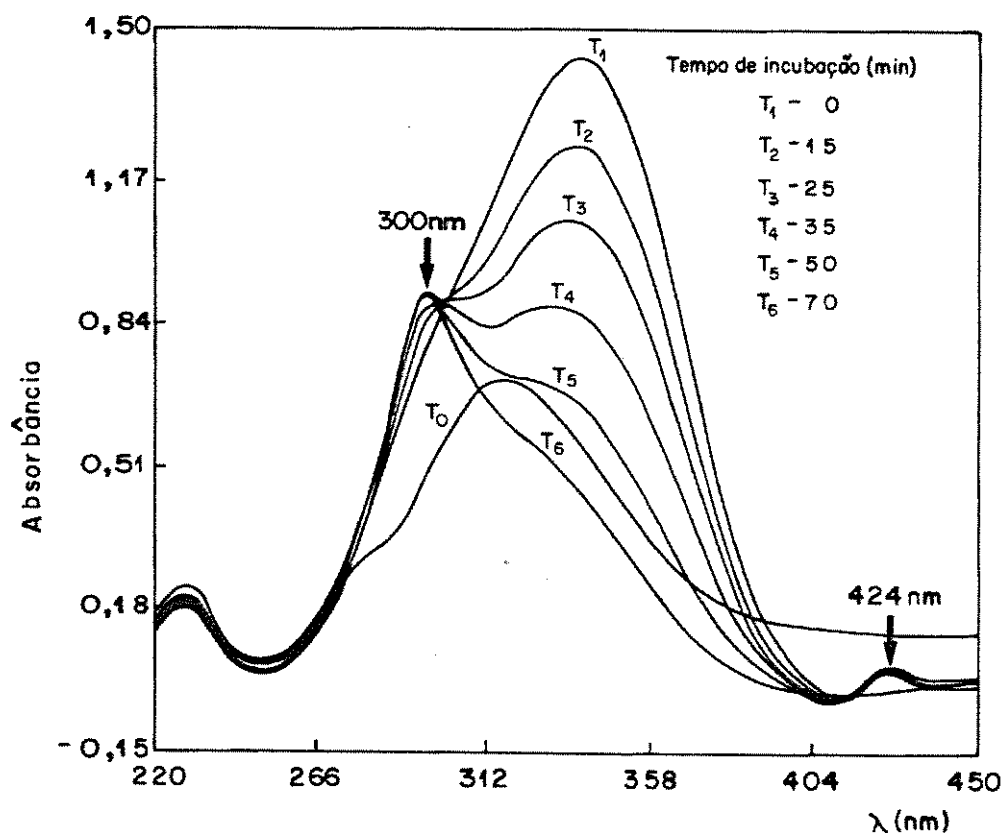


FIGURA 2: BIOTRANSFORMAÇÃO DA TFP PELO SMH. Espectro UV-Visível da mistura contendo concentrações equimolares de NADH e TFP ($200 \mu\text{M}$) acompanhados em função do tempo. T_0 corresponde a adição de TFP, T_1 corresponde a adição de NADH (início da reação cinética) e T_2 , T_3 , T_4 , T_5 e T_6 correspondem à espectros registrados em diferentes intervalos de tempo (15, 25, 35, 50 e 70 minutos) sem qualquer adição. SMH (1mg/mL) contendo citocromo P-450 e b5 ($0,8 \mu\text{M}$). Temperatura de incubação = 37°C , pH 7,4.

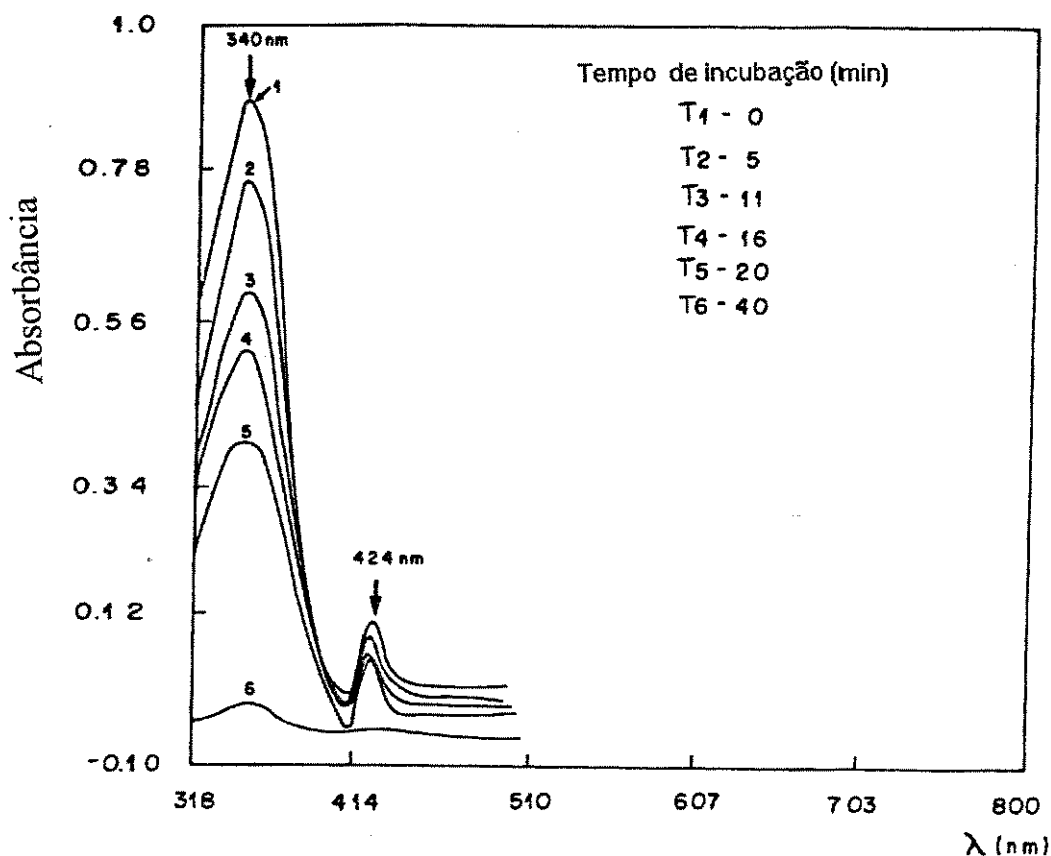


FIGURA 3: CONSUMO DE NADH DURANTE A BIOTRANSFORMAÇÃO DA TFP. Espectro UV-Visível do sistema microssomal contendo concentrações equimolares de NADH e TFP (200 μ M) zerada contra a SMH e TFP em diferentes intervalos de tempo. SMH (1mg/ml) contendo citocromo P-450 e b5 (0.8 μ M). Temperatura de incubação 37 °C, pH 7,4.

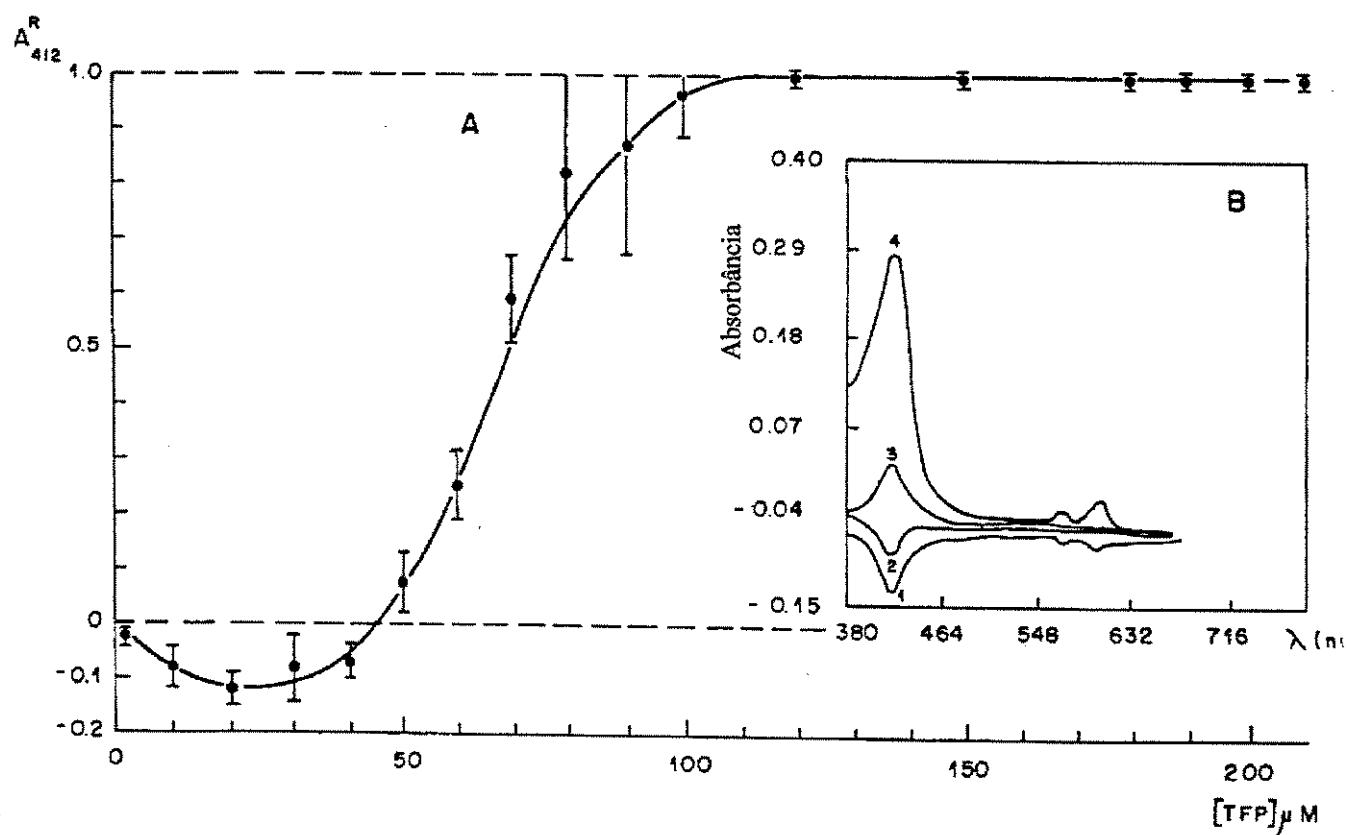


FIGURA 4: A) AÇÃO PROTETORA ($A_{412}^R < 0$) E HEMOLÍTICA DA TFP ($A_{412}^R > 0$) EM CONDIÇÃO ISOTÔNICA: suspensão de eritrócitos 0,5% (v/v) em PBS, pH 7,4; medidas por A_{412}^R . B) Espectro dos sobrenadantes após precipitação dos eritrócitos registrados contra eritrócitos em PBS em ensaio hemolítico contendo TFP nas seguintes concentrações: 20; 40; 50 e 60 μM . Observa-se proteção nas amostras 1 e 2 (20 e 40 μM de TFP respectivamente) e indução hemolítica na amostra 3 e 4 (respectivamente 50 e 60 μM de TFP). Temperatura ambiente, incubação 10 minutos, pH 7,4.

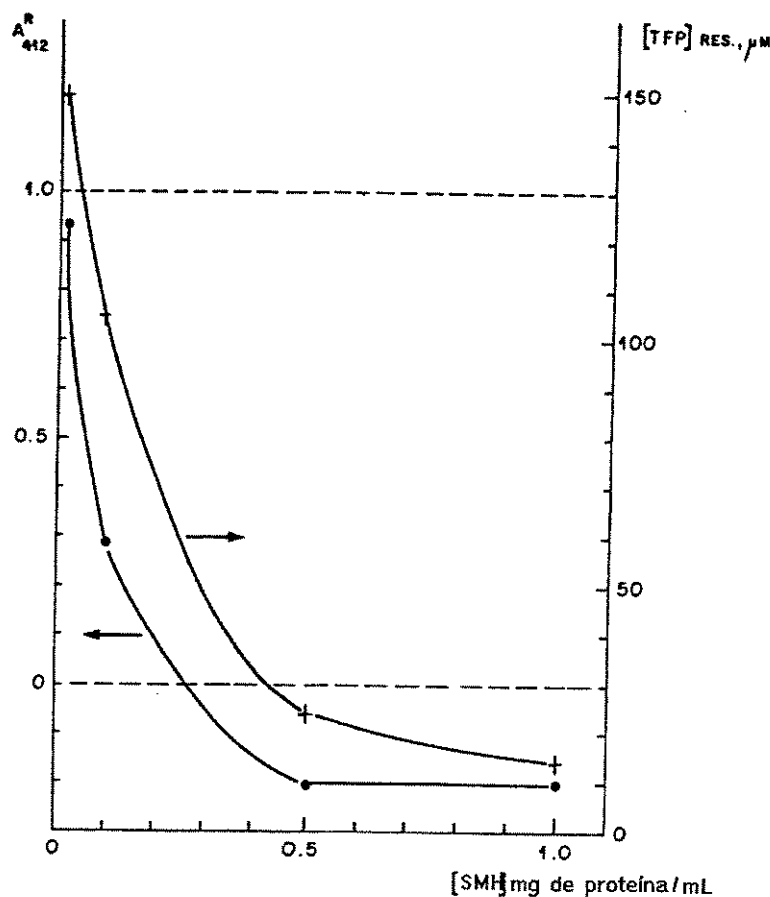


FIGURA 5: PROTEÇÃO HEMOLÍTICA PELO SMH. Proteção de eritrócitos contra hemólise induzida por TFP em presença de SMH (A^R_{412}) (•) e concentração residual de TFP ([TFP]RES (+)). Eritrócitos adicionados a concentrações crescentes de SMH em presença de TFP 200 μM . As linhas quebradas em $A^R_{412} = 0$ e 1,0 correspondem respectivamente aos valores da hemólise mecânica e da hemólise total. Temperatura ambiente, incubação de 10 minutos, pH 7,4.

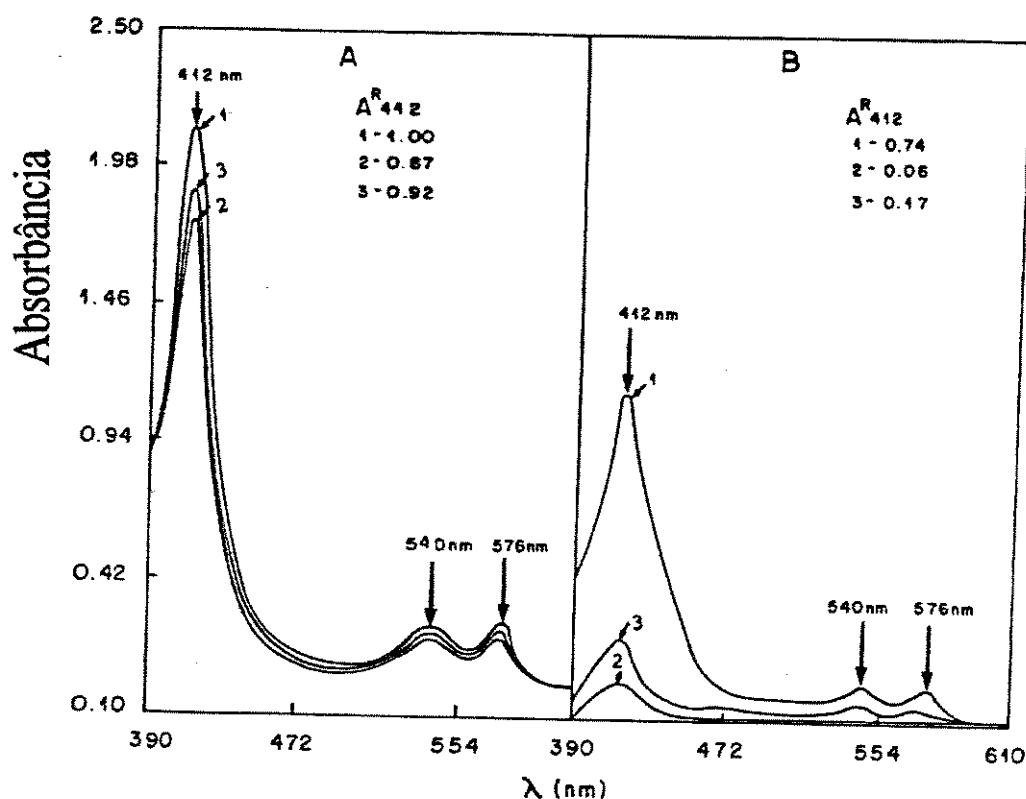


FIGURA 6: PROTEÇÃO HEMOLÍTICA PELA BIOTRANSFORMAÇÃO MICROSSOMAL. Espectro UV-Visível da Hb livre registrado após hemólise induzida por TFP em presença de SMH 0,01mg de proteína microssomal/mL (A) e 0,1 mg proteína microssomal/mL (B). Os espectros em 1, 2 e 3 representam a incubação de TFP com SMH em presença (1 e 2) ou em ausência (3) de NADPH nos tempos zero (1) e após 150 minutos de incubação (2 e 3). As concentrações de NADPH e TFP utilizadas foram equimolares (170 μ M). Os valores de A_{412}^R correspondem ao grau de hemólise após o ensaio. Temperatura 37° C, pH 7,4.

Outro experimento foi realizado utilizando sobrenadantes derivados dos seguintes procedimentos: TFP 200 μ M foi incubada por 30 minutos com suspensões de SMH em diferentes concentrações de proteína (0,01, 0,1, 0,5 e 1,0 mg / mL) em presença ou ausência de cofator. O SMH foi precipitado depois de cada pré-incubação por ultracentrifugação a 105.000xg por 1 hora. Os ensaios hemolíticos foram realizados nos sobrenadantes após a precipitação microssomal seguidos dos registros espectrais que permitiam o cálculo da concentração de TFP residual. Na FIGURA 7 estão apresentados os dados das concentrações residuais de TFP [TFP]^{RES} e da hemólise induzida por TFP em ausência de cofator. Não foi possível detectar [TFP]^{RES} em presença do NADPH devido à sobreposição espectral. Observa-se que o efeito protetor está aumentando e a concentração residual de TFP diminuindo em função do aumento de concentração de SMH. Na FIGURA 7 pode verificar-se que a concentração de TFP residual no sobrenadante, após a precipitação microssomal (0,5 e 0,1 mg de proteína / mL) permanece alta o suficiente para induzir um alto efeito hemolítico (70 μ M) em 0,5 mg de proteína/mL ou hemólise total (105 μ M) em 0,1 mg de proteína/mL (ver FIGURA 4).

4.4. CARACTERIZAÇÃO DO SPM

4.4.1. PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DO SPM

Sucessivas extrações do SPM foram feitas a partir de uma mesma preparação microssomal (item 3.9.1) e foram medidas as seguintes propriedades: pH, absorção óptica na região do UV-Visível (200-700 nm), condutividade. Os dados apresentados na FIGURA 8 revelam uma diminuição na concentração proteica e da absorbância em 258 nm para quatro consecutivas extrações aquosas. A condutividade do primeiro extrato aquoso foi de 130 ± 5 μ MHO e diminuía nos extratos consecutivos concomitantemente com a diminuição da absorbância em 258 nm e da concentração proteica (respectivamente 22,20 e 2,6 mg/mL no primeiro extrato). Os valores de condutividade da água desionizada, destilada e tampão fosfato 5mM, pH 7,4, foram respectivamente 1,5, 5,2 e 1200 μ MHO).

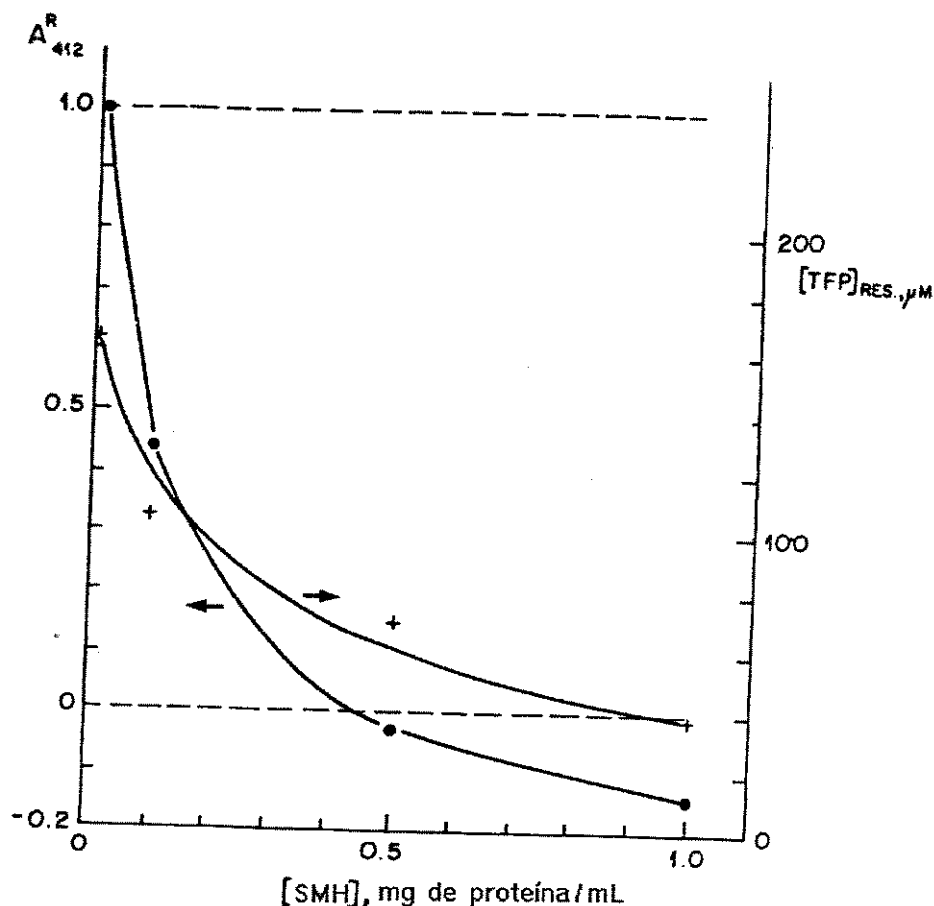


FIGURA 7: PROTEÇÃO PELO SOBRENADANTE PÓS MICROSSOMAL NA HEMÓLISE INDUZIDA PELA TFP. O efeito protetor do SMH (●) contra hemólise induzida por TFP 200 μM e a concentração residual de TFP (+) ambos no sobrenadante após precipitação microssomal. Condições: TFP adicionada à suspensão microssomal (0,01, 0,1, 0,5 e 1,0 mg de proteína / mL). Eritrócitos adicionados após a precipitação microssomal. Tempo de incubação = zero, temperatura ambiente, pH 7,4. As linhas quebradas em $A_{412}^R = 0$ e 1,0 correspondem respectivamente aos valores da hemólise mecânica e da hemólise total

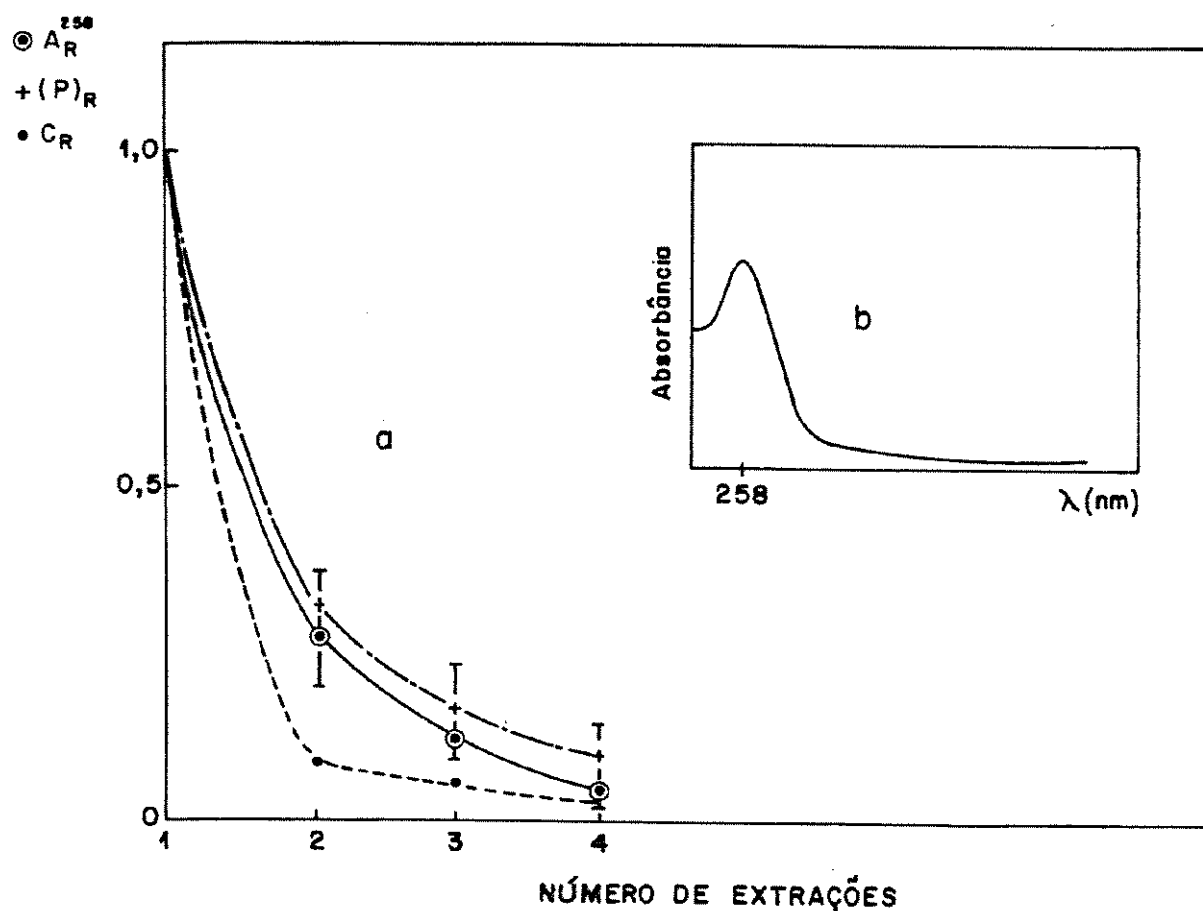


FIGURA 8: PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DO SPM. a) Absorbância 258 nm (●), concentração proteica (+) e condutividade (•) de quatro consecutivos sobrenadantes pós microssomais (SPM) em unidades relativas (razão dos valores obtidos para o primeiro extrato). b) Espectro óptico característico do SPM obtido em todas as extrações.

4.4.2. ANÁLISE DO SPM POR ^1H -RMN

Amostras de SPM liofilizadas foram dissolvidas em D_2O . Os espectros obtidos revelam picos de ressonância indicativos de proteínas e também de componentes de baixo peso molecular. Na FIGURA 9 temos o espectro de ressonância de prótons do SPM e pode-se observar entre 0,5 e 4,0 ppm os sinais de ressonância característicos para prótons alifáticos de proteínas e entre 5,0 e 8,5 ppm os sinais de ressonância de prótons aromáticos de proteínas. A região entre 4,5 e 5,0 ppm encontra-se distorcida devido a supressão de água residual por desacoplamento homonuclear. Além dos sinais de ressonância de proteína observam-se sinais de ressonância de prótons de substâncias de baixo peso molecular (de alta mobilidade) como os picos em 1,9 e 3,71 ppm.

4.4.3. ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DO SPM

Amostras liofilizadas de 2 a 4 mg de SPM foram dissolvidas em 200 μL de tampão fosfato 0,1M, pH 7,0. A coluna cromatográfica foi previamente calibrada com os seguintes marcadores de peso molecular: soroalbumina bovina (66 kDa), albumina de ovo (45 kDa), anidrase carbônica (29 kDa) e citocromo C (12,4 kDa). A separação cromatográfica por exclusão molecular revelou nove frações (FIGURA 10). A primeira fração foi eluída aos 17 minutos de corrida e representa 75 % do SPM com uma massa molecular de 161 kDa; a fração 3, eluída aos 26 minutos representa 5 % do peso total; a fração 5, eluída aos 32 minutos representa 6 % do peso total, com massa molecular de 66,9 kDa; e a fração 8, com cerca de 4 % do peso total, com tempo de retenção de 43 minutos. Todas as outras frações representavam menos de 1 % do total.

4.4.4. ELETROFORESE DO SPM E SUAS FRAÇÕES

No estudo do SPM foram feitas duas corridas eletroforéticas em gel de PAGE-SDS: uma com o SPM total (antes e depois da diálise) e outra com as frações de SPM. A FIGURA 11 mostra que não há diferença no perfil eletroforético do SPM em gel de PAGE-SDS antes e após a diálise. O SPM mostra um perfil molecular com proteínas de 10 a 70 kDa, com maior concentração de bandas proteicas de 15 a 35 kDa. Na FIGURA 12 temos o perfil eletroforético, em condições não dissociantes, das nove frações do SPM obtidas pela separação cromatográfica, bem como do SPM total. Observa-se que somente a fração 8 apresenta relativa homogeneidade molecular, com uma banda em 20 kDa. As frações 5 e 6 possuem uma banda majoritária de 36 e 18 kDa respectivamente, enquanto que as outras frações apresentam diversas bandas finas sem que nenhuma fosse mais expressiva que as demais.

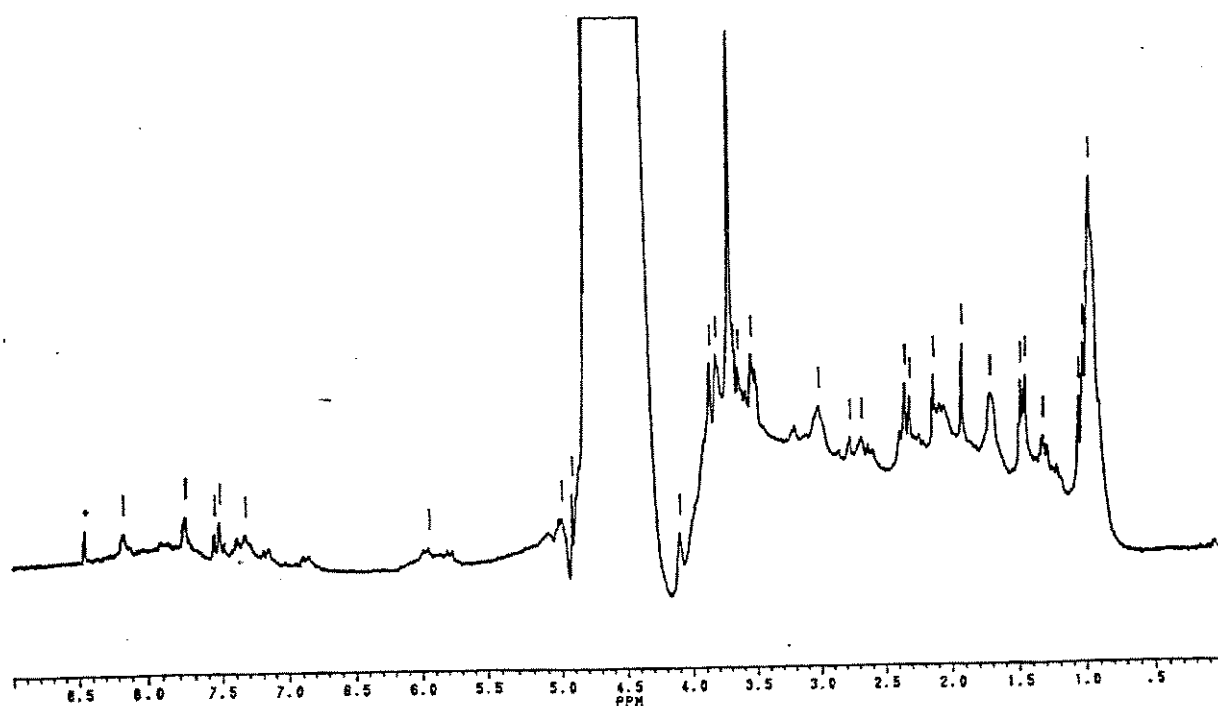


FIGURA 9: ESPECTRO DE ^1H -RMN DO SPM. Frequência de ressonância 200 a Mhz com pressaturação da ressonância da água. Padrão de referência = DSS. Janela de 2300 Hz, tempo entre pulsos 5,5 s, pulso = 2 μs , 16K, 304 transientes. Temperatura 22° C.

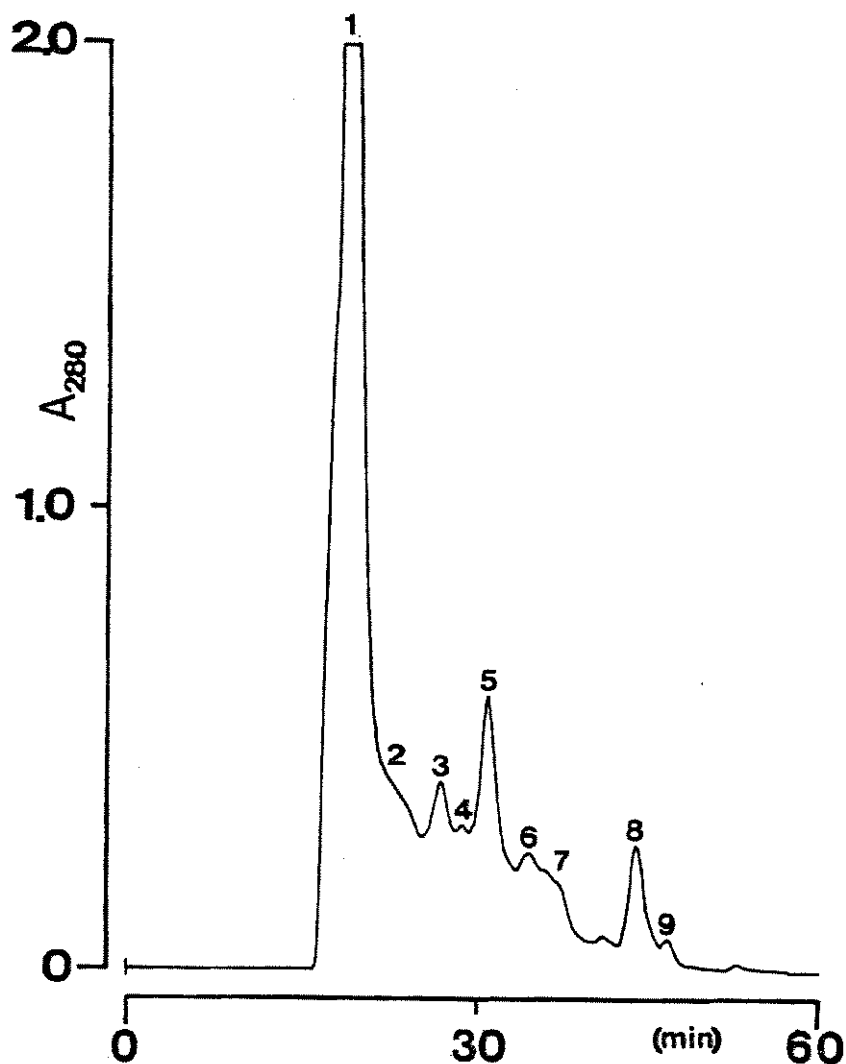


FIGURA 10: SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA DO SPM. Amostras de 2 a 3 mg dissolvidas em tampão fosfato 0,1M, pH 7,0, homogeneizadas e aplicadas na coluna de exclusão molecular 300 SW, fluxo de 1 mL/minuto. A absorbância foi monitorada em 280 nm revelando nove frações distintas.

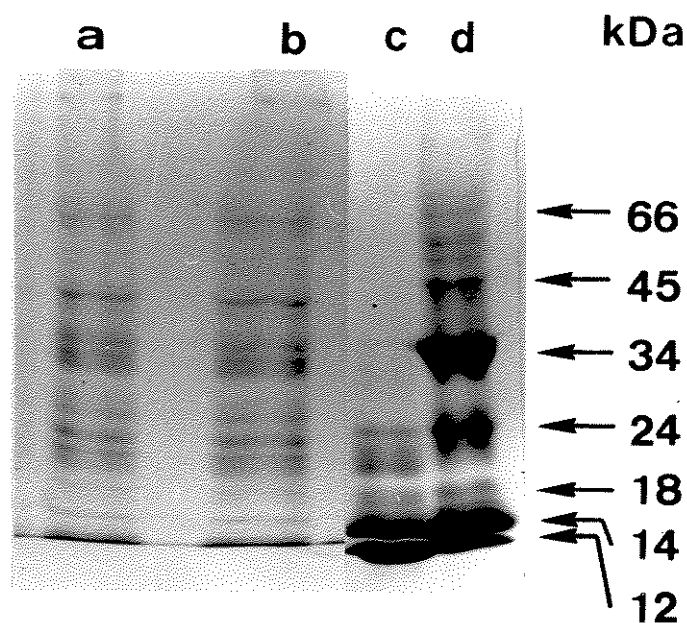


FIGURA 11: PERFIL DE MASSA MOLECULAR DO SPM: a) antes da diálise, b) após diálise, c) e d) marcadores de baixo e alto peso molecular: (citocromo C (12 kDa), lisozima (14 kDa), β -lactoglobulina (18 kDa), tripsinogênio (24 kDa), pepsina (34 kDa), albumina de ovo (45 kDa) e albumina bovina (66 kDa)). Volume final de aplicação em cada poço = 20 μ L de suspensão proteica (2 μ g/ μ L).

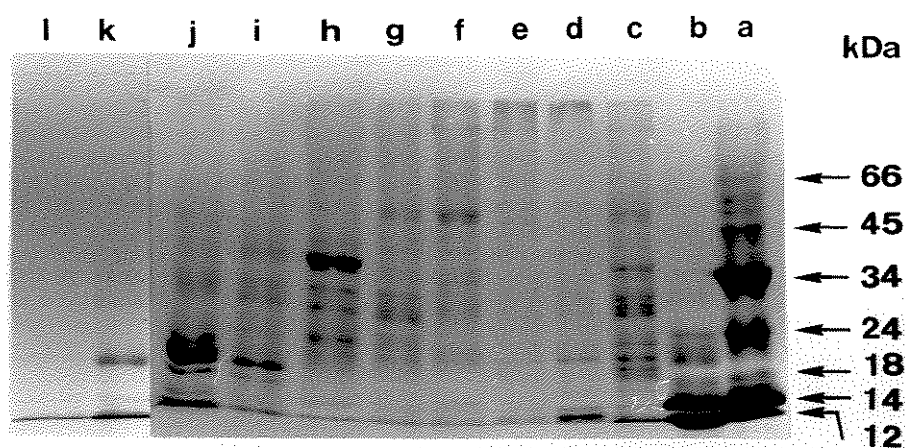


FIGURA 12: PERFIL DE MASSA MLECULAR DO SPM E SUAS FRAÇÕES: a) e b-) marcadores moleculares de alto e baixo peso, (albumina bovina (66 kDa), albumina de ovo (45 kDa), pepsina (34 kDa), tripsinogênio (24 kDa), β -lactoglobulina (18 kDa), lisozima (14 kDa) e citocromo C (12 kDa). c-) SPM total e de d-) a l-) as frações de 1 a 9 obtidas pela cromatografia de exclusão molecular. Volume final de aplicação em cada poço = 20 μ L de suspensão proteica (2 μ g/ μ L).

4.5. TESTE DE PROTEÇÃO HEMOLÍTICA COM O SPM

4.5.1. PROTEÇÃO CONTRA HEMÓLISE MECÂNICA

Os ensaios hemolíticos com o SPM, bem como com suas frações obtidas da análise cromatográfica, foram feitos em duas condições: condição isotônica (verificação da proteção contra hemólise mecânica) e em presença de TFP 150 μM (verificação da proteção contra hemólise total induzida por TFP).

Sucessivas diluições de SPM (absorbância em 258 nm variando de 0,05 a 10,0) em PBS foram utilizadas para o ensaio hemolítico. Na TABELA 1 temos os dados da proteção do SPM (total) em diferentes concentrações, contra a hemólise mecânica ($(A^R_{412})M$) de três ou quatro repetições independentes. Observa-se que o SPM em todas as diferentes concentrações utilizadas é capaz de proteger os eritrócitos contra hemólise mecânica (valor de $(A^R_{412})M < 1,0$), e que o valor médio de proteção é em torno de 40% para todos os casos ($(A^R_{412})M = 0,58 \pm 0,10$) tendo um coeficiente geral de variação (C.V.) de 15,3 %. Observa-se, no Teste de Tukey, que todas as médias são seguidas por letras iguais (B) significando que as medidas não diferem entre si ao nível de significância de 1%. Estes resultados indicam que a proteção do SPM à hemólise mecânica não varia com a concentração de SPM usada.

4.5.2. PROTEÇÃO CONTRA HEMÓLISE INDUZIDA PELA TFP

Sucessivas diluições de SPM (absorbância em 258 nm variando de 0,5 a 43,20) foram utilizadas para o ensaio hemolítico em presença de TFP (150 μM). A TABELA 2 apresenta os dados de proteção contra hemólise induzida por TFP (A^R_{412}) para diversas concentrações de SPM, em três repetições independentes. Observamos que, nas sucessivas diluições de concentração do SPM temos diminuição da proteção hemolítica (aumento dos valores de A^R_{412}). O Teste de Tukey aponta quatro grupos de dados (letras A, B, C e D), cujas médias diferem ao nível de significância de 1 %. Claramente indicando o efeito protetor, concentração dependente do SPM, na hemólise induzida por TFP. A FIGURA 13 mostra a variação do efeito protetor em função da concentração de SPM (regressão dos dados apresentados na TABELA 2) onde podemos observar que a hemólise (A^R_{412}) é inversamente proporcional a concentração do SPM (Abs 258 nm).

4.6. PROTEÇÃO DAS FRAÇÕES DO SPM CONTRA HEMÓLISE

4.6.1. PROTEÇÃO CONTRA HEMÓLISE MECÂNICA

As frações do SPM, obtidas pela análise cromatográfica, foram utilizadas para o ensaio hemolítico em condição isotônica (frações de SPM em PBS), na concentração de 60 μg de proteína. As frações obtidas em menores concentrações foram agrupadas (frações IV e V e frações VIII e IX). A TABELA 3 apresenta os dados do efeito protetor das frações do SPM contra hemólise mecânica ($(A^R_{412})M$) para três ou cinco repetições independentes. Observamos que, para todas as frações utilizadas, houve proteção contra hemólise mecânica ($(A^R_{412})M < 1,0$) e que o valor médio de proteção para as frações utilizadas está em torno de 35 % ($0,64 \pm 0,03$), com variação de 17,8 %. Segundo o Teste de Tukey realizado, as médias não diferem entre si (letras iguais) ao nível de significância de 1 %. A proteção das frações do SPM à hemólise mecânica não é, portanto, concentração dependente.

4.6.2. PROTEÇÃO CONTRA HEMÓLISE INDUZIDA PELA TFP

As frações do SPM, obtidas pela análise cromatográfica, na concentração de 60 μg de proteína, foram também utilizadas para o ensaio hemolítico em presença de TFP (150 μM). As frações obtidas em menores concentrações foram agrupadas (frações IV e V e frações VIII e IX). A TABELA 4 apresenta os dados do efeito protetor das frações do SPM contra a hemólise induzida pela TFP (A^R_{412}) de três a cinco repetições independentes. Observamos que, para todas as frações utilizadas, houve proteção contra hemólise ($A^R_{412} < 1,0$), e que o valor médio de proteção para as frações utilizadas está em torno de 35 % ($0,64 \pm 0,12$), com variação de 32,1 %. O Teste de Tukey realizado não aponta divergências entre as médias (letras iguais) ao nível de significância de 1 %.

Tendo conhecimento da natureza ribonucleoproteica do SPM, foi elaborado um ensaio hemolítico comparando três concentrações (30, 60 e 90 μg de proteína) de SPM com BSA e RNA nas mesmas concentrações. Observou-se proteção contra a hemólise mecânica somente nos ensaios feitos com o SPM ($(A^R_{412})M = 0,61 \pm 0,05$). Na análise estatística o Teste de Tukey indicou que a proteção média entre as três concentrações utilizadas de SPM não difere ao nível de significância de 1 %. Para BSA e RNA a proteção não foi verificada ($(A^R_{412})M$ próximo a 1,0). No Teste de Tukey não detectou diferenças, ao nível de significância de 1 %, entre as médias do RNA e BSA para as diferentes concentrações utilizadas (dados não mostrados).

TABELA 1- PROTEÇÃO DO SPM CONTRA HEMÓLISE MECÂNICA

Abs ²⁵⁸	(A ^R ₄₁₂) M				Média	Teste ^c Tukey	Vari- ância	C.V.% ^a
C ₁ ^b	1,0	1,0	1,0		-	A		
0,05	0,55	0,66	0,74		0,650	B	0,091	13,8
0,1	0,63	0,75	0,54	0,79	0,678	B	0,013	13,2
0,5	0,73	0,79	0,58	0,75	0,713	B	0,008	12,6
1,0	0,56	0,56	0,45		0,523	B	0,004	17,1
1,5	0,55	0,47	0,42	0,36	0,450	B	0,007	22,2
2,0	0,48	0,47	0,56		0,503	B	0,002	17,8
3,0	0,53	0,75	0,56		0,613	B	0,014	14,6
10,0	0,54	0,44	0,56		0,513	B	0,004	17,4
Total					0,580			15,3

^a C.V.%= coeficiente de variação; ^b C₁ = eritrócitos em PBS; ^cTeste de Tukey = médias seguidas de letras iguais não diferem quanto ao efeito protetor contra a hemólise mecânica. Condições: Hematócrito 0,5% (v/v), temperatura ambiente.

TABELA 2 - PROTEÇÃO DO SPM CONTRA HEMÓLISE INDUZIDA POR TFP (150 μ M)

Abs ²⁵⁸	A ^R ₄₁₂			Média	Teste ^c Tukey	Vari- ância	C.V.% ^a
C ₃ ^b	1,0	1,0	1,0	-	A		
0,5	0,890	0,630	0,860	0,793	B	0,020	8,6
1,0	0,490	0,630	0,640	0,587	B	0,007	11,7
2,0	0,300	0,250	0,360	0,303	C	0,003	22,6
3,0	0,160	0,140	0,280	0,193	CD	0,006	35,5
5,0	0,070	0,150	0,100	0,107	CD	0,002	64,3
10,0	0,017	0,009	0,016	0,014	D	0,00002	489,7
21,6	0,017	0,006	0,014	0,012	D	0,00003	557,3
43,2	0,003	-0,005	-0,008	-0,003	D	0,00003	2077,5
Total				0,251			27,4

^a C.V.% = coeficiente de variação; ^b C₃ = eritrócitos em presença de TFP 150 μ M. ^cTeste de Tukey = médias seguidas de letras iguais não diferem quanto ao efeito protetor contra a hemólise induzida por TFP. Condições: Hematócrito 0,5% (v/v), temperatura ambiente.

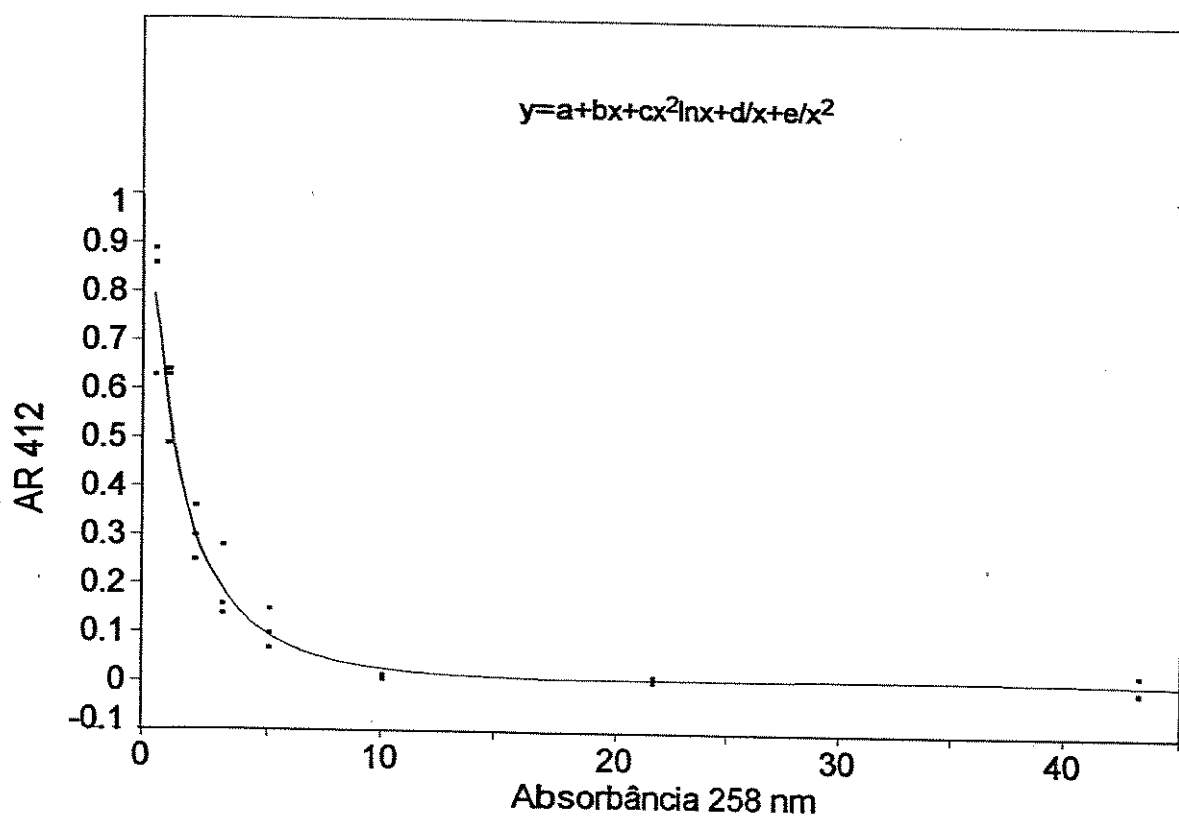


FIGURA 13: EFEITO PROTETOR CONCENTRAÇÃO DEPENDENTE DO SPM TOTAL CONTRA HEMÓLISE INDUZIDA PELA TFP (150 μ M). Hematócrito 0,5 % (v/v), temperatura ambiente.

TABELA 3 -PROTEÇÃO DAS FRAÇÕES DE SPM CONTRA HEMÓLISE MECÂNICA

Fração (60 µg de proteína)	(A ^R ₄₁₂)M					MÉDIA	TESTE ^c TUKEY	VARI- ÂNCIA	C.V.%
C ₁ ^b	1,0	1,0	1,0			-	A		
I	0,63	0,68	0,78	0,58	0,66	0,666	B	0,006	17,2
II	0,71	0,51	0,65	0,50	0,71	0,616	B	0,011	18,6
III	0,73	0,71	0,63			0,690	B	0,003	16,6
IV, V	0,79	0,44	0,57			0,600	B	0,031	19,1
VI	0,75	0,58	0,44	0,66	0,71	0,628	B	0,015	18,2
VII	0,78	0,66	0,48			0,640	B	0,023	17,9
VIII, IX	0,79	0,53	0,66	0,71		0,673	B	0,012	17,0
Total						0,644			17,8

^a C.V.%= coeficiente de variação; ^b C₁= eritrócitos em PBS. ^cTeste de Tukey = médias seguidas de letras iguais não diferem quanto ao efeito protetor contra a hemólise mecânica. Condições: Hematócrito 0,5 % (v/v), temperatura ambiente.

TABELA 4 - PROTEÇÃO DAS FRAÇÕES DE SPM CONTRA HEMÓLISE INDUZIDA POR TFP (150 μ M)

Fração (60 μ g de proteína)	A_{412}^R					Média	Teste ^c TUKEY	Vari- ância	C.V.%
C ₃ ^b	1,0	1,0	1,0			-	A		
I	0,22	0,23	0,58	0,82	0,51	0,472	B	0,0641	42,9
II	0,56	0,78	0,85	0,88	0,70	0,754	B	0,0166	26,8
III	0,33	0,55	0,76			0,547	B	0,0462	37,0
IV, V	0,57	0,86	0,67			0,700	B	0,0217	28,9
VI	0,44	0,86	0,46	0,41	0,72	0,578	B	0,0402	35,0
VII	0,79	0,83	0,79			0,803	B	0,0005	25,2
VIII, IX	0,24	0,58	0,82	0,85		0,623	B	0,0796	32,5
Total						0,640			32,1

^a C.V.%= coeficiente de variação; ^b C₃= eritrócitos em presença de TFP (150 μ M); ^cTeste de Tukey = médias seguidas de letras iguais não diferem quanto ao efeito protetor contra a hemólise induzida por TFP. Condições: Hematócrito 0,5 %(v/v), temperatura ambiente.

5. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho demonstram que as suspensões microssomais preparadas estão aptas a realizar reações de oxidação, quando em presença de cofator e substratos adequados, conforme demonstrado pelos experimentos do consumo de O_2 . A presença de cofator é essencial para o estabelecimento das reações de oxidação catalisadas pelo citocromo P-450 pois é ele que fornece elétrons para redução do ferro do grupo prostético do citocromo permitindo então a ligação do O_2 . Assim, imediatamente após a adição de cofator (FIGURA 1) o oxigênio começa a ser consumido. Nestes primeiros experimentos o Nifurtimox (4-[5-nitrofurfurilidenoamino]-3-metiltiomorfolina-1,1-dióxido) foi utilizado como substrato, por pertencer a uma classe de compostos nitrogenados heterocíclicos em que é conhecida a predominância das reações oxidativas de biotransformação pelo sistema P-450 microssomal (KEDDERIS & MIWA, 1988).

A biotransformação da TFP foi estudada em presença de NADH. No resultado apresentado na FIGURA 2 podemos observar que há sobreposição do espectro de TFP (pico em 317nm, T_0) com aquele do cofator (pico em 340 nm, T_1). Como a oxidação do NADH pode ser monitorada pela oxidação do citocromo b5 (424 nm), observamos que em função do tempo e, portanto, da biotransformação, em T_6 não há mais cofator reduzido, pois o pico de absorção do citocromo b5 reduzido desaparece completamente. O que observamos na região de sobreposição é o produto (ou produtos) da biotransformação da TFP, já que há um deslocamento para o azul do pico de absorção da TFP, de 317 para 300 nm.

As reações de biotransformação da TFP pelo SMH, evidenciadas tanto pela observação direta do deslocamento do pico de absorção da TFP (FIGURA 2) como pelo decréscimo do pico do cofator NADH (FIGURAS 2 e 3) foram realizadas com concentrações equimolares de substrato e cofator. Isso provavelmente limita a velocidade das reações por insuficiência de cofator, uma vez que para cada molécula de substrato, duas moléculas de NAD(P)H são oxidadas (PETERSON & PROUGH, 1986). A razão de utilizarmos concentrações de cofator limitantes é um requerimento prático, pois para podermos evidenciar a biotransformação de TFP precisamos ter concentrações de NADH menores que a concentração do produto formado já que os espectros de TFP e NADH se sobrepõem. O fato de limitarmos a reação antes que toda

TFP tenha sido transformada pode ser evidenciado pelo caráter isosbético do espectro de absorção da FIGURA 2.

Ambos os fatos: a oxidação do NADH e do citocromo b5, acompanhando a biotransformação da TFP, representam forte evidência do envolvimento do sistema redox citocromo-P-450-dependente nesse processo.

Estudamos o efeito da TFP na resistência de eritrócitos de ratos à hemólise. Os dados da curva hemolítica induzida pela TFP (FIGURA 4) revelam que na faixa de 1-40 μM a TFP causa proteção contra hemólise mecânica enquanto que acima de 50 μM a indução de hemólise ocorre. Esses dados estão de acordo com os obtidos por SEEMAN & WEINSTEIN (1966) e por SEEMAN (1972) que mostraram que os fenotiazínicos, em concentrações que variam de 10-100 μM , produzem proteção hemolítica quando adicionados a suspensões de eritrócitos em condição hiposmótica. Nesta mesma faixa de concentração, a TFP induz um aumento dose-dependente na liberdade de rotação de marcadores de spin ligados a membranas de eritrócitos intactos, e é capaz de eliminar a transição térmica da proteína 4,1 (MINETTI & DI STASI, 1987). Uma outra correlação entre concentração de fenotiazínicos e atividade biológica, caracterizando a propriedade bifásica dos efeitos pode ser vista na habilidade da TFP em proteger mitocôndria contra danos. Entre 15 e 33 μM , a TFP protege mitocôndrias de fígado de rato contra os efeitos deletérios de Ca^{2+} e prooxidantes, enquanto em concentrações maiores que 100 μM a droga potencializa o efeito deletério na membrana mitocondrial interna (PEREIRA & VERCESI, 1992). Os autores desses trabalhos (MINETTI & DI STASI, 1987; PEREIRA & VERCESI, 1992), concordam que os efeitos da TFP em eritrócitos e na mitocôndria devem-se a sua incorporação e interação com proteínas dessas membranas.

Uma razoável explicação para o efeito bifásico da TFP refere-se à observação que, para concentrações maiores que 50 μM foi notada uma agregação anfifílica da droga (SPINEDI, et alii 1992). Esta observação permite admitirmos a possibilidade da TFP interagir com membranas biológicas de duas maneiras diferentes, a primeira enquanto monômero (concentrações de TFP < 50 μM) e a outra enquanto agregado (concentrações de TFP > 50 μM) resultando nos diferentes fenômenos acima descritos.

O efeito da TFP na hemólise de eritrócitos foi estudada na presença de microsossomos. Os resultados apresentados na FIGURA 5 demonstram a diminuição de

concentração residual de TFP em função do aumento da concentração de SMH, sugerindo a incorporação e ou a biotransformação da droga pelo sistema microssomal.

Considerando a natureza anfipática da TFP e que o SMH nada mais é que retículo endoplasmático (AMAR-COSTESSEC et alii, 1969), podemos entender a alta partição obtida, ou seja, a concentração de TFP livre (TFPres) após a incubação com 1 mg/mL do SMH chega a praticamente 10 % da concentração inicial (FIGURA 5). O coeficiente de partição da TFP em microssoma / água, pH 7,4, = 9950 ± 100 , calculado conforme descrição do item 3.8.4, pelos dados obtidos na FIGURA 5. Isto demonstra que a TFP distribui-se muito bem no SMH sem que isso signifique que haja necessariamente biotransformação da TFP, já que neste caso não fornecemos cofator para disparar o processo oxidativo. Poderíamos contar talvez com a biotransformação de uma pequena porção de TFP pelo SMH que utilizaria cofator endógeno, mas neste caso o processo deveria ocorrer em pequena escala devido a baixa concentração de cofator endógeno presente no preparo microssomal (TATARSKAYA & DEGTEREV, 1988).

O alto valor de P por nós encontrado e que reflete a preferência da droga pelo ambiente apolar está de acordo com outros dados da literatura: MARROUM & CURRY, 1993 descrevem a interação da droga com vários sistemas biológicos conferindo a esta droga uma ação terapêutica variada (atividade antipsicótica, neuroléptica, antidopaminérgica, anticolinérgica, antihistamínica, antiemética e antiadrenérgica). Esses mesmos autores calcularam o coeficiente de partição da TFP (definido como a razão molar de TFP entre as fases apolar e polar) em hexano/tampão fosfato (pH 7,4) e em eritrócitos, respectivamente 193 ± 32 e 5,53 e o coeficiente de ligação em proteínas nas células vermelhas (82,3 %). PEREIRA & VERCESI, 1992; decreveram a ação da TFP sobre a membrana mitocondrial, enquanto que a interação da TFP com a membrana de eritrócitos vem sendo extensivamente estudada (LIEBER et alii, 1984; LUXNAT & GALLA, 1986; MINETTI & DI STASI, 1987; ZACHOWSKI & DURAND, 1988; SPINEDI et alii, 1992; THOMPSON et alii, 1993; RUGGIERO, 1994 entre outros).

A participação da biotransformação no efeito hemolítico da TFP é mostrado na FIGURA 6. Trabalhando com concentrações pequenas de SMH (0,01 e 0,1 mg de proteína/mL), as quais permitem que apenas parte da TFP esteja particionada na membrana; após um período de equilíbrio entre as concentrações de droga no meio aquoso e na membrana podemos observar indiretamente a ação do SMH em presença

de cofator pela diminuição do efeito hemolítico da TFP. A retirada de TFP (diminuição da concentração de TFP capaz de produzir hemólise) pela biotransformação que somente ocorre em presença de cofator é um processo que contribui menos significativamente que a retirada de TFP em presença somente do SMH. Assim, a proteção contra hemólise induzida por TFP, observada em presença de SMH nas condições utilizadas, deve-se mais muito à partição da bastante anfipática droga na membrana microssomal do que pela biotransformação da mesma.

Na FIGURA 7 podemos verificar que, mesmo após a precipitação do SMH e incubação com o sobrenadante aquoso somente, a proteção hemolítica continua ocorrendo. Este fato nos leva a assumir a possibilidade de que não somente o próprio sistema microssomal mas também que uma fração solúvel, presente no sobrenadante, derivada ou não do sistema microssomal, pode ser responsável pela proteção hemolítica encontrada. Considerando que a fração microssomal representa, em sua grande parte, uma vesiculação do retículo endoplasmático do hepatócito, pesquisamos a presença de dois grandes componentes do retículo: proteína e RNA. Enquanto $48 \pm 2\%$ do SPM extraído correspondia a proteína, cerca de $24 \pm 4\%$ correspondia a RNA. Estes dados estão de acordo com os encontrados na literatura (ADELMAN et alii, 1973; AMAR-COSTESEC et alii, 1969) que descrevem a concentração de proteína e RNA como respectivamente 40 e 20 % em preparações hepáticas após a precipitação microssomal.

Nos experimentos mostrados na FIGURA 8 podemos ver uma diminuição na absorbância em 258 nm obtida nos sucessivos extratos, bem como uma diminuição na concentração proteica e na força iônica. Na primeira lavagem do microssoma remove-se provavelmente, contaminantes citossólicos ou ainda fragmentos solúveis da própria membrana microssomal que absorvem em 258 nm e que precipitam com a fração microssomal mas não estão fortemente ligados à mesma. Já nas lavagens sucessivas há cada vez menos contaminantes para extrair. GRAM (1974) mostrou que, sob certas condições, ribossomos ligados à membrana podem ser removidos sem influenciar a composição ou morfologia das vesículas de membrana. Assim certas substâncias como: EDTA, pirofosfato, citrato, ribonuclease, lítio 4M ou tripsina podem resultar em uma quase completa perda de RNA ligado a membrana, com concomitante formação de vesículas de superfície lisa. Em nosso caso temos EDTA (0,1 mM) presente no tampão de preparo de microssomas, além de da ribonuclease endógena, que poderiam estar atuando sobre os ribossomos presentes no SMH, liberando-os, promovendo, assim, a presença de RNA e proteína no SPM.

O espectro de ^1H -RMN (FIGURA 9) concorda com a hipótese de composição do SPM indicando picos típicos de proteínas, mas também picos isotrópicos, relativos a moléculas de baixo peso molecular.

O conteúdo proteico total no SPM era $20,9 \pm 2,8$ % da proteína total presente no sistema microssomal inicial. O SPM tem componentes de peso molecular de até 60 kDa (FIGURA 11). A separação cromatográfica feita em uma coluna de exclusão molecular 300 SW, resultou em 9 frações independentes (FIGURA 10). Essa separação preliminar fornece frações de diferentes pesos moleculares que quando submetidas à análise eletroforética (FIGURA 12) mostram uma heterogeneidade de bandas proteicas em cada fração (com exceção das frações 8 e 9), características de material não purificado. Como a proteção hemolítica foi observada para todas as nove frações não se pode atribuir a proteção contra hemólise especificamente a nenhum das bandas encontradas no perfil eletroforético.

Os ensaios hemolíticos com o SPM total bem como com suas frações permitiram a verificação da proteção contra hemólise mecânica (ensaios realizados em presença de tampão isotônico - PBS) e a verificação da proteção contra hemólise induzida pela TFP (TFP $150 \mu\text{M}$ em PBS).

Observamos que a proteção do SPM em relação a hemólise mecânica ocorre de uma maneira uniforme ($((A^{R_{412}})_M) = 0,58 \pm 0,09$) nas concentrações de SPM utilizadas (Abs^{258} de 10 a 0,05). As médias são consideradas iguais ao nível de significância de 1 % pelo Teste de Tukey (ver TABELA 1). Levando em consideração a grande faixa de concentração utilizada e a uniformidade de resultados podemos considerar que a proteção contra a hemólise mecânica promovida pelo SPM ocorre de modo independente da concentração de SPM. O coeficiente de variação entre os tratamentos é bastante próximo ao coeficiente de variação geral (15,29 %) o que significa que existe uniformidade experimental, ou ainda que um eventual erro experimental se repete para todos os tratamentos. Isto pode ser explicado pelo fato de estarmos tratando de medidas que têm um valor absoluto muito pequeno (a hemólise mecânica corresponde a 5 a 10 % da hemólise total, ou seja, Abs^{412} de 0,09 - 0,18) o que poderia contribuir com o erro experimental refletindo nos valores estatísticos acima apresentados. Além disso estamos tratando de experimentos independentes, ou seja, são diferentes extrações do SPM e diferentes soluções de hemácias empregadas nos testes hemolíticos o que poderia adicionar variações aos resultados apresentados.

Na proteção do SPM contra a hemólise induzida pela TFP (TABELA 2) temos variação na hemólise em função das concentrações de SPM utilizadas, o que pode ser também observado na FIGURA 13, além de ser evidenciada na análise estatística apresentada (identificação de quatro grupos distintos de médias pelo Teste de Tukey). Além disso temos um coeficiente de variação médio de 27,39 % mas que varia grandemente para cada média apresentada o que sugere que a variação dos resultados não é reflexo de um erro experimental mas sim uma variação em função da concentração de SPM.

É necessário diferenciar-se a natureza do fenômeno ao qual denominamos de hemólise quanto a sua etiologia para entender o fenômeno de proteção hemolítica observada. Quando citamos a hemólise mecânica referimo-nos a hemólise induzida mecanicamente durante a preparação dos eritrócitos (três lavagens e três centrifugações consecutivas em PBS, 4 °C, por 10 minutos, a 700 x g) e que representa de 5 a 10 % da hemólise total induzida por água destilada ou por TFP $\geq 100 \mu\text{M}$ e quando citamos a hemólise induzida por TFP nos referimos a hemólise causada pela interação da TFP com a membrana do eritrócito. É esperado que um sistema capaz de proteger os eritrócitos o faça diferentemente para cada situação acima descrita se considerarmos a diversidade do processo hemolítico em cada um dos casos.

Nos ensaios hemolíticos realizados com as frações do SPM (TABELA 3) observamos que, em condição isotônica, existe uma proteção contra a hemólise mecânica invariante que é observada em todas as frações $((A^R_{412})M) = 0,64 \pm 0,03$ considerando-se a concentração de SPM utilizada (60 μg de proteína). Na análise estatística o Teste de Tukey (médias não divergentes ao nível de significância de 1 %) indica que os resultados mantêm-se os mesmos, independentemente da fração utilizada.

A preparação das frações do SPM levou-nos a um problema de ordem técnica: as frações após a cromatografia eram liofilizadas e somente reidratadas no momento do uso. Após a reidratação obtinhamos um material bastante insolúvel. Considerando as limitações exigidas pelo ensaio hemolítico posterior, não utilizamos os coadjuvantes tradicionais para solubilização do material (detergentes, aquecimento, sonicação...). O único recurso utilizado por nós foi a diluição até a concentração de 60 μg de proteína, o que aumentava um pouco a solubilidade; mesmo com esta concentração baixa não obtivemos soluções

verdadeiras. Os ensaios hemolíticos, bem como o teste de Lowry para a determinação proteica ficaram, portanto, prejudicados pela natureza não homogênea da suspensão, que certamente aumenta o erro experimental, o que poderia levar a um aumento do coeficiente de variação dos resultados. Mas como a proteção hemolítica em condição isotônica parece não depender da concentração de SPM (TABELA 3) esta possível variação na concentração de proteína não deveria alterar os resultados encontrados. O coeficiente de variação geral para todas as frações foi em torno de 17 %, mesmo valor obtido para o coeficiente de variação geral da TABELA 1 (SPM total) o que sugere a manutenção de um mesmo (pequeno) erro experimental. Nesse caso o erro experimental deve ser causado por estarmos medindo valores de absorbância muito pequenos, acoplado ao fato de tratarmos de experimentos independentes, assim como nos ensaios feitos com o SPM total.

Se comparamos a proteção contra a hemólise mecânica obtida pelo SPM (TABELA 1) e por suas frações (TABELA 3) podemos verificar que os valores médios de $(A_{412}^R)M$ são praticamente os mesmos ($0,58 \pm 0,10$ para o SPM total e $0,64 \pm 0,03$ para as frações). Assim apesar da cromatografia ter separado o SPM em porções menores de acordo com seu peso molecular, a propriedade de proteção contra a hemólise mecânica permanece inalterada.

Nos ensaios hemolíticos realizados com as frações do SPM (60 μ g de proteína, TABELA 4) observamos que em presença de TFP existe uma proteção invariante contra a hemólise que é observada em todas as frações ($A_{412}^R = 0,64 \pm 0,12$). A análise estatística mostrou que as médias de proteção para cada fração não diferem entre si. A proteção média obtida pelas frações na concentração de 60 μ g de proteína foi de $A_{412}^R = 0,64 \pm 0,12$, isto é, próxima das médias obtidas pelo SPM total nas duas menores concentrações utilizadas ($Abs^{258} = 1,0$ e $0,5$) $A_{412}^R = 0,79 \pm 0,14$ e $0,58 \pm 0,08$ respectivamente (TABELA 20). A baixa solubilidade das frações pós microsomais deve ter contribuído para o aumento do coeficiente de variação da TABELA 4. Nesse caso o efeito protetor é concentração dependente e temos uma maior variação nos resultados.

Tem sido descrito que a TFP pode ligar-se à lipoproteínas plasmáticas (VERBEECK et alii, 1983) tanto quanto com proteínas da membrana de eritrócitos (MARROUM & CURRY, 1993) e ainda com proteínas mitocondriais (PEREIRA & VERCESI, 1992). Em recentes estudos feitos neste laboratório,

RUGGIERO (1994) descreve, pela técnica de RPE, alterações estruturais e dinâmicas em membrana de eritrócitos quando em presença de TFP e também a supressão de fluorescência dos resíduos de triptofano de membranas eritrocitárias em presença de TFP, demonstrando assim a interação da droga com a porção proteica da membrana. Uma vez que a TFP é capaz de ligar-se à proteínas concluímos que a proteção do SPM contra a hemólise induzida por TFP (TABELAS 2 e 4) deva-se a uma diminuição da concentração da droga livre a níveis inferiores aos da concentração lítica devido à ligação da TFP com proteínas ou ribonucleoproteínas presentes no citoplasma do hepatócito, ou àquelas que foram removidas da membrana microsomal.

No ensaio hemolítico comparativo entre SPM, BSA e RNA novamente a propriedade protetora do SPM contra hemólise mecânica manteve-se em torno de 49 %, considerada não variando segundo a análise estatística, para as três concentrações utilizadas (30, 60 e 90 μ g de proteína). Mais uma vez a proteção contra hemólise mecânica pelo SPM não foi alterada pela variação da concentração do SPM. Este teste comparativo teve o intuito de verificar se a proteção contra a hemólise mecânica observada não poderia ser decorrente de estarmos diminuindo a superfície de contato entre as células, ou seja, se com a adição de uma proteína qualquer (BSA por exemplo) ou de um RNA inespecífico poderíamos interferir com o mecanismo de indução da hemólise mecânica. No entanto, o fato de não encontrarmos proteção no ensaio hemolítico que utilizou RNA e na BSA não exclui a possibilidade de que a porção proteica ou que a porção ribonucleásica do fator promovam proteção se isolados. A possibilidade da TFP ligar-se a porção ribonucleica do SPM é ainda objeto de estudo.

6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho nos permitiram chegar às seguintes conclusões:

A TFP é biotransformada num processo oxidativo mediado pelo SMH (blue shift na região do visível com concomitante gasto de cofator NAD(P)H).

A curva de hemólise isosmótica induzida pela TFP tem caráter bifásico: proteção e hemólise.

O SMH protege eritrócitos da hemólise induzida por TFP devido a partição da droga na membrana microssomal.

A biotransformação da TFP pelo SMH diminui sua capacidade hemolítica.

Assim, concluímos que, o SMH inibe a hemólise induzida pela TFP por diminuir a concentração de TFP livre devido a biotransformação da mesma e também devido a partição da droga na membrana microssomal.

Uma fração solúvel dos microssomas (SPM) de composição proteica 48 % e ribonucleica 24 % com peso molecular entre 12 e 60 kDa protege eritrócitos de hemólise induzida por TFP (em até 100%) de maneira concentração dependente.

As frações de SPM, separadas por cromatografia, também protegem os eritrócitos da hemólise induzida por TFP.

O SPM e suas frações protegem eritrócitos da hemólise mecânica (35-40 %), porém esse efeito independe da concentração de SPM utilizada.

A TFP interage com a membrana microssomal e com uma porção ribonucleoproteica hidrossolúvel derivada do microssoma. Essa interação e a proteção à hemólise induzida vista tanto pelo SMH quanto pelo SPM revelam a importância da partição das drogas em membranas, diminuindo a concentração livre da droga, que é a efetiva farmacologicamente.

7. RESUMO

As drogas fenotiazínicas são amplamente utilizadas como neurolépticos e antipsicóticos. A trifluoperazina (TFP), um derivado fenotiazínico, dependendo da concentração, pode induzir hemólise ou proteger eritrócitos da lise em condição isosmótica.

Nesse trabalho verificamos a interferência do sistema microsomal hepático (SMH), que é o principal responsável pela biotransformação de drogas nos organismos vivos, no efeito hemolítico causado pela TFP.

O efeito hemolítico da TFP é abolido em presença de microsomas de fígado de rato (SMH), o que se deve em parte à biotransformação dirigida pelas enzimas P-450 microsomais e em parte à partição da droga na membrana microsomal, diminuindo a concentração livre da droga.

Foi detectado um sobrenadante pós-microsomal (SPM) que mantinha a mesma característica de proteção hemolítica apresentada pelo SMH. Para essa fração solúvel (SPM) de composição proteica 48% e ribonucleica 24 % foi feita uma caracterização bioquímica, constituída basicamente de: determinação do pH, condutividade, caracterização dos espectros de absorção óptica e de ressonância magnética nuclear de prótons (^1H -RMN), além da análise cromatográfica por HPLC e determinação da massa molecular aparente por eletroforese.

Para todas as nove frações de SPM obtidas na separação cromatográfica, cujos pesos moleculares aparentes variam de 12 a 160 kDa, foi observada proteção tanto contra hemólise induzida pela TFP quanto contra a hemólise mecânica.

8. SUMMARY

Phenothiazine drugs are mainly used as neuroleptics and antipsychotic agents. Trifluoperazine (TFP), a phenothiazine derivative, produces either hemolysis or protection of erythrocytes under isosmotic conditions in a dose-dependent manner.

In these work we verify the interference of mouse liver microsomes (MLM), which are the main responsible for drug biotransformation in organisms, in the hemolytic effect caused by TFP.

The hemolytic effect induced by TFP is abolished in the presence of MLM which is due, in part, to microsomal cytochrome P-450 driven biotransformation and a TFP partition into the microsomal membrane that decreases the free concentration of the drug.

A post microsomal supernatant (PMS) composed of proteins (48 %) and ribonucleic acid (24 %) has been found to exhibit the same protection against hemolysis as MLM. In this work, we showed the PMS biochemical characterization that consisted of: pH and conductivity determination, optical and nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy, besides chromatographic and electrophoretic analysis.

The nine fractions obtained from PMS by chromatographic separation, which molecular weight was between 12 and 160 kDa, protected erythrocytes against mechanical and TFP induced hemolysis.

9.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADELMAN, M.R.; BLOBEL, G. & SABATINI, D.D. An improved cell fractionation procedure for the preparation of rat liver membrane-bound ribosomes. *J Cell Biol.* **56**: 197-205, 1973.
- AMAR-COSTESEC, A.; BEAUFAY, H.; FEYTMANS, E.; THINES-SEMPOUX, D. & BERTHET, J. Subfractionation of rat liver microsomes. In: Microsomes and Drug Oxidations. Academic Press, New York, pp.41-58, 1969.
- ARAVAGIRI, M.; HAWES, E.M. & MIDHA, K.K. Development and application of a specific radioimmunoassay for trifluoperazine-N4'-oxide to a kinetic study in humans. *J Pharm Exp Ther.* **237**: 615-622, 1986.
- BALDESSARINI, R.J. Fármacos e o tratamento de distúrbios psiquiátricos. In: Princípios de Farmacologia. Guanabara, Rio de Janeiro, 8 ed, pp.253-290, 1990.
- BLACK, S.D. Membrane topology of the mammalian P450 cytochromes. *FASEB J.* **6**: 680-685, 1992.
- BLACK, S.D. & COON, M.J. Structural features of liver microsomal NADH-cytochrome P450 reductase. *J Biol Chem.* **257**: 5929-5938, 1982.
- BROWN, A.H. Determination of pentose in the presence of large quantities of glucose. *Arch. Biochem.* **11**: 269-278, 1946.
- BROWN, C.A. & BLACK, S.D. Membrane topology of mammalian cytochromes P-450 from liver endoplasmic reticulum. *J Biol Chem.* **264**: 4442-4449, 1989.
- CENTENO, F. & GUTIÉRREZ-MERINO, C. Location of functional centers in the microsomal cytochrome P450 system. *Biochemistry.* **31**: 8473-8481, 1992.
- COON, M.J.; DING, X.; PERNECKY, S.J. & VAZ, A.D. Cytochrome P450: progress and predictions. *FASEB J.* **6**: 669-673, 1992.

- CORNELIUS, A.; ASAKURA, T.; REILLY, M.R. & HORIUCHIK, S. The mechanism of chlorpromazine-induced red blood cell swelling. *Fed Proc.* **46**: 211-217, 1987.
- DEGTEREV, I.A.; BUZUKOV, A.A.; TATARSKAYA, N.K.; LEONOVA, E.Y. & SUKHOVA, N.M. Metabolism of heterocyclic compounds in liver mouse microsomes. *Chem-Pharm J.* **24**: 9-16, 1990.
- EBEL, R.E. & O'KEEFE, D.H. Substrate binding to hepatic microsomal P450: influence of the microsomal membrane. *J Biol Chem.* **253**: 3888-3897, 1978.
- EDWARDS, R.J.; MURRAY, B.P.; SINGLETON, A.M. & BOOBIS, A.R. Orientation of cytochromes P450 in the endoplasmic reticulum. *Biochemistry.* **30**: 71-76, 1991.
- FISHMAN, V. & GOLDENBERG, H. Metabolism of chlorpromazine. IV Identification of 7-hydroxy-chlorpromazine and its sulfoxide and desmethyl derivatives. *Proc Soc Exp Biol Med.* **112**: 501-506, 1963.
- FORREST, J.S. & GREEN, D.E. Phenothiazines: metabolism and analytical detection. *J For Sci.* **17**: 592-617, 1972.
- FROIMOWITZ, M. & CODY, V. Biologically active conformers of phenothiazines and tioxanthenes. Further evidence of a ligand model of dopamine D2 receptor antagonists. *J Med Chem.* **36**: 2219-2227, 1993.
- GRAM, T.E. Separation of hepatic smooth and rough microsomes associated with drug metabolizing enzymes. *Meth Enzymol.* **31**: 225-237, 1974.
- GUENGERICH, F.P. Separation and purification of multiple forms of microsomal cytochrome P-450. *J Biol Chem.* **252**: 3970-3979, 1977.
- GUT, J.; RICHTER, C.; WINTERHALTER, K.H. & KAWATO, S. Rotation of cytochrome P-450. II-Specific interactions of cytochrome P-450 with NADPH-cytochrome-P-450-reductase in phospholipid vesicles. *J Biol Chem.* **257**: 7030-7036, 1982.
- HIRD, H.J.; McLEAN, E.J.T. & MUNRO, H.N. Incorporation of amino acids by the protein of the post-microsomal fraction of rat liver. *Biochem Biophys Acta.* **87**: 219-231, 1963.

- HOLLENBERG, P.F. Mechanisms of cytochrome P450 and peroxidase-catalyzed xenobiotic metabolism. *FASEB J.*6: 686-694, 1992.
- HUBBARD, J.N.; MIDHA, K.K.; HAWES, E.M.; McKAY, G. & MARDER, S.R. Metabolism of phenothiazine and butyrophenone antipsychotic drugs. A review of some recent research findings and clinical implications. *Br J Psychiat.*163: 19-24, 1993.
- IMAL, Y.; FUKUDA, T.; KOMORI, M. & NAKAMURA, M. Comparison of heme environment at the putative distal region of P-450s utilizing their external and internal nitrogenous ligand bound forms. *Biochem Biophys Acta.*1207:49-57, 1993.
- JORGENSEN, A. Metabolism and pharmacokinetics of antipsychotic drugs. *Progress in Drug Metab.*9: 111-175, 1986.
- KAUL, P.N.; CONWAY, M.; TICKU, M. & CLARK, S. Chlorpromazine metabolism II. Determination of nonconjugated metabolites in the blood of schizophrenic patients. *J Pharm Sci.*61: 581-585, 1972.
- KAWATO, S.; GUT, J.; CHERRY, R.J.; WINTETHALTER, K.H. & RICHTER, C. Relation of cytochrome P-450. Investigations of protein-protein interactions of cytochrome P-450 in phospholipid vesicles and liver microsomes. *J Biol Chem.*257: 7023-7029, 1982.
- KEDDERIS, G.L. & MIWA, G.T. The metabolic activation of nitroheterocyclic therapeutic agents. *Biochem Pharmacol.*19: 33-62, 1988.
- KOOP, R.K. Oxidative and reductive metabolism by cytochrome P450 2E1. *FASEB J.*6: 724-730, 1992.
- KUEHN-VELTEN, N.; MEYER, I. & STAIB, W. Specificity of steroid binding to testicular microsomal cytochrome-P450: Relation of steroid structure to type-1 spectral responses after correction for hydrophobic association with the membrane. *J Steroid Biochem.*33: 33-40, 1989.
- KUNZ, B.C.; VERGÈRES, G.; WINTERHALTER, K.H. & RICHTER, C. Chemical modification of rat liver microsomal cytochrome P-450: study of enzymic properties and membrane topology. *Biochem Biophys Acta.*1063: 226-234, 1991.

- LIEBER, M.R.; LANGE, Y.; WEINSTEIN, R.S. & STICK, T.L. Interaction of chlorpromazine with the human erythrocyte membrane. *J Biol Chem.***259**: 9225-9234, 1984.
- LUXNAT, M. & GALLA, H.J. Partition of chlorpromazine into lipid bilayer membranes: the effect of membrane structure and composition. *Biochem Biophys Acta.***856**: 274-282, 1986.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARRAH, S. & RANDALL, R.J. Protein measurements with the folin phenol reagent. *J Biol Chem.***193**: 265-275, 1951.
- MARROUM, P.J. & CURRY, J. Red blood cell partitioning, protein binding and lipophilicity of six phenothiazines. *J Pharm Pharmacol.***45**: 39-42, 1993.
- MC MURRY, T.J. & GROVES, J.T. Metalloporphyrin models for cytochrome P-450: In: Cytochrome P-450 Structure, Mechanism and Biochemistry. Plenum Press, New York, p.1-39, 1986.
- MELTZER, H.Y. & NASH, J.F. VII. Effects of antipsychotic drugs on serotonin receptors. *Pharmacol Rev.***43**: 587-604, 1991.
- MINETTI, M. & Di STASI, A.M.M. Involvement of erythrocyte skeletal proteins in the modulation of membrane fluidity by phenothiazines. *Biochemistry.***26**: 8133-8137, 1987.
- MONTELLANO, P.R.O. Membrane topology of mammalian cytochromes P-450 from liver endoplasmic reticulum. *J Biol Chem.***264**: 4442-4449, 1989.
- OMURA, T. & SATO, R. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. *J Biol Chem.***239**: 2371-2385, 1964.
- OSTLE, B. Estatística aplicada. Ed Limusa, Wiley. S.A. México, pp.629, 1973.
- OZOLS, J. Cytochrome b5 from microsomal membranes of equine, bovine and porcine livers. Isolation and properties of preparations containing the membranous segment. *Biochemistry.***13**: 426-433, 1974.
- PARRY, G.; PALMER, D.N. & WILLIAMS, D.J. Ligand partitioning into membranes: its significance in determining K_M and K_S values for cytochrome P-450 and other membrane bound receptor and enzymes. *FEBS Lett.***67**: 123-129, 1976.

- PEREIRA, R.S. & VERCESI, A. Protective effect of TFP on the mitochondrial damage induced by Ca^{2+} plus prooxidants. *Biochem Pharmacol.* **1795**: 1801, 1992.
- PETERSON, J.A. & PROUGH, R.A. Cytochrome P-450 reductase and cytochrome b5 in cytochrome catalysis. In: Cytochrome P-450 Structure, Mechanism and Biochemistry. Plenum Press, New-York, p. 87-124, 1986.
- PORTER, T.D. & COON, M.J. Cytochrome P-450: multiplicity of isoforms, substrates and catalytic and regulatory mechanisms. *J Biol Chem.* **266**: 13469-13472, 1991.
- RAUCY, J.L. & LASKER, J.M. Isolation of P-450 enzymes from human liver. *Meth Enzymol.* **206**: 577-586, 1991.
- RUGGIERO, A.C. Ação das drogas trifluoperazina e papaverina e do estresse oxidativo em eritrócitos. Tese de Doutorado. Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia, UNICAMP, 1994.
- SEEMAN, P. Membrane actions of anesthetics and tranquilizers. *Pharm Rev.* **24**: 583-589, 1972.
- SEEMAN, P. & WEINSTEIN, J. Erythrocyte membrane stabilization by tranquilizers and antihistamines. *Biochem Pharmacol.* **15**: 1737-1752, 1966.
- SHAGGER, H. & JAGOW, G. Tricine-sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem.* **166**: 368-379, 1987.
- SPINEDI, A.; PACINI, L.; LIMATOLA, C.; LULY, P. & FARIAS, R.N. Phenothiazines inhibit acetylcholinesterase by concentration-dependent-type kinetics. A study with trifluoperazine and perphenazine. *Biochem Pharmacol.* **44**: 1511-1514, 1992.
- SZCZESNA-SKORUPA, E. & KEMPER, B. An N-terminal glycosylation signal on cytochrome P-450 is restricted to endoplasmic reticulum in a luminal orientation. *J Biol Chem.* **268**: 1757-1762, 1993.
- TATARSKAYA, N.K. & DEGTEREV, I.A. Influence of ascorbic acid and the pH of the medium on biotransformation of quinifur. *Chem-Pharm J.* **22**: 912-918, 1988.

- THOMPSON, A.A.; CORNELIUS, A.S.; ASAKURA, T. & HORIUCHI, K. Comparative studies of phenothiazine derivatives for their effects on swelling of normal and sickle erythrocytes. *Gen Pharmacol*.**24**: 999-1006, 1993.
- UVAROV, V.Y.; SOTNICHENKO, A.I.; VODOVOZOVA, E.L.; MOLOTKOVSKY, J.G.; KOLESANOVA, E.F.; LYULKIN, Y.A.; STIER, A.; KRUEGER, V. & ARCHAKOV, A.I. Determination of membrane-bound fragments of cytochrome P-450 2B4. *Eur J Biochem*.**222**: 483-489, 1994.
- VAZQUEZ, A.; TUDELA, J.; VARON, R. & GARCIA-CANOVAS, J. A kinetic study of the generation and decomposition of some phenothiazine free radical formed during enzymatic oxidation of phenothiazines by peroxidase-hydrogen peroxide. *Biochem Pharmacol*.**44**: 889-894, 1992.
- VERBEECK, R.J.; CARDINAL, J.A.; HILL, A.E. & MIDHA, K.K. Binding of phenothiazine neuroleptics to plasma proteins. *Biochem Pharmacol*.**32**: 2565-2570, 1983.
- VIJAYAKUMAR, S. & SALERNO, J.C. Molecular modeling of the 3-D structure of cytochrome P450sec. *Biochem Biophys Acta*.**1160**: 281-286, 1992.
- WHITE, R.E. & COON, M.J. Oxygen activation by cytochrome P-450. *Annu Rev Biochemistry*.**49**: 315-356, 1980.
- WILLIAMS, R.T. Detoxication mechanisms. Chapman & Hall, London, 2 ed, p.1-22, 1959.
- ZACHOWSKI, A. & DURAND, P. Biphasic nature of the binding of cationic amphipaths with artificial and biological membranes. *Biochem Biophys Acta*.**937**: 411-416, 1988.

10. COMUNICAÇÕES CIENTÍFICAS

MALHEIROS, S.V.P.; RUGGIERO, A.C.; MEIRELLES, N.C. & DEGTEREV, I.A.. Mouse liver microsomes (MLM) protect erythrocytes against trifluoperazine (TFP) induced and mechanical hemolysis which are due to TFP microsomal transformation and to the action of one unidentified water-soluble factor (UF). - Resumo (11) - Métodos Avançados para Análise Estrutural de Biomoléculas - IFQSC-USP, janeiro de 1994, São Carlos, SP.

MALHEIROS, S.V.P.; RUGGIERO, A.C.; MEIRELLES, N.C. & DEGTEREV, I.A. - "Mouse Liver Microsomes liver microsomes (MLM) protect erythrocytes against trifluoperazine (TFP) induced and mechanical hemolysis which are due to the action of one unidentified microsomal factor (UF). - Resumo P-4 - XXII Reunião Anual da SBBq, maio de 1994, Caxambu, MG

MEIRELLES, N.C.; MALHEIROS, S.V.P.; RUGGIERO, A.C. & DEGTEREV, I.A. - "Mouse Liver Microsomes liver microsomes (MLM) protect erythrocytes against trifluoperazine (TFP) induced and mechanical hemolysis which are due to the action of one unidentified microsomal factor (UF). *Eur J Drug Metab Pharmacokinet.* **19** (4): 349-357, 1994.