



Sônia Valéria Pinheiro Malheiros

AÇÃO DE XENOBIÓTICOS EM MEMBRANAS BIOLÓGICAS E SINTÉTICAS

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato(a)
Sônia Valéria Pinheiro
Malheiros
e aprovada pela Comissão Julgadora.

07/04/99

Tese de Doutorado apresentada
ao Departamento de Bioquímica
do Instituto de Biologia da Uni-
versidade Estadual de Campinas

Orientador(a):
Prof^a. Dr^a. Nilce Correa Meirelles

**Campinas
1999**

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	UNICAMP
	M294c
	37 888
	229/99
	☒
	R\$ 11,00
DATA	11/06/99
N.º CPD	

CM-00124651-6

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

Malheiros, Sônia Valéria Pinheiro

M294c Ação de xenobióticos em membranas biológicas e
sintéticas/Sônia Valéria Pinheiro Malheiros.. -- Campinas,
SP:[s.n.], 1999.
139f.:ilus.

Orientadora: Nilce Correa Meirelles

Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia.

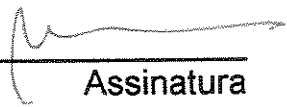
1. Membrana. 2. Hemácea. 3. Hemólise. I. Meirelles,
Nilce Correa. II. Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia. III. Título.

Campinas, 07 de abril de 1999

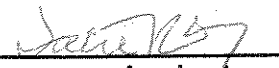
Banca Examinadora:

Titulares

Profª Drª Nilce Correa Meirelles (Orientadora)
(Depto. de Bioquímica – IB – UNICAMP)


Assinatura

Profª Drª Satie Hatsushika Ogo
(Depto. de Bioquímica – IB – UNICAMP)


Assinatura

Profª Drª Maria Helena Andrade Santana
(Depto. de Processos Biotecnológicos – FEQ – UNICAMP)


Assinatura

Prof. Dr. Pedro Luís O. Volpe
(Depto. de Físico Química – IQ – UNICAMP)


Assinatura

Prof. Dr. Stephen Hyslop
(Depto. de Farmacologia – FCM – UNICAMP)


Assinatura

Suplentes

Prof. Dr. Hiroshi Aoyama
(Depto. de Bioquímica – IB – UNICAMP)

Assinatura

Profª Drª Angela Maria Moraes
(Depto. de Processos Biotecnológicos – FEQ – UNICAMP)

Assinatura

Àqueles que dedicam horas inumeráveis à pesquisa, se alimentam de curiosidades e ainda se surpreendem com a simplicidade absolutamente complexa da vida

Construí antes de areia, depois construí de pedra.
Como a pedra desabasse,
Não construí de mais nada.
Depois voltei muitas vezes a construir
de areia e pedra, conforme tinha aprendido....

E aprendi muitas coisas,
e percorri caminhos únicos,
por vezes tortuosos, por vezes lineares,
outras vezes profícuos, outras sem sentido

E quando achava o que procurava,
mais tinha a caminhar...
E digo sempre: só a sepultura
Não terá nada mais a me ensinar.

(Bertold Brecht- adaptação)

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais por fazerem de mim o que sou.

Ao Jorge pelo apoio incondicional, por compreender minhas ausências, por viver comigo todas as etapas destes quatro anos dedicados a este trabalho, etc, etc, etc...

Ao pequeno Gabriel grande inspiração deste último ano.

À Dr^a. Nilce C. Meirelles pela oportunidade de realizar este trabalho com apoio, confiança e amizade.

À Dr^a. Eneida de Paula pela supervisão, incentivo e companheirismo fundamentais para a realização deste trabalho.

Ao Dr. Pedro Luis O. Volpe pela colaboração, orientação e incentivo.

Ao Dr. Áureo pela gentil colaboração na realização dos trabalhos de microscopia eletrônica de varredura aqui apresentados.

Às Dr^{as}. Dora Brites, Alexandra Brito e toda a equipe de Portugal pela calorosa receptividade que proporcionou um mês de trabalho intenso e muito proveitoso.

Aos mais que companheiros do laboratório, os amigos: Andréia, Alessandro, Alexandre, Daniela, Eduardo, Eneida, Jacque, Leonardo, Luciana, Mariza, Márcia, Mércia, Paulo, Rafael, Vanessa que fizeram da convivência no laboratório uma experiência impagável de respeito e solidariedade com direito a doação de sangue e mimos para minha barriga.

À Daniela, Luciana e Mércia pela generosa leitura deste trabalho.

À Márcia que durante seu estágio, colaborou com a realização de experimentos que fazem parte desta tese.

À CAPES e FAPESP que forneceram o auxílio financeiro.

SUMÁRIO

Abreviaturas	i
Lista de Figuras e Esquemas	ii
Resumo	iii
Abstract	iv
1. Introdução	1
1.1. Membrana do Eritrócito	1
1.2. Microsomas	5
1.3. Membranas Sintéticas	5
1.4. Hemólise Induzida por Xenobióticos	6
1.4.1. Lise Hiposmótica	6
1.4.2. Lise Isosmótica	7
1.5. Antipsicóticos Fenotiazínicos	11
1.6. Anestésicos Locais	12
1.7. Antihelmínticos	14
1.8. Microcalorimetria Biológica	17
1.8.1. Aplicações da Microcalorimetria Biológica	19
2. PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS INTERNACIONAIS	20
2.1. Contribution of Trifluoperazine/Lipid Ratio and Drug Ionization to Hemolysis	22
2.2. A Critical Analysis of Microcalorimetric Methodology for Drug-Induced Haemolysis	32
2.3. Pathways Involved in Trifluoperazine-, Dibucaine- and Praziquantel- Induced Hemolysis	49
2.4. Membrane Effects of Trifluoperazine, Dibucaine and Praziquantel on Human Erythrocytes	75
3. DISCUSSÃO	95
3.1. Partição de Drogas entre Fases Apolares (Membranas/Octanol) e Água	96
3.2. Curvas Hemolíticas	98
3.3. Determinação da Razão Efetiva Droga/Lipídio na Hemólise	101
3.4. Contribuição da Ionização dos Xenobióticos	102
3.5. Ensaio Microcalorimétrico	105
3.5.1. Análise Crítica da Metodologia Microcalorimétrica	107
3.6. Análise Morfológica dos Eritrócitos Tratados com Xenobióticos	108
3.7. Perfil de Eluição de Fosfolipídios e Colesterol	110

3.8. Complexidade da Interação dos Xenobióticos com Biomembranas	111
4. CONCLUSÃO	113
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	116
6. ANEXO I	129
7. ANEXO II	131

ABREVIATURAS

AL	= anestésico(s) local(is)
ATP	= adenosina trifosfato
CMC	= concentração micelar crítica
ΔH	= variação de entalpia
ΔpK	= $pK - pK_{ap}$
DBC	= dibucaína
DMSO	= dimetilsulfóxido
dq/dt	= fluxo de calor
K	= constante de ionização
K_b	= constante de ligação
LUV	= vesículas unilamelares grandes
MLV	= vesículas multilamelares
P	= coeficiente de partição
$P_:$	= coeficiente de partição da droga neutra
P_+	= coeficiente de partição da droga carregada
PC	= fosfatidilcolina
P^{DBC}	= coeficiente de partição da dibucaína
PE	= fosfatidiletanolamina
P^{GHOST}	= coeficiente de partição entre membranas de eritrócito/água
pK	= pH em que o composto encontra-se 50 % ionizado
pK_{ap}	= pK aparente, pH em água, na presença de membranas, para 50 % de ionização
P^{LIP}	= coeficiente de partição entre lipossoma/água
P_{medio}	= coeficiente de partição em pH 7,4
P^{MIC}	= coeficiente de partição entre microssomas/água
P^{OCT}	= coeficiente de partição entre octanol/água
POPC	= palmitoil-oleil-fosfatidilcolina
P^{PZQ}	= coeficiente de partição do praziquantel
PS	= fosfatidilserina
P^{TFP}	= coeficiente de partição da trifluoperazina
PZQ	= praziquantel
q	= efeito térmico ou calor de uma reação
Re	= razão efetiva droga/lipídio na membrana
Re^{PROT}	= razão efetiva droga/lipídio na proteção contra lise hiposmótica
Re^{SAT}	= razão efetiva droga/lipídio na saturação da membrana
Re^{SOL}	= razão efetiva droga/lipídio na total solubilização da membrana
RPE	= ressonância paramagnética eletrônica
SUV	= vesículas unilamelares pequenas
TFP	= trifluoperazina
X:	= droga na forma neutra
XH+	= droga na forma carregada
Z	= razão molar droga neutra/protonada

LISTA DE FIGURAS E ESQUEMAS

Figura	Página	Título
1	4	Diagrama esquemático da membrana eritrocitária
2	12	Trifluoperazina (TFP)
3	13	Dibucaína (DBC)
4	16	Praziquantel (PZQ)
5	130	Microcalorímetro de condução de calor
6	132	Incremento da eluição de colesterol e fosfolipídios quando a hemólise induzida por TFP e DBC varia de 5 para 50 %.
Esquema	Página	Título
I	103	Partição das formas neutra (X:) e protonada (XH+) de um soluto entre o sistema membrana/água.
II	112	Interação da TFP, DBC e PZQ com a membrana do eritrócito

RESUMO

O presente trabalho reporta um estudo da interação do antipsicótico trifluoperazina (TFP), do anestésico local dibucaína (DBC) e do antihelmíntico praziquantel (PZQ) com membranas biológicas e sintéticas. A interação droga-membrana foi estudada através da determinação do coeficiente de partição das drogas entre vários sistemas de membrana e água, e também pela monitoração da atividade hemolítica (determinação das razões efetivas drogas/lipídio para proteção e indução de lise, determinação do efeito térmico envolvido na hemólise, análise morfológica e determinação do perfil de eluição de lipídios). Além do estudo da contribuição do grau de ionização da TFP e da DBC na interação com membranas. A TFP apresentou o maior coeficiente de partição em todas as membranas e a melhor eficácia hemolítica, seguida pela DBC e pelo PZQ. A maior partição da TFP em relação à DBC deve-se às interações específicas com as proteínas da membrana bem como à contribuição da maior concentração da forma neutra em pH 7,4. A proteção induzida pelos xenobióticos em condições hiposmóticas está diretamente relacionada à hidrofobicidade dos compostos e é produzida pela inserção das formas monoméricas na membrana em concentrações inferiores às de saturação da membrana. A razão efetiva droga/lipídio para a hemólise isosmótica induzida pela TFP ocorre muito antes de uma real saturação da membrana, enquanto que as razões efetivas droga/lipídio para DBC e PZQ refletem uma real saturação da membrana. A hidrofobicidade parece ser um fator determinante na lise isosmótica induzida pelos xenobióticos embora fatores como a propriedade de agregação da TFP e a baixa solubilidade do PZQ tenham sido fundamentais para a indução ou inibição da hemólise. A hemólise induzida pela TFP e pela DBC são processos predominantemente entálpicos onde os eventos que mais contribuem são: a interação específica com proteínas da membrana e a formação de micelas mistas, no caso da TFP, e, a intercalação do monômero na membrana, no caso da DBC. Todos os xenobióticos estudados induziram estomatocitose e promoveram eluição de fosfolipídios e colesterol, no entanto a saída de lipídios não está proporcionalmente relacionada à hemólise. Os resultados obtidos sugerem que distintos mecanismos celulares de interação com a membrana são responsáveis pelos mecanismos de citotoxicidade de cada droga e revelam a multiplicidade de fatores (hidrofobicidade, solubilidade, grau de ionização, propriedades de agregação, afinidade específica por determinado componente da membrana e efeitos estéricos) que devem ser considerados na interpretação do fenômeno hemolítico ou, de uma maneira mais genérica, da interação de anfífilos com membranas biológicas.

ABSTRACT

The present work reports a study of the interaction of the antipsychotic trifluoperazine (TFP), the local anesthetic dibucaine (DBC) and the antihelminthic praziquantel (PZQ) with biological and synthetic membranes. The drug-membrane interaction was studied by the determination of the partition coefficient of the drugs between various membrane systems and water, and by monitoring the hemolytic activity (determination of drug/lipid ratios for protection and lysis), determination of the thermal effect involved in hemolysis, morphological analysis and determination of the release of membrane lipids). In addition the study of TFP and DBC ionization contribution to membrane interaction was performed. TFP presented the higher partition coefficient in all studied membranes and the higher hemolytic efficacy, followed by DBC and PZQ. The higher partition of TFP in relation to DBC is due to the specific interaction with membrane proteins and to the greater contribution of the neutral form at pH 7.4. The protection induced by the drugs in hyposmotic conditions is directly related to the compounds' hydrophobicity and it is triggered by the monomeric drug partition into membrane, in lower concentrations than those required for membrane saturation. The effective drug/lipid ratio in the isosmotic hemolysis induced by TFP occurs before membrane saturation while for DBC and PZQ the lytic drug/lipid ratio reflect a real membrane saturation. The hydrophobicity seems to be a determinant factor in the induced lysis although factors as TFP aggregative property and the low solubility of PZQ have become incisive to the induction or inhibition of hemolysis. The TFP and DBC induced lysis are primarily enthalpic process in which the events that more effectively contribute are the specific membrane protein interaction and micelle-mixed formation in case of TFP, and the monomer intercalation into membrane, for DBC. All the studied drugs induced stomatocytosis. The phospholipid and cholesterol release induced by the drugs are not directly related to hemolysis. The results presented suggest that distinct pathways are responsible for the lytic effect induced for each drug and reveal the plurality of factors (hydrophobicity, solubility, ionization degree, aggregative properties, specific affinity for membrane components and steric effects) that must be considered in the interpretation of the hemolytic phenomenon or, in a more general view, the interaction of amphiphiles with biological membranes.

AÇÃO DE XENOBIÓTICOS EM MEMBRANAS BIOLÓGICAS E SINTÉTICAS

1. INTRODUÇÃO

Estima-se que atualmente os organismos vivos estejam expostos a um número exorbitante de composto químicos não endógenos (xenobióticos) que foram sintetizados pelo próprio homem, entre eles podemos citar os medicamentos, corantes, conservantes, flavorizantes da indústria alimentícia, poluentes industriais que contaminam o ar, água, o solo, etc. A interação dos xenobióticos com o organismo vivo pode ser evidenciada pela atividade terapêutica dos medicamentos, ou ainda pelas reações adversas (intoxicação) promovidas por muitas substâncias químicas que interagem com os sistemas biológicos. O efeito da maioria das drogas sobre o organismo resulta de suas interações com macromoléculas, muitas das quais componentes da membrana plasmática (Benet *et al.*, 1996). Além do mais, a capacidade de um composto químico interagir com as membranas biológicas é o passo determinante para a sua absorção, distribuição, biotransformação, excreção, bem como, para o estabelecimento de sua atividade biológica.

1.1. Membrana do Eritrócito

O eritrócito, a célula vermelha do sangue, é uma célula anucleada de forma discóide bicôncava, que contém hemoglobina em concentração elevada (cerca de 5 mM/célula) (Bull *et al.*, 1990). Para cumprir a função de transportar a hemoglobina e levar oxigênio a todas as células, o eritrócito percorre todos os vasos sangüíneos do organismo aproximadamente 500.000 vezes, durante sua vida média de 120 dias (Bull *et al.*, 1990) e é capaz de transpor capilares e sinusóides de diâmetros de 3 a 4 micras, que correspondem a metade do seu próprio diâmetro (7 a 9 micras) (Schrier, 1985; Bull *et al.*, 1990). Tais fenômenos só são possíveis graças a extrema resistência e deformabilidade da membrana do eritrócito (Lux, 1988).

Já que o eritrócito é uma célula anucleada e não contém organelas a membrana plasmática eritrocitária tornou-se o mais conhecido e estudado modelo de membrana biológica não só pela facilidade de obtenção e isolamento (punção venosa e lise hiposmótica) como também pela facilidade de monitoração da desorganização da membrana pela liberação da hemoglobina (Elgsaeter & Mikkelsen, 1991; Laurialt & O'brien, 1991).

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

proteico), e uma pequena porção de carboidratos ligados às proteínas (glicoproteínas) e aos lipídios (glicolipídios) (Gratzer, 1981), formando o glicocálix, uma estrutura que chega a medir dez vezes o diâmetro da própria bicamada (Lehninger et al., 1993).

Todos os lipídios das células vermelhas estão na membrana. A composição lipídica da membrana eritrocitária é em peso: fosfolipídios (47,5 %), colesterol (25 %), esfingomielina (17,5 %), e glicolipídios (10 %) (Storch & Kleinfeld, 1985).

Os fosfolipídios distribuem-se assimetricamente entre as monocamadas interna e externa da membrana eritrocitária. As regiões polares dos fosfolipídios, chamadas cabeças polares, estão expostas ao meio aquoso. A distribuição assimétrica nas duas monocamadas lipídicas é praticamente absoluta para a fosfatidilserina (PS) com 96 % das moléculas na camada interna, bem como para a fosfatidiletanolamina (PE), onde a maior parte das moléculas (80 – 85 %) estão na monocamada interna. Por outro lado a fosfatidilcolina (PC) (65 - 75 %) e a esfingomielina (mais de 85 %), preferencialmente localizam-se na camada externa. A distribuição preferencial dos fosfatidilinositóis também foi estabelecida: 100 % de fosfatidilinositol-4-fosfato, e 80 % de fosfatidilinositol e seu derivado 4,5-bifosfato estão localizados na monocamada interna, bem como 80 % do ácido fosfatídico (ver Zachowski, 1993, para revisão de assimetria lipídica).

Diferentes mecanismos foram propostos para a manutenção da assimetria: i) a interação do esqueleto da membrana, principalmente da espectrina, com os amino-fosfolipídios, fixando esses compostos na monocamada interna (Haest, 1982; Middelkoop *et al.*, 1988) e ii) uma translocação específica ATP-dependente dos aminofosfolipídios da camada externa para a camada interna (Seigneuret & Devaux, 1984). No entanto, vários trabalhos têm demonstrado que o primeiro mecanismo proposto contribui muito pouco para a manutenção do perfil de assimetria apresentado pela membrana eritrocitária (Maksymiw *et al.*, 1987; Seigneuret *et al.*, 1984; Gudi *et al.*, 1990), enquanto que o segundo mecanismo vem sendo intensivamente estudado e aceito (Devaux, 1991; Schreier *et al.*, 1992; Zachowski, 1993; Chen & Huestis, 1997).

Cada uma das duas monocamadas, apesar de assimétricas, são praticamente iguais em tamanho e acopladas pelas interações hidrofóbicas, de modo que um desequilíbrio ou uma intercalação de moléculas em um dos folhetos irá causar uma ondulação na membrana. Isto explica porque a intercalação de moléculas anfipáticas no folheto externo é suficiente para causar uma expansão de 0,6 a 1,0 %, o que irá produzir uma saliência ou evaginação no folheto externo, promovendo equinocitose. Do mesmo modo,

se uma molécula anfipática for incorporada na monocamada interna, resultará em invaginação da membrana, promovendo estomatocitose (Schreier *et al.*, 1992).

As proteínas de membrana de eritrócitos estão subdivididas em duas classes: as proteínas periféricas e as integrais. As proteínas integrais têm uma porção hidrofóbica que interage com os lipídios. A principal proteína integral transmembranar em eritrócitos humanos, a banda 3, desempenha várias funções como o transporte aniônico e a interação do citoesqueleto com proteínas citossólicas (hemoglobina e determinadas enzimas glicolíticas). Essa interação é mediada pelo extenso domínio citoplasmático da banda 3 que se estende da bicamada até o citoplasma (Clari & Moret, 1989). A maioria das proteínas periféricas da membrana eritrocitária parece estar envolvida na formação de um extenso retículo submembranar, o citoesqueleto eritrocitário que está representado na FIGURA 1. As proteínas do citoesqueleto da membrana eritrocitária são responsáveis pela manutenção da forma, da estabilidade e da deformabilidade do eritrócito (Gallagher & Forget, 1993). Os principais componentes do citoesqueleto eritrocitário são a espectrina, a actina e a proteína 4.1. A conexão entre as proteínas integrais e a espectrina do citoesqueleto é feita por uma família de proteínas denominadas anquirinas. Essa interação protege a integridade da célula na circulação (Platt *et al.*, 1993). A interação da membrana com a espectrina tem sido exhaustivamente pesquisada (Reinhart *et al.*, 1986; Kahana *et al.*, 1991; Streichman *et al.*, 1991; Yang, 1993). Recentemente tem sido discutido o papel das interações eletrostáticas nessa interação (Kahana *et al.*, 1991); além disso a existência de regiões hidrofóbicas na molécula de espectrina e na bicamada lipídica, sugerem que as interações hidrofóbicas podem também ser importantes para a manutenção da forma do eritrócito (Streichman *et al.*, 1991).

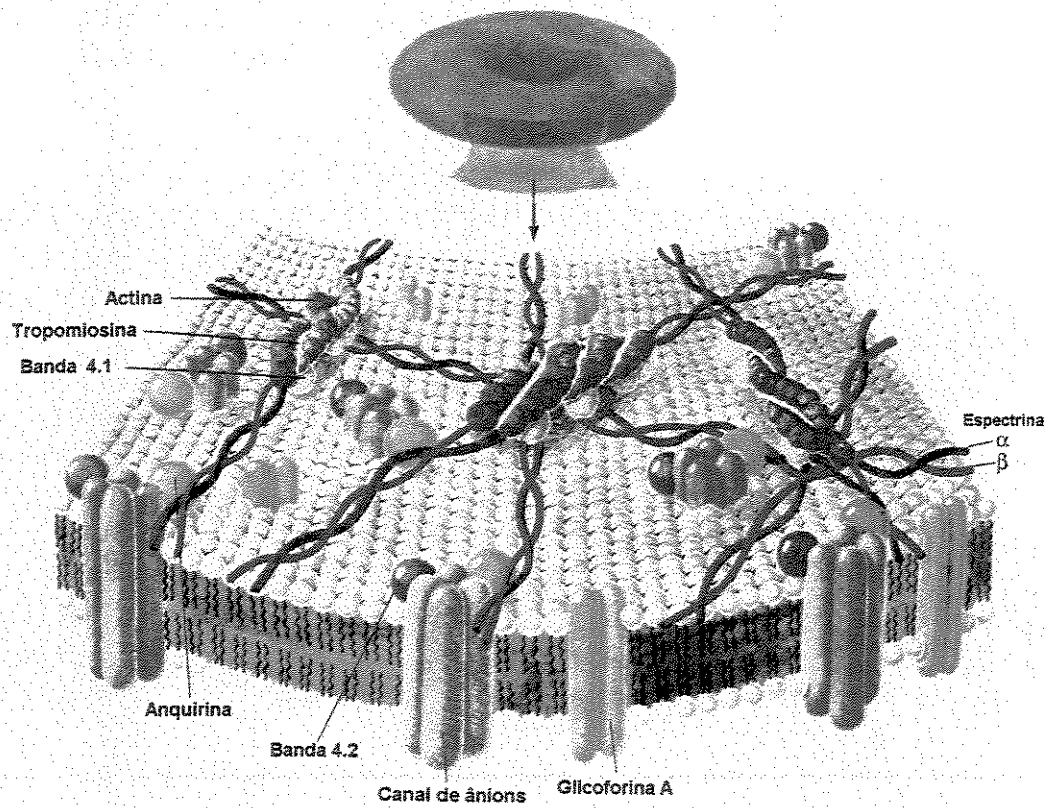


FIGURA 1: DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DA MEMBRANA ERITROCITÁRIA.
(Voet & Voet, 1995)

1.2. Microsomas

O microsoma é um artefato de preparação onde as cisternas e túbulos do retículo endoplasmático são rompidos e reconstituídos sob a forma de vesículas menores, mantendo no entanto, as relações topológicas normais entre a membrana, a luz e os ribossomas. Existem dois tipos de retículos: o retículo endoplasmático rugoso e o retículo endoplasmático liso. A distinção morfológica entre essas categorias reside na presença de ribossomas que se ligam ao retículo endoplasmático rugoso (Karp, 1984).

No fígado, o retículo endoplasmático liso é a porção responsável pela biossíntese de ácidos graxos e fosfolípidios (Darnell *et al.*, 1990), e pela biotransformação de uma grande variedade de compostos orgânicos. Além das enzimas citocromo P450, citocromo b5, citocromo P450 redutase e citocromo b5 redutase, que participam na biotransformação de drogas, o retículo endoplasmático liso possui de 30 a 40 enzimas que se inserem na membrana (Karp, 1984).

Os microsomas podem ser utilizados como modelo de membrana biológica rica em proteínas já que são compostos, em peso, por 70 % de proteína, 20% de RNA e somente 10 % de lípidios (Hird *et al.*, 1964).

1.3. Membranas Sintéticas

Além do estudo em membranas biológicas, como as de eritrócitos e microsomas, estudos feitos em membranas sintéticas ou sistemas modelo podem trazer informações mais detalhadas sobre a interação de determinados agentes com constituintes lipídicos específicos das membranas.

As membranas sintéticas podem ser formadas graças à estrutura dos fosfolípidios que são constituídos de uma porção polar (cabeça polar) e de uma porção hidrofóbica (cadeias acila). As interações hidrofóbicas entre as cadeias alifáticas, as interações eletrostáticas na região da cabeça polar (entre dois lipídios vizinhos e entre a cabeça polar e a água) e as forças de van der Waals favorecem o empacotamento dos fosfolípidios estabilizando a estrutura final da bicamada (Hiemenz, 1986).

Vesículas uni e multilamelares são um grupo de estruturas de fosfolípidios consideradas como modelos de membranas biológicas. As vesículas compostas de fosfolípidios são chamadas de lipossomos e mimetizam as membranas naturais porque são compartimentalizadas, possuindo um (unilamelar) ou mais (multilamelares) compartimentos aquosos internos. A simples agitação do fosfolípido anidro em água é suficiente para

formar multibicamadas (MLV), que podem ter de 20 nm a 10 μ m de diâmetro (Huang, 1969; Prasad, 1996). Existem vários métodos de obtenção de vesículas unilamelares pequenas (SUV) e grandes (LUV) (Prasad, 1996).

Estudos sobre a transição de fase, permeabilidade, dinâmica molecular (como movimentos transversais e laterais no plano da bicamada) e movimentos intramoleculares dos fosfolipídios, incorporação de proteínas, resposta osmótica à alteração da fase aquosa, efeito da composição da membrana, efeito do colesterol, entre outros foram conduzidos em bicamadas sintéticas (Warren, 1987). Além disso, lipossomos podem carrear moléculas hidrofílicas - que ficam encapsuladas no interior da vesícula, ou hidrofóbicas - que se incorporam na fase lipídica, ou ainda anfifílicas - que compartilham os dois ambientes (aquoso e lipídico), tornando-se uma importante ferramenta na administração de xenobióticos aos organismos vivos (Desormeaux & Bergeron, 1998; Lasic, 1998; Takagi *et al.*, 1998).

1.4. Hemólise Induzida por Xenobióticos

O fenômeno de hemólise induzida por compostos químicos vem sendo estudado desde 1908 (Traube, 1908). Em 1966, Seeman & Weinstein descreveram o efeito bifásico de várias substâncias (álcoois, anestésicos, ácidos graxos, esteróides, detergentes, antipsicóticos) sobre a hemólise. Estas substâncias, dependendo da concentração utilizada, poderiam proteger eritrócitos de lise hiposmótica ou induzir hemólise, em condição isosmótica.

1.4.1. Lise Hiposmótica

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

Schrier e colaboradores (1992a), utilizando marcadores de spin derivados dos glicerofosfolipídios, observaram que a lise hiposmótica é acompanhada por uma redistribuição dos fosfolipídios. A mudança na forma das linhas dos espectros de ressonância paramagnética eletrônica (RPE) mostrou que, após a hemólise, a monocamada mais rígida (a mais externa)

torna-se mais fluida, enquanto o inverso ocorre com a monocamada interna. Eles observaram também que após a resselagem das membranas, na presença de Mg^{+2} -ATP, a assimetria transmembranar dos fosfolipídios foi reestabelecida, o que evidencia a atividade de uma aminofosfolipídio translocase (flippase) na manutenção da assimetria lipídica.

A natureza do efeito protetor na hemólise hiposmótica causada por anfifílicos foi primeiramente descrita por Seeman e colaboradores (Machleidt *et al.*, 1972; Seeman, 1972) que sugeriram que ao intercalar-se nas membranas biológicas, os anfifílicos promoveriam um aumento de moléculas na bicamada favorecendo sua resistência mecânica. Mais recentemente, em 1991, Hagerstränd & Isomaa sugeriram que o efeito protetor promovido pelos agentes químicos em concentrações sublíticas deve-se a rearranjos da organização da membrana que se seguiriam à intercalação dos mesmos. A intercalação destes compostos, promoveria um rápido rearranjo na bicamada ao qual estaria associado um aumento na permeabilidade da membrana, de modo que um rápido efluxo de íons diminuiria a pressão osmótica entre o meio intracelular e o tampão isotônico, protegendo a célula da lise (Hagerstränd & Isomaa, 1991).

1.4.2. Lise Isosmótica

A primeira tentativa de elucidar o fenômeno de hemólise isosmótica induzida por xenobióticos data de 1966 quando Seeman, classificou os agentes hemolíticos em dois grupos: as hemolisinas específicas e as não específicas. As primeiras induziam hemólise mesmo em pequenas concentrações ligando-se especificamente à componentes (receptor ou composto específico) da membrana. São exemplos de hemolisinas específicas a digitonina, saponina, holoturina A, entre outras. As hemolisinas não específicas, por sua vez, são as que protegem eritrócitos contra hemólise hiposmótica em pequenas concentrações, mas que induzem hemólise quando em altas concentrações. São exemplos de hemolisinas não específicas: álcoois, vitamina A, lecitinas, ácido esteárico, detergentes, agentes fenotiazínicos, antiinflamatórios, entre outros. O método proposto por Seeman para distinguir entre agentes que atuam ou não em componentes específicos de membrana não permite a elucidação de questões importantes sobre o assunto, tais como: o modo de interação entre a droga e a membrana eritrocitária e com qual(ais) componente(s) específicos da membrana a droga interage?

Após a teoria proposta por Seeman (1966), outros autores vêm tentando elucidar os processos que acompanham a hemólise induzida por xenobióticos. De acordo com Sheetz & Singer (1974) as drogas catiônicas interagem preferencialmente com os fosfolipídios carregados negativamente

da monocamada interna, como a fosfatidilserina, induzindo invaginação (internalização da membrana), enquanto que as drogas aniônicas interagem preferencialmente com a monocamada externa por repelir-se do campo negativo gerado por este fosfolípido, promovendo evaginação (externalização) da monocamada externa. Enquanto a intercalação preferencial de drogas catiônicas na monocamada interna provê uma explicação satisfatória para a indução da estomatocitose (invaginação da membrana), outros efeitos de membrana têm sido investigados como possíveis coadjuvantes neste processo, como por exemplo, a indução de redistribuição dos fosfolípidios promovida pelos fenotiazínicos (Schrier *et al.*, 1992b; Chen & Huestis, 1997).

Tem sido sugerido que na hemólise isosmótica induzida por um grande número de compostos, como a lisofosfatidilcolina (Weltzien, 1979), a clorpromazina (Lieber *et al.*, 1984), a gramicidina (Katsu *et al.*, 1988) e o etanol (Chi & Wu, 1991) a lise ocorreria pela perda da permeabilidade seletiva da membrana. Este fato pode ser demonstrado pela saída de potássio que precede a saída da hemoglobina, sugerindo que a lise ocorreria em função da formação de pequenos poros na membrana (Chi & Wu, 1991). Este mecanismo é conhecido como coloidosmótico, isto é, os pequenos poros permitiriam o equilíbrio entre íons, porém a retenção da hemoglobina e seus contra-íons dentro da célula levariam a um desequilíbrio osmótico, responsável pela entrada de água e conseqüente ruptura total da membrana.

Hägerstrand & Isomaa (1989) descreveram o fenômeno hemolítico que acompanha a partição de moléculas anfipáticas em membranas naturais e artificiais de modo bastante interessante: consideram que a membrana de eritrócitos pode incorporar uma grande quantidade de anfifílicos sem perder sua integridade e propriedades de barreira. A intercalação de anfifílicos nas membranas é, no entanto, associada com grandes rearranjos no interior da bicamada lipídica. Quando intercalam-se nas membranas, os anfifílicos disparam o desenvolvimento de uma fase transiente decorrente de uma redistribuição rápida das moléculas do anfifílico bem como dos lipídios da bicamada. Em concentrações subléicas altas ocorre um processo adicional envolvendo a liberação de vesículas ("budding"). Aceita-se que uma mudança na forma dos eritrócitos para a forma equinocítica ou estomatocítica seja um pré-requisito para ocorrer, respectivamente, uma exo ou endovesiculação. Em concentrações ainda mais elevadas de anfifílicos a estrutura da bicamada colapsa e a célula é lisada.

Aki & Yamamoto (1990) demonstraram que a hemólise induzida por compostos hemolíticos potentes, como os fenotiazínicos, resulta na produção de um efeito térmico bastante diferente da lise induzida por outros compostos

menos potentes como anti-inflamatórios, que resultam em valores de ΔH de hemólise pouco negativos. Os experimentos de Aki & Yamamoto (1990 e 1991) são interessantes do ponto de vista da utilização da microcalorimetria como uma ferramenta analítica na discriminação de diferentes mecanismos de ação na interação de compostos químicos com biomembranas, porém, mostram resultados contraditórios entre si, os quais serão discutidos posteriormente.

Tem-se demonstrado que um número imenso de compostos químicos pode induzir hemólise em condições isosmóticas. Assim, a ação de álcoois (Seeman *et al.*, 1970; Osório e Castro *et al.*, 1990; Chi & Wu, 1990), detergentes (Helenius & Simons, 1975; Isomaa *et al.* 1986; Galembeck *et al.*, 1998), peptídeos (Ramalingam & Bello, 1992), sais de sílica (Macnab & Harington, 1967), ciclodextrinas (Weisz *et al.*, 1993) e agentes oxidantes (Cohen & Hochstein, 1964; Goldberg & Stern, 1976; Koga *et al.*, 1998) sobre eritrócitos têm sido objeto de estudo na tentativa de elucidar o mecanismo de indução de hemólise.

Estudos utilizando álcoois com comprimentos de caudas alifáticas variados mostraram a importância da hidrofobicidade na indução da hemólise. Segundo Osório e Castro e colaboradores (1990), a hemólise induzida por álcoois depende do comprimento da cadeia hidrofóbica, e resulta da introdução da cauda alifática dos álcoois longos na região hidrofóbica da membrana eritrocitária. Da mesma forma as propriedades líticas da melitina (principal polipeptídeo isolado do veneno da abelha) estão relacionadas à interação de um segmento largamente hidrofóbico com a porção hidrofóbica da membrana eritrocitária (Ramalingam & Bello, 1992).

O efeito hemolítico bifásico induzido por detergentes é bastante conhecido na literatura (Helenius & Simons, 1975; Isomaa *et al.*, 1986; Tränger & Csordas, 1987; Requero *et al.*, 1995; Galembeck *et al.*, 1998) e mostra como a concentração e propriedades de agregação destes compostos influenciam a atividade hemolítica. Tem-se verificado que a ação do detergente na membrana depende da estrutura do mesmo: características da porção polar e apolar, presença ou não de cargas, natureza dos substituintes na estrutura, etc. (Attwood & Florence, 1983). Helenius & Simons (1975) propuseram um mecanismo de ação de detergentes na solubilização de membranas que envolve três estágios distintos: (i) a ligação do detergente; (ii) a formação de micelas mistas e ruptura da membrana e (iii) a separação de lipídios e proteínas da membrana. Este modelo prevê ainda que a ruptura da membrana coincidente com a solubilização de componentes da membrana (estágio ii) somente ocorre em concentrações de detergente superiores à concentração micelar crítica. É interessante notar que o modelo proposto por

Helenius & Simons (1975) continua fornecendo subsídios para interpretações bastante recentes da ação de detergentes sobre membranas biológicas, como por exemplo no trabalho de Galembeck *et al.*, (1998), o qual descreve que o detergente não iônico polioxietileno (9,5) nonilfenol, na forma monomérica, protege eritrócitos contra hemólise hiposmótica. Provavelmente porque quando as caudas apolares inserem-se na membrana eritrocitária, as cabeças polares circundam a célula contribuindo para a diminuição da pressão osmótica na solução adjacente à membrana celular. Por esta razão, as cabeças polares destes detergentes protegeriam as células do choque hiposmótico quando as mesmas fossem introduzidas num meio hipotônico. No entanto, estes detergentes ao atingirem a CMC, formam um ambiente hidrofóbico (micelas) de alta afinidade para os fosfolipídios da membrana, provocando a eluição dos mesmos para o ambiente micelar, resultando na formação de micelas mistas e induzindo assim, a lise eritrocitária mesmo em condições isosmóticas.

Outro fator determinante de hemólise é a capacidade oxidante que muitos compostos químicos apresentam. Drogas hemolíticas como a aspirina, analina, acetanalida, fenacetina, sulfanilamidas e os agentes antimaláricos primaquina, pamaquina, e pentaquina (Cohen & Hochstein, 1964; Goldberg & Stern, 1976) são convertidas, "in vivo", em derivados auto oxidáveis, o que poderia justificar sua ação hemolítica. Estes compostos favoreceriam reações oxidativas que elevam os níveis celulares do ânion superóxido e do peróxido de hidrogênio que disparariam uma série de processos (oxidação da hemoglobina, peroxidação lipídica e inibição da glicólise) culminando na lise do eritrócito (Goldberg & Stern, 1976; Thornalley *et al.*, 1983).

Além da hidrofobicidade, da capacidade de agregação e do poder oxidativo, o grau de ionização de compostos químicos pode influenciar sua interação com membranas lipídicas. Drogas na forma neutra interagem mais eficientemente com a membrana do que na forma protonada, assim, drogas que possuem grupamentos ionizáveis tem sua interação com a membrana fortemente influenciada pela sua constante de ionização (K) e pelo ambiente da membrana já que compostos carregados serão atraídos por fosfolipídios e grupamentos de proteínas de carga oposta e repelidos por constituintes membranares de mesma carga ou zwitteriônicos (Miyazaki *et al.*, 1992; Lee & Schreier, 1993; Borissevitch *et al.*, 1995; Yushmanov & Tabak, 1995; de Paula & Schreier, 1996).

Neste trabalho, realizamos um estudo comparativo da interação de três xenobióticos (trifluoperazina, dibucaína e praziquantel) com membranas biológicas e sintéticas. As substâncias escolhidas atuam respectivamente como antipsicótico, anestésico local e antiparasitário. Pretendemos analisar o

modo pelo qual as diferenciadas propriedades físico-químicas (solubilidade aquosa, hidrofobicidade, capacidade de agregação e graus de ionização) destes compostos influenciam a interação droga-membrana.

1.5. Antipsicóticos Fenotiazínicos

Dentre os compostos antipsicóticos mais eficazes estão as fenotiazinas, os tioxantenos, as dibenzazepinas, as butirofenonas, e as indolonas. Os agentes antipsicóticos são prescritos basicamente para pacientes com distúrbios psicóticos e outras enfermidades psiquiátricas graves, principalmente esquizofrenias. Entretanto, podem apresentar outras propriedades importantes, incluindo efeitos antieméticos, antinauseantes e anti-histamínicos e a capacidade de potencializar analgésicos, sedativos e anestésicos gerais (Baldessarini, 1996).

As fenotiazinas provocam parkinsonismo e outros efeitos extrapiramidais, ações sobre o sistema cardiovascular, o sistema nervoso autônomo e funções endócrinas. Sua ação no sistema nervoso central dá-se 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). A trifluoperazina (TFP) (10-[3-(4-metil-1-piperazinil)propil]-2-trifluormetilfenotiazina) (FIGURA 2) é considerada um dos antipsicóticos fenotiazínicos mais potentes.

A interação dos agentes antipsicóticos fenotiazínicos com a membrana de eritrócitos tem sido exaustivamente estudada. Em concentrações menores que 0,1 mM, fenotiazínicos estabilizam células contra hemólise hiposmótica (Seeman & Weinstein, 1966), enquanto que acima de 0,3 mM, produzem poros na membrana (Lieber *et al.*, 1984) e promovem fusão celular (Lang *et al.*, 1984). Em resultados obtidos por ressonância paramagnética eletrônica, eritrócitos tratados com concentrações sublíticas de fenotiazínicos mostraram um aumento na liberdade de movimento de marcadores de spins do tipo ácido esteárico inseridos na bicamada, interpretado como um aumento de fluidez de membrana (Suda *et al.*, 1981).

Fenotiazínicos, assim como outros compostos catiônicos, em concentrações sublíticas promovem invaginações na membrana de eritrócitos (Deuticke, 1968; Fujii *et al.*, 1979).

Minetti & Di Stasi (1987) mostraram que os fenotiazínicos afetam o esqueleto submembranar no nível de interação com a proteína 4.1 (FIGURA 1) e seus sítios de ligação na membrana. Estes mesmos autores sugerem assim, que a desestabilização da membrana do eritrócito seja resultado de uma interação destas drogas com o esqueleto proteico do eritrócito. Esta

hipótese está de acordo com o trabalho de Ruggiero & Meirelles (1998) que mostraram por estudos de fluorescência, que o fenotiazínico trifluoperazina (FIGURA 2) interage com constituintes proteicos da membrana eritrocitária levando a um rearranjo no ambiente lipídico circunvizinho e, conseqüentemente, a uma alteração local da organização da membrana.

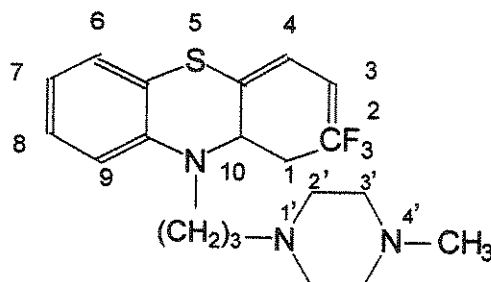


FIGURA 2: TRIFLUOPERAZINA (TFP)

1.6. Anestésicos Locais

Anestésicos locais (AL) compreendem um grande número de moléculas de diferentes estruturas químicas (amino-ésteres, amino-carbamatos, amino-cetonas, amidas, álcoois, tio-ésteres, tio-éteres, tio-amidas, derivados de uréia, ésteres fosfóricos, poliéteres e aminas simples) capazes de bloquear a condução do estímulo nervoso (Gupta, 1991).

Fisiologicamente, a excitação da membrana nervosa causa ativação da proteína canal de sódio que se abre, fazendo com que haja influxo de sódio e conseqüente despolarização da membrana. Dessa forma o impulso nervoso é produzido e o sinal elétrico é transmitido ao longo do axônio, unidirecionalmente.

Por serem moléculas anfifílicas, os AL têm grande afinidade pela membrana celular. Em membranas excitáveis do sistema nervoso, atuam diminuindo a velocidade de despolarização pela inativação dos canais de sódio, impedindo o influxo de íons necessário à despolarização da membrana (Covino & Vassalo, 1985).

Dentre algumas teorias propostas para explicar os mecanismos de ação dos anestésicos locais, podemos destacar:

- i) os AL interagiriam com a proteína canal de sódio alterando sua conformação e fechando o canal (Strichartz & Ritchie, 1987);
- ii) a teoria conhecida como "hipótese do lipídio", na qual considera-se a interação dos AL com os lipídios da membrana. Isto acarretaria alterações das propriedades estruturais e dinâmicas da matriz lipídica

(separação lateral de fases, aumento da fluidez), promovendo mudanças conformacionais na proteína canal de sódio, causando sua inativação (Lee, 1976a).

Em quaisquer das teorias hoje aceitas sobre o mecanismo de ação dos AL, considera-se que o mesmo deva passar por uma interação com a bicamada lipídica.

Um grande número de experimentos demonstraram a interação dos AL com lipídios através da observação de propriedades de membrana como variação da temperatura de transição de fases (Lee, 1976b), segregação lateral de fosfolipídios (Homby & Cullis, 1981), alteração de fluidez (Boulanger *et al.*, 1980; Bianconi *et al.*, 1988), entre outros (de Paula & Schreier, 1996). Estes estudos revelaram uma correlação direta entre a hidrofobicidade, potência e duração anestésica (Covino & Vassalo, 1985), atestando a importância da interação AL-fase lipídica membranar.

Skou (1954) foi quem primeiro demonstrou que a incorporação de AL (cocaína, procaína e tetracaína) causava a expansão de monocamadas compostas de lipídios extraídos de nervo de sapo. Semelhantemente, Seelig (1987) observou aumento da área de monocamadas de palmitoil-oleil-fosfatidilcolina (POPC), por ação da dibucaína (DBC). Em membranas de eritrócito, Seeman (1972) mostrou que a incorporação de anestésicos locais e gerais em doses clínicas também causava expansão da área de superfície em até 2%.

Dentre os anestésicos locais, escolhemos para nossos testes de interação com a membrana eritrocitária a dibucaína (2-butoxi-*N*-[(2-dietilamino)etil]-4-quinolina carboxamina) por ser amplamente utilizada e possuir uma das maiores potências anestésicas descritas (Strichartz & Ritchie, 1987). A FIGURA 3 mostra a estrutura química da dibucaína. Devido ao grande anel quinolínico e ao grupamento butila (em ligação éter no anel), o coeficiente de partição da DBC é alto em relação a outros AL. Seu anel rígido e volumoso impõe restrições à molécula e deve modular sua intercalação em membranas.

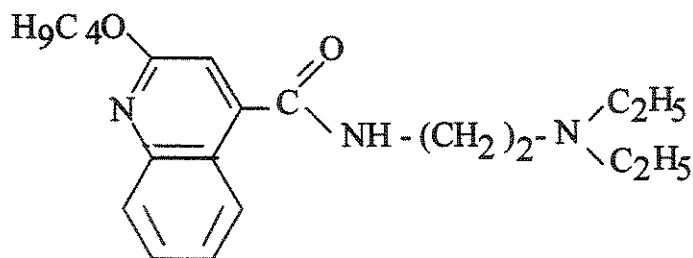


FIGURA 3: DIBUCAÍNA

O efeito protetor em hemólise hiposmótica de vários anestésicos locais e gerais, inclusive da DBC, foi descrito por Seeman (1966) e Roth & Seeman (1972). Fujii *et al.*, (1979), demonstraram que a DBC, bem como outros compostos catiônicos, tem a capacidade de induzir estomatocitose. Hägerstrand & Isomaa (1991) mostraram que a proteção induzida pela DBC era coincidente com a indução de estomatocitose.

A interação da DBC com membranas modelos e micelas têm sido investigada por várias técnicas biofísicas: ressonância magnética nuclear e eletrônica (Kuroda & Fujiwara, 1987; de Paula & Schreier, 1995), espectroscopia de fluorescência (Mertz & Lin, 1991; Barghouthi & Eftink, 1993; Louro *et al.*, 1994), microeletroferese (Ohki, 1984) e procedimentos para investigar o equilíbrio de ligação, como por exemplo, equilíbrio de diálise (Huang & Charlton, 1972; Barghouthi *et al.*, 1993). Apesar dos trabalhos acima utilizarem uma variedade bastante grande de modelos de membranas parece consenso que a DBC, por encontrar-se em pH fisiológico tanto na forma neutra como protonada, pode causar profundas modificações na organização da bicamada lipídica, resultantes da combinação de interações hidrofóbicas e eletrostáticas (Singer, 1977; Mertz & Lin, 1991; Barghouthi *et al.*, 1993; Louro *et al.*, 1994).

Uma análise termodinâmica desta interação mostrou que a afinidade intrínseca da DBC por vesículas fosfolipídicas é fraca e grandemente influenciada pelas interações eletrostáticas, as quais incluem repulsão de cargas entre as moléculas de DBC ligadas e atração entre a DBC catiônica e os grupos carregados negativamente das cabeças polares do fosfatidilglicerol (Barghouthi & Eftink, 1993). Cullis & Verkleij (1979) mostraram que a DBC protonada compete com o Ca^{++} pela interação com grupamentos fosfato da cabeça polar e, por esse mecanismo estabilizaria a fase lamelar lipídica, já que o Ca^{++} induz a formação de fase hexagonal (Hornby & Cullis, 1981).

1.7. Antihelmínticos

O praziquantel (PZQ) (2-(ciclohexilcarbonil)-1,2,3,6,7,11b-hexahidro-4H-pirazino(2,1- α)isoquinolina-4-ona) (PZQ) é um antihelmíntico de amplo espectro de ação, ativo contra a grande maioria dos platelmintos, incluindo os vermes adultos do *Schistosoma mansoni* (Lima *et al.*, 1994). Considerando que a esquistossomose ainda é uma parasitose que atinge grandes proporções nos países tropicais e que nenhuma vacina tem-se mostrado efetiva para humanos, os estudos que visam esclarecer o modo de ação e a

possível toxicidade deste composto são de relevante importância (Redman *et al.*, 1996).

O praziquantel é absorvido pelo verme adulto por difusão simples e é a molécula original a responsável pelos efeitos primários observados no verme: contração tetânica (Pax *et al.*, 1978), vacuolização e rompimento do tegumento (Bricker *et al.*, 1983; Andrews, 1985). A absorção via tegumento parece ser essencial para a atividade biológica e acredita-se que a lipofilicidade do praziquantel facilitaria a sua incorporação pelo verme através da membrana. Outros nematódeos, como a *Fasciola* e o *Paragonimus*, que possuem uma cutícula mais espessa, são refratários à ação da droga (Coles, 1979; Becker *et al.*, 1980).

O PZQ atua no tegumento e nas células musculares do *Schistosoma mansoni*. A estrutura do tegumento apresenta-se como uma complexa bicamada, na qual lipídios e proteínas organizam-se em domínios de diferentes propriedades e composição. Tem-se observado diferenças na composição da membrana dos parasitas relacionadas a variações de idade, espécie e sexo (Shaw & Erasmus, 1983; Andrews, 1985; Sabah, 1986; Rumjanek, 1987; Flisser *et al.*, 1989; Modha *et al.*, 1990). Bem como tem sido descrito que existem variações individuais na susceptibilidade à ação do PZQ, sugerindo que a composição da membrana seja um fator importante no dano induzido pelo PZQ (Vial, 1985; Rumjanek, 1987; Lima *et al.*, 1994).

As contrações induzidas pelo praziquantel no esquistossoma são dependentes de íons cálcio, porém, o fenômeno não envolve a despolarização da membrana do músculo liso do parasita (Bricker, 1982; Pax *et al.*, 1983). O praziquantel aumenta a taxa de absorção de íons cálcio (Pax *et al.*, 1979), diminui o conteúdo de íons sódio (Wolde Mussie & Bennet, 1982), causa um influxo de íons magnésio (Fetterer *et al.*, 1980) e reduz a absorção de íons potássio (Pax *et al.*, 1979).

O agente anti-helmíntico praziquantel apresenta uma ação peculiar sobre a membrana externa dos trematódios *Schistosoma mansoni*. O praziquantel insere-se no tegumento do parasita que passa a expor determinantes antigênicos na superfície do verme, resultando na ativação do sistema imunológico do hospedeiro que passa a ser altamente efetivo contra o esquistossoma (Brindley & Sher, 1987; Doenhoff *et al.*, 1987; Modha *et al.*, 1990; Lima *et al.*, 1994).

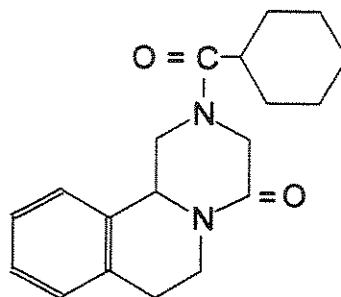


FIGURA 4: PRAZIQUANTEL

A relação entre o PZQ e o influxo de Ca^{2+} poderia sugerir que os sítios de ação do PZQ são canais permeáveis aos íons cálcio na membrana do tegumento e células musculares (Blair *et al.*, 1992). Estes canais devem ser farmacologicamente distintos dos canais de cálcio do hospedeiro, de outra maneira o PZQ seria tóxico e não terapeuticamente eficiente (Redman *et al.*, 1996).

Um mecanismo proposto para a eliminação do esquistossoma pelo praziquantel envolveria a perda da capacidade de aderência à parede de vasos sanguíneos, decorrente da paralisia induzida pela droga, e o seu deslocamento passivo para o fígado, onde seria retido e destruído por granulócitos, entre 4 a 18 dias após o tratamento (Mehlhorn *et al.*, 1981). É evidente, portanto, a ação sinérgica entre droga e o sistema imune do hospedeiro.

Permanece por ser definido o sítio específico, no nível molecular, com o qual a droga interage. Lima e colaboradores (1994) demonstraram que o enantiômero dextro-rotatório possui maior atividade que o levo-rotatório, e ainda que este último é capaz de induzir uma redução maior da difusão lateral de moléculas lipídicas, indicando diferentes maneiras de inserção de um e de outro enantiômero no tegumento do verme adulto. Schepers e colaboradores (1988) utilizando vesículas lipídicas unilamelares pequenas com uma composição lipídica semelhante à de membrana de *Schistosoma mansoni* e técnicas espectroscópicas (infra-vermelho e fluorescência) mostraram que a desestabilização promovida pela inserção do PZQ deve-se ao espaçamento do arranjo lipídico pré-existente, devido ao grande volume ocupado por esta molécula.

1.8. *Microcalorimetria Biológica*

Calorímetros são utilizados para determinação direta de quantidades de calor (q) e taxas de produção de calor ou fluxo de calor (dq/dt). O fluxo de calor produzido em um processo é proporcional à velocidade do mesmo, o que permite que os calorímetros, principalmente os microcalorímetros, também sejam usados como instrumentos para estudos cinéticos. Esta propriedade é muito freqüentemente utilizada em trabalhos envolvendo sistemas de natureza biológica (Wadsö, 1987).

Microcalorímetros são usualmente empregados em trabalhos com sistemas celulares e o termo microcalorimetria normalmente implica a presença de um instrumento muito sensível requerendo quantidades muito pequenas de amostra. Por exemplo, um microcalorímetro pode ser usado para detectar quantidades de calor na ordem de grandeza de milijoule (mJ) e a sensibilidade do fluxo de calor da ordem de grandeza de microwatt (μW).

A maioria dos microcalorímetros modernos são isotérmicos e diferenciais do tipo "tween" de condução de calor. Estes instrumentos possuem uma cela calorimétrica contendo o sistema de reação e outra o material inativo. Se a diferença de sinal é registrada, espera-se que as contribuições individuais advindas de flutuações de temperatura do sistema sejam canceladas. Esta propriedade é de especial importância nos casos onde o experimento é conduzido por períodos muito longos de tempo.

Os microcalorímetros isotérmicos de condução de calor utilizam termopilhas como sensores térmicos e são os mais sensíveis nas medidas do efeito térmico em sistemas celulares. Em condições ideais, no microcalorímetro isotérmico de condução de calor, o calor liberado é quantitativamente transferido da cela de reação para o trocador de calor, usualmente um bloco metálico onde a capacidade calorífica é muitas vezes maior que a capacidade calorífica da cela de reação o que propicia a condução isotérmica.

Normalmente o fluxo de calor é registrado pela termopilha (ou pares desta) posicionada entre a cela de reação e o bloco trocador de calor. Um esquema gráfico mais detalhado do calorímetro encontra-se no Anexo I.

O sinal do instrumento é a voltagem (mV) produzida na termopilha, que em situação ideal pode ser descrita pela equação de Tian (Wadsö, 1987):

$$P = \varepsilon (V + \tau dV / dt) \quad (1)$$

Onde P é o fluxo de calor, ε é uma constante determinada pela calibração do experimento, τ é a constante de tempo para o instrumento e dV / dt é o tempo derivativo do sinal de voltagem. O valor de τ é proporcional à condutividade térmica da termopilha. Se um fluxo de calor constante é produzido, V irá atingir um valor constante, V_s . O fluxo de calor liberado na cela é então quantitativamente balanceado pela liberação de calor para o ambiente e a equação 1 pode ser reduzida a:

$$P = \varepsilon V_s \quad (2)$$

Isto é, o fluxo de calor é diretamente proporcional ao sinal da termopilha.

Para uma boa aproximação, a equação 2 pode ser aplicada a processos onde P varia muito lentamente para tempos constantes, o que ocorre freqüentemente nos processos que envolvem células vivas.

A integração das equações 1 e 2 entre t_1 e t_2 resulta em (Wadsö, 1987):

$$q = \varepsilon \int_{t_1}^{t_2} V dt \quad (3) \quad \text{ou} \quad q = \varepsilon A \quad (4)$$

Onde A é a área sobre a curva tempo-voltagem. Se a integração é estendida ao tempo onde o sinal retorna à linha base, não é necessário conhecer a constante de tempo para determinar q .

A relação entre o efeito térmico (q) e a variação da entalpia de reação (ΔH) é dada pela equação 5 (Wadsö, 1987):

$$q = n \Delta H \quad (5)$$

Onde n = número de moles do reagente ou do produto formado. A variação de entalpia (ΔH) da reação ou interação é obtida a partir do coeficiente angular da reta somatória do efeito térmico x número de moles do reagente ou produto.

1.8.1. Aplicações da Microcalorimetria Biológica

A interação de compostos apolares como peptídios hidrofóbicos ou drogas com biomembranas é usualmente descrita pelo efeito hidrofóbico que pressupõe que os resíduos hidrofóbicos destas moléculas tenham a tendência de evitar o contato com o ambiente aquoso e penetrar no ambiente hidrofóbico da membrana lipídica (Seelig & Ganz, 1991).

Uma abordagem interessante permitida pela técnica microcalorimétrica é a detecção da entalpia de transferência de moléculas anfifílicas da fase aquosa para membranas lipídicas permitindo assim uma interpretação termodinâmica do efeito hidrofóbico (Privalov & Gill, 1989; Seelig & Ganz, 1991). É comum considerar o efeito hidrofóbico como sendo um fenômeno entrópico, isto é, que a força promotora ("driving force") da associação da molécula com a bicamada é a liberação das moléculas de água altamente organizadas ao redor da superfície apolar do soluto (Tanford, 1980). É como se as moléculas neutras em água produzissem um ordenamento das moléculas de água em torno de si mesmas de modo que a perturbação do padrão de pontes de hidrogênio da água estivesse minimizado. É justamente o ordenamento das moléculas de água pelas regiões hidrofóbicas de moléculas apolares que explica a alta entropia negativa de transferência.

No entanto, mais recentemente, tem sido descrito que as forças de atração de van der Waals, que se estabelecem entre os resíduos hidrofóbicos de alguns compostos e o ambiente hidrofóbico das membranas, confeririam ao efeito hidrofóbico uma contribuição prevalentemente entálpica (Privalov & Gill, 1989; Seelig & Ganz, 1991, Seelig, 1997). Segundo o modelo proposto por Seelig & Ganz (1991), a intercalação do anfifílico entre os lipídios induziria uma maior mobilidade das cadeias de hidrocarbonetos de modo que haveria uma expansão da bicamada por aumento da área ocupada por cada lipídio. Esta expansão da superfície da membrana requereria uma superfície de hidratação adicional. Isto sugere que o aumento da entropia devido à liberação de moléculas de água do soluto é compensada por uma igual ou maior perda de entropia devido à ligação das moléculas de água à superfície da membrana.

Uma outra abordagem interessante permitida pela técnica microcalorimétrica é a caracterização termodinâmica da hemólise induzida por drogas, embora os únicos dois trabalhos (Aki & Yamamoto, 1990, 1991) que utilizam a microcalorimetria para descrever a interação de drogas com a membrana do eritrócito apresentem algumas contradições conceituais que serão posteriormente discutidas.

2. PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS INTERNACIONAIS

Durante o desenvolvimento desta tese de Doutorado foram elaborados os seguintes artigos científicos:

- Meirelles, N.C., **Malheiros, S.V.P.**, Ruggiero, A.C., & Degterev, I.A. Mouse 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.

- **Malheiros, S.V.P.**, Meirelles, N.C., Ruggiero, A.C., Tatarskaya, A.E., Zaikov, A.E. & Degterev, I.A. Protection of erythrocytes by mouse liver microsomes and unidentified water-soluble factor against trifluoperazine (TFP) induced hemolysis. *Pharm. Chem. J.* **30 (11)**: 6-9, 1996.

- **Malheiros, S.V.P.**, Meirelles, N.C., Yushmanov, V.E., Tabak, M.; Degterev, I.A., Marangoni, S. & Toyama, M. Water soluble components of mouse liver cells protects red blood cells (RBC) against spontaneous and TFP-induced lysis. *FASEB J. Abstracts.* **11 (9)**: 758, 1997.

- **Malheiros, S.V.P.**, Meirelles, N.C.; Tatarskaya, N.K.; Zaikov, A.E. & Degterev, I.A. Biological membranes and liposomes protect red blood cells (RBC) against trifluoperazine-induced hemolysis. *Oxidation Comm.* **21 (1)**: 127-133, 1998.

Os quatro primeiros artigos referem-se ao projeto de Mestrado e, portanto, não serão aqui discutidos, embora eventualmente sejam citados. Os artigos seguintes cujos conteúdos referem-se a esta Tese de Doutorado serão apresentados a seguir e posteriormente discutidos:

a-) **Malheiros, S.V.P.**, de Paula, E. & Meirelles, N.C. Contribution of trifluoperazine/lipid ratio and drug ionization to hemolysis. *Biochim. Biophys. Acta.* **1373**: 332-340, 1998.

b-) **Malheiros, S.V.P.**, Meirelles, N.C. & Volpe, P.L.O. A critical analysis of microcalorimetric methodology for drug induced hemolysis. *Thermochimica Acta* ("in press").

c-) **Malheiros, S.V.P.**, de Paula, E. & Meirelles, N.C. Pathways involved in trifluoperazine, dibucaine and praziquantel induced hemolysis. *Biochim. Biophys. Acta* (submetido em novembro de 1998).

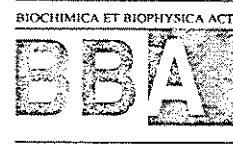
d-) **Malheiros, S.V.P.**, Brito, M.A., Brites, D. & Meirelles, N.C. Effects of trifluoperazine, dibucaine and praziquantel on erythrocyte cytotoxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* (submetido em novembro de 1998).

Obs: As letras de a-) a d-) atribuídas pela ordem cronológica de elaboração dos artigos científicos serão utilizadas para identificá-los no item Discussão desta tese.

2.1. Contribution of Trifluoperazine/Lipid Ratio and Drug Ionization to Hemolysis

Resumo

A interação do antipsicótico fenotiazínico trifluoperazina (TFP) com membranas foi investigada em termos da perturbação da fase lipídica. O coeficiente de partição (P) da TFP entre octanol/água e membranas modelo/água foi medido por separação de fases. O perfil encontrado dos valores de P em pH 7,4 foi: microssomas (7172 ± 1229) > lipossomas (1916 ± 341) > "ghosts" de eritrócito (1380 ± 429) > octanol (452 ± 55). Os experimentos hemolíticos mostraram um efeito bifásico, protetor (em baixas concentrações) e lítico acima da CMC ($42 \mu\text{M}$ em pH 7,4) do fenotiazínico. Aplicando um tratamento clássico para compostos surfactantes às curvas hemolíticas, pudemos calcular valores de P para o eritrócito íntegro. A ligação preferencial da TFP neutra à membranas em relação à ligação da TFP carregada foi comparada, já que resulta em uma diferente constante de ionização (pK_{app}) em relação a observada na fase aquosa em ausência de membrana (pK). A constante de ionização da TFP diminuiu de 8,1 (em água) para 7,62 em presença de membranas e quase a mesma razão da formas carregada/não carregada de TFP estavam presentes no pH fisiológico. Levando em conta o ΔpK , calculamos o coeficiente de partição médio entre lipossomas de fosfatidilcolina de ovo e água, em pH 7,4 ($P_{médio} = 1432$), o qual se correlacionou bem com o determinado experimentalmente ($P^{LIP} = 1916$). $P_{médio}$ é altamente influenciado pela forma neutra da TFP e discute-se a importância da razão real base/ácido sob condições fisiológicas para a atividade biológica deste composto.



Contribution of trifluoperazine/lipid ratio and drug ionization to hemolysis

Sônia Valéria Pinheiro Malheiros, Eneida de Paula, Nilce Correa Meirelles *

Department of Biochemistry, Institute of Biology, State University of Campinas (UNICAMP), P.O. Box 6109, CEP 13083-970, Campinas, SP, Brazil

Received 4 May 1998; accepted 20 May 1998

Abstract

The interaction of the antipsychotic drug trifluoperazine (TFP) with membranes was investigated in terms of lipid phase perturbation. TFP partition coefficients (P) were measured by phase separation between octanol/water and model membranes/water. The profile of P values at pH 7.4 was: microsomes (7172 ± 1229) > liposomes (1916 ± 341) > erythrocyte ghosts (1380 ± 429) > octanol (452 ± 55). Hemolytic experiments showed a biphasic, protective (at lower concentrations) and hemolytic effect above the CMC ($42 \mu\text{M}$ at pH 7.4) of the phenothiazine. By applying classical treatments for surface active compounds to the hemolytic curves, we could calculate P values in whole erythrocyte cells. The preferential binding of uncharged to charged TFP in the membrane was discussed, since it results in a ionization constant (pK_{app}) different from that observed in the aqueous phase (pK). The TFP ionization constant was decreased from 8.1 (in water) to 7.62 in the presence of membranes and almost the same ratio of charged/uncharged TFP species is present at physiologic pH. Taking into account the ΔpK , we calculated the average TFP partition coefficient between egg phosphatidylcholine liposomes and water, at pH 7.4 ($P_{\text{average}} = 1432$), which was well correlated with the measured one ($P^{\text{lip}} = 1916$). P_{average} is highly influenced by the uncharged TFP species and the real base/acid ratio under physiologic conditions was discussed in terms of its possible role in the biological activity of TFP. © 1998 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: Trifluoperazine; Erythrocyte; Hemolysis; Membrane solubilization; pK shift

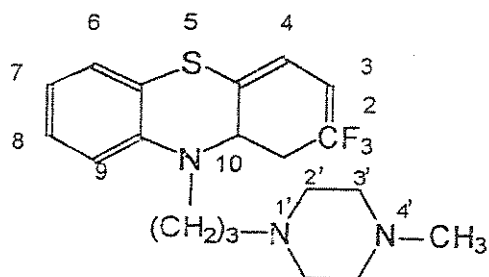
1. Introduction

Phenothiazines are known as neuroleptics and antihistaminic agents [1]. Trifluoperazine (TFP), a

phenothiazine derivative, is a widely used calmodulin antagonist and one of the most effective antipsychotic agents [2].

Abbreviations: CMC, critical micellar concentration; CPZ, chlorpromazine; C_{sat} , solute concentration for the onset of hemolysis; C_{sol} , solute concentration for total lysis; EPC, egg phosphatidylcholine; EPR, electron paramagnetic resonance; P , partition coefficient; PC, phosphatidyl choline; pK , ionization constant in water; pK_{app} , ionization constant measured in water but in the presence of a membrane; R_c , solute/lipid molar ratio; TFP, trifluoperazine; TFP⁺, charged form; TFP⁰, neutral form

* Corresponding author. Fax: +55 (19) 289-3124.



Trifluoperazine

The interaction between phenothiazines and erythrocyte membranes has been extensively studied. Seeman [3] described the biphasic effect of TFP on hemolysis: at micromolar concentration, it protects erythrocytes against hypotonic lysis, whereas at higher concentrations (> 0.1 mM) it produces hemolysis. Another phenothiazine, chlorpromazine (CPZ), produces small holes in the membrane, suggesting a colloid–osmotic lytic mechanism [4]. A sublytic CPZ concentration also imposes an inward curvature on red cell membranes [5], an effect that could be attributed to the preferential partition of phenothiazines into the negatively charged cytoplasm leaflet of the bilayer [6,7]. Suda et al. [8], using electron paramagnetic resonance (EPR), observed that CPZ produces an increase in the rotational motion of stearic acid spin labels. In a similar way, previous results from our laboratory [9] employing EPR showed an increased erythrocyte membrane fluidity upon TFP addition, accompanied by changes in the lipid–protein interactions, as seen by fluorescence. EPR studies on erythrocyte ghosts revealed that CPZ binds preferentially to ghost proteins rather than to lipids [10] and phenothiazines have been reported to interact specifically with erythrocyte membrane proteins, such as cytoskeleton protein 4.1 [11], aminophospholipid flippase [12] and acetylcholinesterase [13].

We have previously shown that TFP, an amphiphilic molecule whose protonated species form micelles, is able to protect erythrocytes against mechanical hemolysis under isosmotic conditions [14] below its critical micellar concentration (CMC). Here we report further data about TFP-induced hemolysis. Incubation of erythrocytes with TFP (above its CMC) at pH 7.4 induces mixed micelle formation

containing both TFP and erythrocyte phospholipids. The release of membrane lipids induces the collapse of the membrane (unpublished data). We quantitatively studied TFP and erythrocyte membrane interaction, to determine the effective TFP/lipid ratio for membrane activity (protection and lysis). Finally, considering that hydrophobic differences between charged and uncharged forms of TFP are determinant factors in TFP membrane interaction and that both forms are present at physiologic pH, we analyzed the contribution of each TFP species to isosmotic hemolysis.

2. Materials and methods

TFP hydrochloride (MW 480.4) and egg phosphatidylcholine (EPC) were obtained from Sigma, St Louis, MO.

2.1. Membrane preparation

Mouse liver microsomes were prepared as described previously [14]. EPC multilamellar vesicles were prepared by evaporating stock chloroform EPC solutions under a stream of wet nitrogen. The samples were left under vacuum for at least 2 h. Vesicles were obtained by the addition of phosphate-buffered saline, PBS (5 mM phosphate, pH 7.4, 150 mM NaCl), and vortexing for 5 min.

2.2. Erythrocytes

Freshly obtained mouse blood was collected into Alsiver's solution (27 mM sodium citrate/72 mM NaCl/114 mM glucose/2.6 mM citric acid) and washed three times in PBS. Erythrocyte ghost membranes were prepared as described by [15].

2.3. Protein determination

Total protein concentration was measured [16] using bovine serum albumin as a standard.

2.4. Phospholipid determination

Membrane phospholipid concentration was determined according to [17].

2.5. Partition coefficient (P) determination by phase separation

Membranes were prepared as described above and kept in PBS. A known amount of TFP was incubated with the membranes for 10 min at room temperature. The drug concentration remaining in the supernatant after centrifugation at $105\,000\times g$ for 1 h was optically detected at 256 nm ($\epsilon_M = 23\,500$, [18]) against the respective control (membrane in PBS). For red blood cells, we used ghosts rather than whole erythrocytes because hemoglobin released during the experiment overlapped the TFP optical spectra, preventing the precise determination of TFP in the supernatant. The amount of drug bound to the lipid phase was obtained by subtracting the supernatant concentration from the total drug concentration measured before phase mixing. The partition coefficient, P , was determined according to Eq. 1 [19]:

$$P = \frac{n_m(s)/V_m}{n_w(s)/V_w} \quad (1)$$

where: s denotes the solute (TFP), n is the number of moles of solute, V = volume and the subscripts m and w refer to the membrane and aqueous phase, respectively. For erythrocytes, ghosts and microsomes, the apolar phase volume (V_m) was calculated assuming a lipid density of 1 g/ml [20,21]. For EPC multilamellar vesicles, P was determined after four freeze–thawing cycles, increasing the incubation time up to 30 min.

2.6. Octanol/water P determination

PBS and n -octanol solutions were pre-equilibrated overnight; after TFP addition the mixture was vortexed for 5 min and incubated for 10 min before centrifugation at $260\times g$ for 5 min. P was optically determined as described for the phase separation experiments.

2.7. Hemolytic assay under hypotonic conditions

Erythrocytes (0.14% hematocrit) were incubated in hypotonic PBS (5 mM sodium phosphate, pH 7.4, 66 mM NaCl) that induced 50% hemolysis. TFP in the 1–125 μ M range was added and the samples were incubated for 10, 30 and 60 min. After centrifugation

at $260\times g$ for 3 min, released hemoglobin was measured in the supernatant at 412 nm. Results are expressed on a relative absorbance (RA) scale ranging from <1 (protection against) to >1 (hemolysis). RA=1 indicates 50% hemolysis obtained for the 66 mM saline control. The data were analyzed with the SAS statistical program [22]. PROC GLM programs were used for analysis of variance, with drug concentration and incubation time set as independent variables and RA as the variable answer. Means were compared by Duncan's multiple range test. Each RA value represents the mean of 15 independent experiments.

2.8. Isotonic hemolytic assay

TFP (1–200 μ M) was prepared in isotonic PBS solution. Erythrocytes (hematocrits ranging from 0.04 to 0.14%) were added and the samples kept at room temperature (22–25°C) for 10 min. before centrifugation at $260\times g$ for 3 min. Hemoglobin released into the supernatant was detected at 412 nm (for lower hematocrits) and 540 nm (0.14% hematocrit).

The hemolytic effect, measured as percent relative hemolysis (RH), was determined on the basis of released hemoglobin, according to the following formula:

$$RH = \frac{A_S - A_{c1}}{A_{c2} - A_{c1}} \quad (2)$$

where A is the absorbance, S the sample, $c1$ the mechanical hemolysis control (erythrocytes in PBS), and $c2$ the 100% hemolysis (erythrocytes in water) control.

2.9. C_{sat} , C_{sol} and TFP/lipid ratio (R_e) calculation

C_{sat} (solute concentration needed to start hemolysis) and C_{sol} (solute concentration for total lysis) [23–25] were graphically obtained for each hematocrit assayed. Plots of C_{sat} and C_{sol} as a function of lipid concentration allowed R_e (solute/lipid molar ratio) determination for initial (membrane saturation) and total hemolysis (solubilization), respectively. R_e was obtained from the slope of the resulting straight lines, as described in Eq. 3 [23–25]:

$$D_t = R_e[L + 1/K_b(R_e + 1)] \quad (3)$$

According to these authors, there is a linear relationship between the total solute concentration (D_t) producing the onset or completion of solubilization and the lipid concentration (L) in the system. The y intercept corresponds to the concentration of free solute, D_w , equivalent to its CMC [23,26]. K_b (M^{-1}) describes the solute binding to membranes in terms of equilibrium:

$$s + m \rightleftharpoons sm \quad K_b = \frac{[sm]}{[s][m]}$$

where s represents the solute and sm the membrane-associated species. Binding constants (K_b) and partition coefficients (P) are related through the partial molar volume, ∇ , of the lipid phase [27,28].

$$K_b = P \cdot \nabla \quad (4)$$

For erythrocytes, ∇ was calculated as 0.658 l/mol, the average molecular weight of phospholipids, sphingolipids and cholesterol, according to the lipid composition of erythrocyte membranes described in [15].

2.10. Determination of CMC

CMC was determined with a K12 Krüss tensiometer. We measured the surface tension of TFP solutions ranging from 0.1 to 100 μM at room temperature using PBS buffer.

3. Results and discussion

Trifluoperazine, a rather soluble piperazine derivative (water solubility at pH 7.4 is 1 M according to [18]), has an ionizable amine group with a pK of 8.1 [18] so that, as discussed further in this paper, both charged (TFP⁺) and uncharged (TFP⁰) forms are present at physiologic pH. TFP⁺ has a CMC of 42 μM (experimental data determined in PBS, pH

7.4), indicating that both monomer and aggregate forms could be found in the concentration range employed here in the hemolytic experiments.

3.1. TFP partitioning between membranes and water

Table 1 shows TFP partition coefficients (P) between membrane (microsomes, erythrocyte ghosts, liposomes) and water and octanol/water systems. We can see that TFP partition into the membranes was higher than in the isotropic octanol phase and depended on membrane composition, so that: $p^{mic} > p^{lip} > p^{ghost}$.

The P^{oct} value obtained here is of the same order of magnitude as that found for TFP partition between hexane/water (PBS, pH 7.4) = 193 [29]. Absolute P values determined between organic phases (octanol) and water were lower than P values between membranes and water (Table 1) as also reported by other authors [29,30], revealing that P values between organic solvents and water are to be used carefully since they provide only poor estimates of the relative magnitude of the partition coefficients of the drugs in biomembranes [21,31–33].

The stronger binding of TFP to microsomes may reflect some TFP protein interaction, as the protein content of liver microsomes is higher (ca. 70% of the total membrane weight, [34]) than that of ghost membranes (55%, [35]). Besides, if we consider the fluidity of the ghost membranes we realize that the high cholesterol content (30%) of erythrocyte membranes [36] and the cytoskeleton [9] imposes a rigidity that could restrict TFP partition into them, explaining the rather small p^{ghost} value. In fact p^{ghost} was slightly lower than p^{lip} , an unexpected result since liposomes lack proteins. It seems that the reduced hydrocarbon chain dynamics [36] and increased bilayer bending [37] triggered by cholesterol, added to cytoskeleton rigidity, compensate for any TFP/protein interaction in ghosts.

Table 1

Partition coefficients^a for TFP between microsomes (p^{mic}), erythrocyte ghosts (p^{ghost}), liposomes (p^{lip}) octanol (P^{oct}) and water (5 mM PBS, pH 7.4)

p^{mic}	p^{ghost}	p^{lip} ^b	P^{oct}
7172 ± 1229	1380 ± 429	1916 ± 341	452 ± 55

^aEach P value represents the mean ± S.E. of nine experiments. Incubation time = 10 min at room temperature.

^bFor p^{lip} we used four freeze-thawing cycles, increasing the incubation time to nearly 30 min.

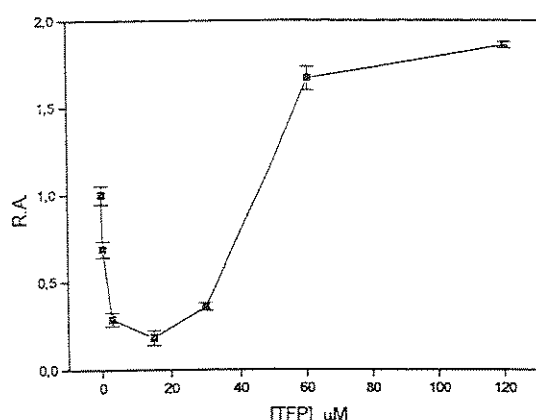


Fig. 1. TFP protection under hypotonic conditions. Hematocrit = 0.14% in hypotonic (66 mM NaCl) PBS, pH 7.4. Incubation time: 10 min at room temperature.

3.2. Studies on TFP induced hemolysis and TFP/lipid ratio determination

Phenothiazine stabilizes erythrocytes against hypotonic hemolysis at low concentration [3,37]. The biphasic TFP hemolytic curve under hypotonic conditions can be seen in Fig. 1, which shows that TFP at concentrations up to 17 μM protects erythrocytes ($H_t = 0.14\%$) against hypotonic lysis, while at higher concentrations its action on membranes is lytic (upward curve). The maximal protective concentration of TFP occurs in the 10–17 μM range, i.e. with TFP in its monomer form. The data obtained are in agreement with [3] who reported a maximal TFP protective concentration of 10 μM at pH 7.0, with a 0.2% hematocrit. Using the maximal protection average concentration we calculated the protective TFP/lipid ratio (R_c^{prot}) presented in Table 2.

Experiments like that illustrated in Fig. 1 (10 min

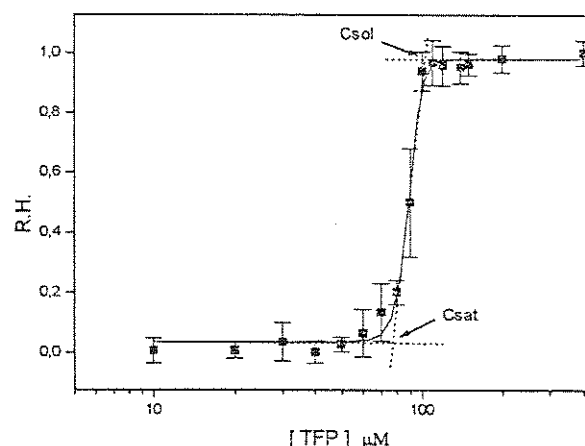


Fig. 2. TFP-induced isotonic hemolysis. Hematocrit = 0.14% in isotonic PBS. Incubation time: 10 min at room temperature. C_{sat} and C_{sol} (see text) determination are shown.

incubation) were also performed with TFP pre-incubated for 30 and 60 min. The results obtained (data not shown) presented non-significant differences by the Duncan test, indicating that TFP equilibrium between the aqueous phase and the erythrocyte membrane was reached in less than 10 min.

Fig. 2 shows the hemolytic effect of TFP on erythrocytes under isotonic condition. No lytic effect was observed below 75 μM ; up to this concentration the membrane incorporates TFP without losing its integrity. Beyond 75 μM , lysis increased quickly with TFP concentration due to the co-operative effect of the lipid bilayer. Membrane disruption occurs as lipids are released to the forming mixed-micelles.

We used hemolytic curves to obtain C_{sat} and C_{sol} values, i.e. TFP concentration for the onset and complete solubilization of erythrocyte membranes (Fig. 2). In Fig. 3, we plotted these values as a function of lipid concentration (experiments ranging from 0.15 to 1.5% hematocrit) to obtain the straight lines predicted by Eq. 3. The corresponding TFP to lipid molar ratio, R_e , (Table 2) was readily calculated from the saturation and solubilization lines in Fig. 3.

Theoretically [23], both straight lines in Fig. 3 should intercept the y axis at D_w , the free TFP concentration in water corresponding to the CMC of the amphiphilic molecule in the presence of membranes. The D_w values obtained (59 and 94 μM) closely resemble the CMC determined for TFP in water (42 μM at pH 7.4). Differences may be due to exper-

Table 2
Effective drug/lipid molar ratios and related parameters in the protection and lysis of erythrocytes by trifluoperazine

R_c^{prot} ^a	0.16
R_c^{sat}	0.43
R_c^{sol}	1.45
D_w (μM) ^b	59
K_b (M^{-1})	4783

^aDetermined under hyposmotic conditions (Fig. 1).

^bTaken from the saturation curve (Fig. 3).

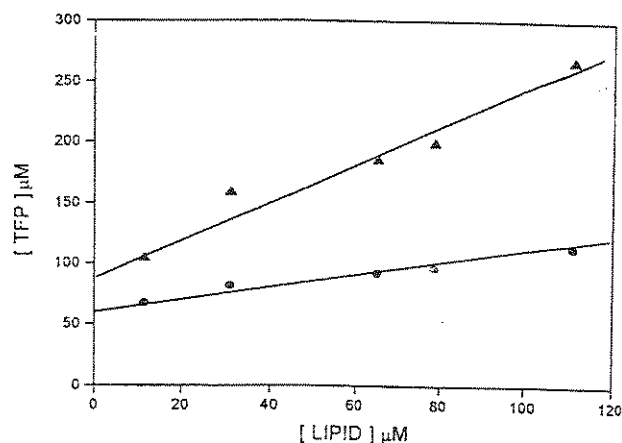


Fig. 3. Effective TFP/lipid molar ratio for membrane saturation and solubilization. C_{sat} (●) and C_{sol} (▲) are plotted as a function of erythrocyte lipid concentration. R_e values are taken from the slope of the straight lines.

imental errors, since the CMC value is very small, in the 10^{-5} M range.

This colloidal behavior of TFP to form micelles classifies it as a surface active compound [38]. Its CMC is lower than that of surfactants such as Triton X-100 (3.7×10^{-4} M), SDS (8.3×10^{-3} M) or CHAPS (3.5×10^{-3} M) [39,40], an indication of the high degree of intermolecular TFP hydrophobic interactions. In fact, TFP is among the most hydrophobic phenothiazines [29], as also shown in the present study by the very low concentration of TFP monomers in the water phase (small D_w) at pH 7.4.

Table 2 presents several parameters derived from the biphasic hemolytic experiments. At low TFP concentrations and under hypotonic conditions a maximum protective effect was observed at 0.16:1 TFP/lipid molar ratio (R_e^{prot} , determined from Fig. 1). Under isotonic conditions, R_e^{sat} showed that a ratio of 0.43:1 TFP/lipid is necessary to reach membrane saturation. Higher ratios produced hemolysis, until complete membrane solubilization at ca. 1.5:1 TFP/lipid molar ratio (R_e^{sol}). Hemolytic phenomena is then a consequence of the erythrocyte membrane phospholipids migration to the hydrophobic micelle environment. Effective detergent/lipid ratios for phospholipid leakage calculated for many other surface active drugs are in agreement with the values observed for TFP. For example, egg phosphatidyl-

choline bilayers are able to incorporate Triton X-100 up to 0.71:1 detergent/lipid molar ratios; above 3:1 molar ratios all phospholipid is converted into mixed micelles [24,41]. In phosphatidylcholine vesicles, palmitoylcarnitine reaches membrane saturation and solubilization at 0.8:1 and 2:1 molar ratios, respectively [25].

Assuming ideal mixing of lipid and TFP in dilute aqueous media [26], the binding constant (K_b) for TFP distribution between bilayer and water could be obtained from the saturation straight line in Fig. 3, according to Eq. 5 [23,26]:

$$R_e^{sat} = K_b \cdot D_w / (1 - K_b \cdot D_w) \quad (5)$$

The K_b value obtained for TFP between erythrocytes/water was $4.8 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ (Table 2) and, according to Eq. 4, it corresponds to a partition coefficient of 7268. Even considering the different methodologies employed and the well known variability in P values, this rather high partition, comparable to P^{mic} (Table 1), cannot be completely explained. It reflects, besides TFP hydrophobicity, some non-specific protein binding as, in fact, TFP specifically interacts with erythrocyte membrane proteins [11–13] and with hemoglobin [9], protecting the latter against H_2O_2 -induced oxidation.

Using this partition coefficient, we can go back to R_e^{sat} and R_e^{sol} values in order to determine the real TFP/lipid molar ratio *inside the membrane*. For a $H_t = 0.15\%$ (7.9 μg/ml lipid) just 5.4% of the TFP would be partitioned in the bilayer (Eq. 1) and the molar ratio for saturation and solubilization would be 2:100 and 8:100 TFP/lipid, respectively. This rather small ratio indicates that hemolysis is not induced by real saturation of the membrane, but is a complex response for both TFP partition into the membrane (C_{sat} , C_{sol} increase according to membrane concentration, Fig. 3), and aggregation (micelle formation). In this case TFP micellar aggregation could play a synergistic effect on the drug-membrane interaction, explaining the high partition coefficient assigned from Fig. 3.

3.3. Further investigation of the real TFP charged/uncharged ratios for the hemolytic effect at physiological pH

In a previous study, we reviewed the effect of dif-

Table 3

Partition coefficients for charged and uncharged TFP species and ionization constant in water (pK); calculations of ionization constant in the presence of membrane (pK_{app}) and average partition coefficient at pH 7.4 ($P_{average}$)^a according to pK_{app}

P^{lip}		pK^d	pK_{app}^c	$P_{average}$
TFP+ ^b	TFP: ^c			
812	2463	8.1	7.62	1432

^aCalculated by the Henderson-Hasselbalch equation, but using pK_{app} (real ionization constant under the assay condition) instead of pK (see text).

^bDetermined in 20 mM acetate buffer, pH 5.0.

^cDetermined with 20 mM carbonate buffer, at pH 10.5.

^dAccording to [18].

^eCalculated as in Eq. 6 for a hematocrit = 0.15%.

ferent partitioning of ionizable local anesthetics at their ionization constant [28]. It was shown that whenever the binding of charged/uncharged forms is different it will imply a pK shift of the partitioning compound. Tetracaine, for example, has its ionization constant down-shifted from 8.5 to 7.0 in the presence of egg PC multilamellar vesicles [42].

TFP shows quite different P values for its charged/uncharged forms (Table 3), the neutral form binding more strongly ($P^{lip} = 2463$) than the protonated, less hydrophobic species ($P^{lip+} = 812$). According to the formalism described by [43], we calculated pK_{app} , the apparent ionization constant in the presence of membranes, from:

$$pK_{app} = pK - \log[(P_- \cdot V_m + V_w)/(P_+ \cdot V_m + V_w)] \quad (6)$$

pK_{app} was found to be 7.62 for TFP in the presence of 12 μ M lipids (0.15% hematocrit, Table 3), revealing a down-shift of ca. 0.5 pH units in the presence of membranes. At higher phospholipid concentrations, calculated pK_{app} was the same.

Using pK_{app} in the Henderson-Hasselbalch equation (Eq. 7), one can see that the neutral (TFP:) to charged (TFP+) molar ratio at pH 7.4 is 1:1.5, instead of 1:4 as it would be expected if the pK shift was neglected. As a consequence, there is no predominant form of TFP in the hemolytic experiments described before (pH 7.4).

$$pH = pK + \log[\text{base}]/[\text{acid}] \quad (7)$$

An average partition coefficient can be calculated as shown by Eq. 8, taking into account the real TFP:/TFP+ ratio at pH 7.4 (using pK_{app} values). We call this $P_{average}$ (after Lee and Schreier [43], see below).

$$P_{average} = \frac{P_+ + (P_- \cdot Z)}{1 + Z} \quad (8)$$

where Z is the [base]/[acid] molar ratio at pH 7.4.

In fact, Lee and Schreier [43] described a similar equation for the calculation of $P_{average}$ that also consider the differences in pK and pK_{app} . We prefer to use Eq. 8 because it permits fast comparison of $P_{average}$, corrected or not, by changing the values of the [base]/[acid] ratio for pK_{app} and pK , respectively. The calculated values of $P_{average}$ obtained from the partition coefficients of the charged and uncharged TFP forms (measured at pH 5.0 and 10.0, respectively) between liposomes and water are listed in Table 3.

For TFP in multilamellar liposomes, the expected P value without considering ΔpK , would be 1086. $P_{average}$ is 1432, reflecting the contribution of the uncharged and charged forms of TFP to its partition at pH 7.4, and is in good correlation with the experimental value ($P^{lip} = 1916$, Table 1).

$P_{average}$ indicates that partitioning is higher than one would expect by ignoring the pK shift, so that hydrophobic membrane interaction is important for the hemolytic effect of trifluoperazine. These results explain the direct correlation between the hydrophobicity and biologic effects of phenothiazine compounds [3,7,29,44].

4. Conclusion

This work quantitatively describes the biphasic (protective/inductive) effect of TFP on mouse erythrocyte hemolysis. TFP protective effect seems to be related to its monomer insertion into the membrane, which occurs quickly at concentrations below those for membrane saturation (0.43:1, TFP/lipid molar ratios).

Above CMC, trifluoperazine solubilizes membranes. The results described should be of help in the understanding of the molecular mechanisms of hemolysis, because TFP acts as a surfactant on the

membrane system. Applying classical treatments for the interaction of surface active compounds with lipid vesicles [23] to the hemolytic curves it was possible to calculate TFP/lipid molar ratios for the onset of hemolysis (R_c^{sat}) and for complete membrane solubilization (R_c^{sol}). This approach seems to be quite adequate for the system as R_c values keep a good correlation with those determined for other surfactant molecules, and it also permitted the calculation of P values from the hemolytic curves, i.e. between whole erythrocytes and water.

Using the calculated partition coefficient, we determined rather small TFP/lipid molar ratios inside the membrane for saturation and solubilization what indicates that hemolysis is not induced by real membrane saturation, but also by TFP micelle formation that occurs in the concentration range used in the hemolytic experiments.

The amount of charged and uncharged TFP species in the hemolytic experiments was also analyzed taking into account the differences between TFP+ and TFP: binding to membranes and its effect on the real ionization constant, pK_{app} [28,42]. P_{average} , the mean partition coefficient at pH 7.4 was estimated and presented a good agreement with the data obtained. P_{average} receives an important contribution of TFP:, the uncharged species that is present in almost the same proportion as TFP+ at pH 7.4, and which stronger binding is committed to the real membrane saturation.

Acknowledgements

This work was supported by CNPq (Grant 520539-8) and CAPES. S.V.P.M. is the recipient of a fellowship from FAPESP (Grant 96/08048-5).

References

- [1] P.P. Kelder, N.J. de Mol, M.J.E. Fischer, L.H.M. Janssen, *Biochim. Biophys. Acta* 1025 (1994) 230–238.
- [2] R.S. Pereira, A.F.P. Bertocci, A.E. Vercesi, *Biochem. Pharmacol.* 41 (1992) 1–7.
- [3] P. Seeman, *Biochem. Pharmacol.* 15 (1966) 1753–1766.
- [4] M.R. Lieber, Y. Lange, R.S. Weinstein, T.L. Stick, *J. Biol. Chem.* 259 (1984) 9225–9234.
- [5] B. Deuticke, *Biochim. Biophys. Acta* 163 (1968) 494–500.
- [6] M.P. Sheetz, S.J. Singer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71 (1974) 4457–5561.
- [7] H. Aki, M. Yamamoto, *Biochem. Pharmacol.* 41 (1991) 133–138.
- [8] T. Suda, D. Shimizu, N. Maeda, T. Shiga, *Biochem. Pharmacol.* 30 (1981) 2057–2064.
- [9] A.C. Ruggiero, Ph.D thesis, Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia, UNICAMP, 1994.
- [10] T. Yamaguchi, S. Watanabe, E. Kimoto, *Biochim. Biophys. Acta* 820 (1985) 157–164.
- [11] M. Minetti, A.M.N. Di Stasi, *Biochemistry* 26 (1987) 8133–8137.
- [12] J. Rosso, A. Zachowski, P.F. Devaux, *Biochim. Biophys. Acta* 942 (1988) 271–279.
- [13] A. Spinedi, L. Pacini, C. Limatola, P. Luly, R.N. Farias, *Biochem. Pharmacol.* 44 (1992) 1511–1514.
- [14] N.C. Meirelles, S.V.P. Malheiros, A.C. Ruggiero, I.A. Degterev, *Eur. J. Drug Met. Pharmacokinet.* 19 (1994) 349–357.
- [15] J.T. Dodge, C. Mitchell, D.J. Hanahan, *Arch. Biochem. Biophys.* 100 (1963) 131–139.
- [16] O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, S. Farrar, R.J. Randall, *J. Biol. Chem.* 193 (1951) 265–275.
- [17] G. Rouser, S. Fleicher, A. Yamamoto, *Lipids* 5 (1970) 494–496.
- [18] A.C. Moffat, in: *Clarke's Isolation and Identification of drugs*, 2nd edn., Pharmac. Press, London, 1986, p. 1044.
- [19] Y. Katz, J.M. Diamond, *J. Membr. Biol.* 17 (1974) 69–86.
- [20] N.P. Franks, W.R. Lieb, *Nature* 292 (1981) 248–251.
- [21] E. Lissi, M.L. Bianconi, A.T. AmaraL, E. de Paula, L.E.B. Blanch, S. Schreier, *Biochim. Biophys. Acta* 1021 (1990) 46–50.
- [22] SAS Institute, S.A.S. Users Guide: Statistics, 6th edn., Cary, North Carolina, 1987.
- [23] D. Lichtenberg, *Biochim. Biophys. Acta* 821 (1985) 470–478.
- [24] M.A. Partearroyo, M.A. Urbaneja, F.M. Goñi, *FEBS Lett.* 302 (1992) 138–140.
- [25] M.A. Requero, F.M. Goñi, A. Alonso, *Biochemistry* 34 (1995) 10400–10405.
- [26] D. Lichtenberg, in: M. Shinitzki (Ed.), *Biomembranes. Physical Aspects*, Weinheim, 1993, pp. 63–95.
- [27] M.L. Bianconi, S. Schreier, *J. Phys. Chem.* 95 (1991) 2483–2487.
- [28] E. de Paula, S. Schreier, *Braz. J. Med. Biol. Res.* 29 (1996) 877–894.
- [29] P.J. Marroum, S.H. Curry, *J. Pharm. Pharmacol.* 45 (1993) 39–42.
- [30] S. Roth, P. Seeman, *Biochim. Biophys. Acta* 255 (1972) 207–219.
- [31] K. Kortén, K.W. Miller, *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 57 (1979) 325–328.
- [32] F.A.P.C. Gobas, J.M. Lahittete, G. Garofalo, W.Y. Shiu, D. Mackay, *J. Pharm. Sci.* 77 (1988) 265–272.
- [33] L.R. DeYoung, K.A. Dill, *Biochemistry* 27 (1988) 5281–5289.
- [34] H.J. Hird, E.J.T. McLean, H.N. Munro, *Biochim. Biophys. Acta* 87 (1964) 219–231.

- [35] R.C. Warren, *Physics and Architecture of Cell Membranes*, Adam-Hilger, Bristol, 1987, pp. 1–26.
- [36] M.R. Vist, J.H. Davis, *Biochemistry* 29 (1990) 451–464.
- [37] H.P. Duwe, E. Sackmann, *Phys. Acta* 163 (1990) 410–428.
- [38] T. Ogiso, M. Iwaki, M. Kimori, C. Tsukawaki, *Chem. Pharm. Bull.* 34 (1986) 4301–4307.
- [39] D. Attwood, A.T. Florence, in: *Surfactant Systems, Their Chemistry, Pharmacy and Biology*, 2nd. edn, Chapman and Hall, New York, 1983, pp. 124–185.
- [40] M.A. Requero, F.M. Gofñi, A. Alonso, *J. Colloid Interface Sci.* 161 (1993) 343–346.
- [41] E.A. Dennis, *Arch. Biochem. Biophys.* 165 (1974) 764–773.
- [42] S. Schreier, W.A. Frezzatti Jr., P.S. Araujo, H. Chaimovich, I.M. Cuccovia, *Biochim. Biophys. Acta* 769 (1984) 231–237.
- [43] A.G. Lee, S. Schreier, in: G. Gregoriades (Ed.), *Liposome Technology*, Vol. II, Entrapment of Drugs and Other Materials, CRC Press, Boca Raton, FL, 1993, pp. 1–25.
- [44] Y. Kanaho, T. Sato, T. Fujii, *Mol. Pharmacol.* 20 (1981) 704–708.

2.2. A Critical Analysis of Microcalorimetric Methodology for Drug-Induced Haemolysis

Resumo

O presente artigo descreve um estudo da interação de três drogas; trifluoperazina (TFP), dibucaína (DBC) e praziquantel (PZQ) com a membrana eritrocitária. A interação droga-membrana foi estudada através da determinação do coeficiente de partição das drogas entre vários sistemas de membrana e água, e também pela monitoração da atividade hemolítica. A técnica microcalorimétrica foi empregada para analisar a hemólise induzida por drogas. A TFP apresentou o maior coeficiente de partição em todas as membranas e a melhor eficácia hemolítica, seguida pela DBC e pelo PZQ. O efeito térmico da hemólise induzida por drogas foi obtido utilizando-se o microcalorímetro Thermal Activity Monitor (TAM) e os valores obtidos foram: -18.2 pJ/célula e -3.6 pJ/célula, para a TFP e DBC, respectivamente. O efeito térmico para a hemólise induzida pelo PZQ não pode ser obtido. Os diferentes valores de efeito térmico indicam que mecanismos diferenciados estão envolvidos no estabelecimento da hemólise provocada pela TFP e pela DBC. Interpretações errôneas a respeito do efeito hemolítico induzido por drogas, encontrados recentemente na literatura, nos levaram a apresentar uma análise crítica da metodologia microcalorimétrica e uma comparação entre os valores de efeito térmico aqui apresentados com os disponíveis na literatura.

A CRITICAL ANALYSIS OF MICROCALORIMETRIC METHODOLOGY FOR DRUG-INDUCED HAEMOLYSIS

Sônia V. P. Malheiros¹, Nilce C. Meirelles¹ e Pedro L.O. Volpe²

¹Department of Biochemistry, Institute of Biology, State University of Campinas (UNICAMP), CP 6109, 13083-970, Campinas, SP, Brazil, E-mail: sonia@obelix.unicamp.br ²Department of Physical Chemistry, State University of Campinas (UNICAMP), CP 6154, 13083-970, Campinas, SP, Brazil, E-mail: volpe@iqm.unicamp.br.

* Correspondence should be addressed to: Dr. Pedro L.O. Volpe, Departamento de Física Química, Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, CP 6154, 13083-970, Campinas, SP Brazil. FAX: +55-019-7883023, Tel.: +55-019-7883091

Key-words: Trifluoperazine, dibucaine, praziquantel, erythrocytes, haemolysis, partition coefficient, microcalorimetry

Abstract

The present work reports a study of the interaction of three drugs, trifluoperazine (TFP), dibucaine (DBC) and praziquantel (PZQ), with erythrocyte membranes. Drug-erythrocyte interaction was studied by measuring the drug partition coefficient between membrane and water, and also by monitoring their haemolytic activity. Microcalorimetric techniques were employed to study drug-induced haemolysis. TFP presented the highest membrane partition and best haemolytic efficacy, followed by DBC and PZQ. The heat effects of drug-induced haemolysis obtained by using a Thermal Activity Monitor (TAM) were: -18.2 pJ/cell and - 3.6 pJ/cell, for TFP and DBC, respectively. We were unable to obtain heat effect values for PZQ-induced haemolysis. The discrepancy in heat effect values of drug-induced lysis indicates that different pathways are involved in haemolysis establishment. Misunderstandings concerning the effect of drug-induced haemolysis, found in the recent literature, lead us to present a critical analysis concerning microcalorimetric methodology and a comparison between the heat effect values obtained in this work with the values available in literature.

1. Introduction

The erythrocyte (red blood cell) membrane is the most studied biological membrane since it can be copiously obtained by venous puncturing and also easily isolated by low speed centrifugation. Consequently, the erythrocyte membrane has become the most used model for drug membrane interaction and has provided a large quantity of information of clinical interest.

Haemolysis is the disruption of the red blood cell which can be caused by the interaction of chemical compounds with the membrane. Many substances have been described as haemolytic agents, including important groups such as anaesthetics, anti-inflammatory and neuroleptic drugs [1,2].

The effect of a drug on the erythrocyte membrane can be attributed to two main steps: (i) the entrance into the bilayer and (ii) the intensity of the membrane-perturbing action of the molecule once incorporated [3]. Some factors are considered determinant in haemolysis establishment: the compound's hydrophobicity, the presence of an ionizable group and the size of the compound.

Although drug-induced haemolysis has been studied since 1937 [4], the nature of drug-membrane interaction is not clearly elucidated. We have been studying haemolysis caused by drugs in order to discriminate the possible different pathways that culminate in cell lysis [5-7]. The comparative analysis of drug partition coefficients between different environments can discriminate possible drug interaction with specific components of the membrane (lipid or protein).

In the present report, we have used a pure lipid phase (liposomes), a membrane which has a high content of protein (70 %) (microsomes) and the erythrocyte membrane to compare the drug partition coefficients between them and water. We also have investigated the different drug membrane interaction by monitoring their haemolytic activity. The chosen drugs are trifluoperazine (TFP), a potent antipsychotic agent, dibucaine (DBC), a local anesthetic, and praziquantel (PZQ), an antihelminthic compound.

Microcalorimetry is a useful tool that has been increasingly employed in medical and biological areas [8]. In this work we observed significant differences between heat effect values of drug-induced lysis. These differences indicate that different pathways are involved in haemolysis establishment, which are consistent with other haemolytic parameters (kinetic, lytic efficacy and partition coefficient).

However, besides erythrocyte metabolism (basal erythrocyte heat production), which has been calorimetrically studied by certain research groups [9-14] there are very few reports in the literature describing thermodynamic parameters in drug-erythrocyte interactions. These few published results present some conceptual contradictions: Aki and Yamamoto, 1990 [15], calorimetrically measured the drug-erythrocyte interaction denoting the endothermic heat effect obtained as enthalpy of haemoglobin released from one cell (ΔH hemol), while in their next article [16], they call the same process as heat effect of haemoglobin. Although, in module, the heat effect values presented in this report are equal to Aki and Yamamoto, 1991 [16] the signal is the opposite (exothermic). Since our results are not in agreement with some recent literature data cited above, [15,16], we also present some methodological considerations based on our experimental work that can be useful for subsequent work.

2. Materials and Methods

TFP hydrochloride, DBC dihydrochloride and egg phosphatidylcholine (EPC) were obtained from Sigma Chemical Co., St Louis, MO. PZQ was donated by MERCK S.A. Indústrias Químicas, RJ, Brazil.

2.1. Membrane preparation.

Mouse liver microsomes were prepared as described previously in ref. [5].

EPC multilamellar vesicles were prepared by evaporating stock chloroform EPC solutions under a stream of wet nitrogen. The samples were left under vacuum for at least 2 h. Vesicles were obtained by the addition of phosphate buffered saline, PBS (0.15 M NaCl, 5 mM phosphate, pH 7.4), and vortexing for 5 min.

Erythrocytes. Freshly obtained mouse blood was collected into Alsever's solution (27 mM sodium citrate / 72 mM NaCl / 114 mM glucose / 2.6 mM citric acid) and washed three times in PBS.

Erythrocyte ghost membranes were prepared as described in ref. [17].

Protein determination. Membrane protein concentration was measured as in ref. [18], using bovine serum albumin as a standard.

Phospholipid determination. Membrane phospholipid concentration was determined according to ref. [19].

2.2. Partition coefficient (*P*) determination by phase separation

Membranes were prepared as described above and kept in PBS. A known amount of drug was incubated with the membranes for 10 min at room temperature. The drug concentration remaining in the supernatant after centrifugation at 105 000 X *g* for 1 h was optically detected against the respective control (membrane in PBS). The drug absorbance was performed at 256 nm ($\epsilon_M = 23500$) for TFP [19], at 324 nm ($\epsilon_M = 3770$) for DBC [experimental data] and 260 nm ($\epsilon_M = 320$) for PZQ [experimental data]. For erythrocytes, we used ghosts rather than whole cells because haemoglobin released during the experiment overlapped the optical spectra of the drugs, preventing their precise determination in the supernatant. The amount of drug bound to the apolar phase was obtained by subtracting the supernatant concentration from the total drug concentration, measured before phase mixing. The partition coefficient, *P*, was determined according to equation 1 [21]:

$$P = \frac{n_m(s)/V_m}{n_w(s)/V_w} \quad (1)$$

where *s* denotes the solute (TFP, DBC or PZQ), *n* is the number of moles of solute, *V* = volume and the subscripts *m* and *w* refer to the membrane and aqueous phase, respectively. For erythrocytes, ghosts and microsomes, the apolar phase volume (*V_m*) was calculated assuming a lipid density of 1 g/mL [22-24]. For EPC multilamellar vesicles, *P* was determined after four freeze-thawing cycles, increasing the incubation time up to 30 min.

2.3. Haemolytic assay

TFP (1-400 μ M) and PZQ (0.01-20 mM, previously dissolved in dimethylsulphoxide, DMSO, with a maximal DMSO concentration of 5 %, were prepared in PBS, pH 7.4. DBC (0.1-10 mM) was dissolved in PBS, pH 6.8, in order to increase its solubility. Erythrocytes (1 % haematocrit) were added and the samples kept at room temperature (22-25°C) until total lysis occurred. The incubation time was 10 min for TFP, 30 min for DBC and 90 min for PZQ. The samples were then centrifuged at 260 X *g* for 3 min and the haemoglobin release into the supernatant was detected at 540 nm.

The haemolytic effect, measured as percent relative haemolysis (RH), was determined on the basis of released haemoglobin, according to the following formula:

$$RH = \frac{A_s - A_{c1}}{A_{c2} - A_{c1}} \quad (2)$$

where A means absorbance, S denotes the sample, c1, the mechanical haemolysis control (erythrocytes in PBS) and c2, the 100 % haemolysis (erythrocytes in water).

2.4. Microcalorimetric assay

Heat of interaction between drugs and erythrocyte membranes were carried out in a model 2277 Thermal Activity Monitor (TAM) system (Thermometric AB, Sweden), which consists of four independent isothermal heat-conduction microcalorimeters [25]. The heat flow signal (dq/dt) in μW was monitored as a function of time. The TAM microcalorimeter was previously calibrated using the protonation reaction of tris-(hydroxymethyl)aminomethane (Tris) solution with HCl solution as recommended by [26]. The heat effect of drug dilution (Q_{dil}) and of drug-erythrocyte membrane reaction (Q_{react}) were obtained by integrating the heat flow curve over the reaction time. All experiments were performed at 25 °C using a stirring speed of 120 rpm. Two mL of erythrocyte suspension ($1.14 \cdot 10^8$ cell/mL) in isotonic PBS, pH 7.4, were introduced into the calorimeter titration vessel and kept until the base line was stable. Subsequently, the drug solution was added in a concentration sufficient to induce total lysis (250 μM TFP and 6 mM DBC). DBC addition was divided into two successive steps, 3 mM in each, in order to reduce the heat dilution signal to less than the working scale (30 μW). Drug solutions were introduced at equal flow rates (1 $\mu L/sec$) into the reaction vessel using a two channel peristaltic pump (model 612 Lund Syringe Pump 2, from Thermometric AB). The heat effect of drug dilution (Q_{dil}) into the same isotonic buffer was measured separately and subtracted from the heat effect obtained in the reaction where cells were present (Q_{react}), in order to obtain the interaction heat (Q_{hem}), which corresponds to the heat effect of drug-induced haemolysis.

3. Results and Discussion

3.1. Drug Partitioning between membranes and water

Table I shows TFP, DBC and PZQ partition coefficients (P) between membranes (microsomes, erythrocyte ghosts, liposomes) and water. TFP partition into membranes, in all cases, was higher than those of DBC and PZQ, except in liposomes when TFP and DBC P values are similar, revealing that TFP has a greater affinity for the membranes than the other drugs. This affinity difference indicates the specificity of the interaction pathway of drugs into membranes. There is evidence that other phenothiazines bind to erythrocyte membrane protein [27-28]. Ruggiero,

1994, [29], using ESR, showed that TFP, specifically, binds to erythrocyte membrane protein and triggers changes in the protein structural arrangement. Moreover, some authors [30-32], using phospholipid vesicles, obtained evidence that DBC interacts in the interface between water and the external monolayer.

The stronger binding of TFP to microsomes may reflect some TFP protein interaction, as the protein content of liver microsomes is higher (ca. 70% of the total membrane weight [33]) than that of ghost membranes (55 % [34]). In addition, if we consider the fluidity of the ghost membranes we realize that the cytoskeleton [29] and the high cholesterol content [35] impose rigidity, restricting TFP partition into them, that can explain the rather small P^{GHOST} value. In fact P^{GHOST} was slightly lower than P^{LIP} , an unexpected result since liposomes lack proteins. This fact suggests that cytoskeleton rigidity compensates for any TFP/protein interaction in ghost membranes.

3.2. Haemolytic curve

Fig. 1 shows a sigmoidal curve characteristic of the haemolytic effect. No lytic effect was observed below 108 μM TFP, a range in which the membrane incorporates TFP without losing integrity. Beyond 108 μM lysis increases quickly with TFP concentration due to the co-operative effect of the lipid bilayer. We used haemolytic curves to obtain C_{sat} and C_{sol} values, i.e., the drug concentration for (i) the onset and (ii) complete solubilization of erythrocyte membrane (Fig.1).

Table II presents C_{sat} and C_{sol} of TFP, DBC and PZQ obtained from their respective haemolytic curves (see procedures described in Materials and Methods).

Comparing the haemolytic activity of these three drugs at the 1 % haematocrit, we can see that the total lysis induced by TFP (C_{sol}) occurs at a very low concentration (184 μM) with a short incubation time, 10 min, while DBC, to induce the same effect, needs a concentration twenty times greater, 4 mM, and an incubation time equal to 30 min. For PZQ, the concentration needed for total lysis is 14.2 mM with an incubation time of 90 min.

According to ref. [3], the haemolytic properties are related to the partition properties into erythrocyte membrane. TFP, the drug that best interacts with erythrocyte membrane has a higher P value and is the most effective haemolytic drug, followed by DBC and PZQ.

3.3. Microcalorimetric assay

Fig. 2 (for TFP) and Fig. 3 (for DBC), show the heat effect of drug dilution in the absence of red blood cells (A) and the heat effect of drug-induced haemolysis (B). Table III summarizes the heat effect of TFP and DBC dilution (Q_{dil}), the total system heat effect of drug-induced haemolysis (Q_{react}) (without subtraction of (Q_{dil})) and the heat effect of drug-induced haemolysis (Q_{hem}). In both cases, we can see that drug dilution is endothermic while drug-induced haemolysis culminates in an exothermic process.

Fig. 2 shows that the heat of TFP-induced haemolysis is exothermic (B) while the TFP dilution process is endothermic (A). These results are not in agreement with AKI & YAMAMOTO [15], who reported the heat effect of TFP-induced haemolysis as an endothermic enthalpy ($\Delta H = 19.6 \pm 1.9$, in pJ/cell), mistaking the concept and the unit of enthalpy. However, considering the absolute values, the results of the study of heat effect for TFP-induced lysis are similar (in this work, 18.2 ± 0.9 pJ/cell and in ref. [15], 19.6 ± 1.9 pJ/cell). In a later publication [16], the same authors report a large negative value of ΔH for TFP-induced haemolysis, contradicting themselves.

The heat of DBC-induced haemolysis (-3.6 pJ/cell) (Table III) is about four times less than the value for TFP. Even using a much higher DBC concentration to reach complete haemolysis, the heat of DBC-induced lysis was lower indicating that its affinity for the membrane is smaller, in agreement with the P values obtained. This fact indicates that the specific interaction of DBC with the erythrocyte membrane is weak, as previously described in ref. [30,31], while TFP shows a stronger interaction (high P values, high haemolytic efficacy and exothermic heat of induced haemolysis). Unfortunately, the very high exothermic dilution heat effect of PZQ has hidden its weak induced lysis thermal activity.

3.4. Critical methodological analysis

There is but a few literature references concerning microcalorimetric studies of drug-induced haemolysis. The available data for this process has been interpreted as to the enthalpy change of the haemoglobin released from one red cell (ΔH_{hemol}) [15]. In another report, however, the same authors consider this process as occurring in two parts: first, an exothermic process, arising from drug binding to erythrocyte and, second, an endothermic one, corresponding to the heat of dilution of haemoglobin released from erythrocyte [16]. The haemolytic phenomena should be considered as a result of a series of events (loss of drug hydration shell,

drug specific membrane interaction, structural membrane rearrangement, haemoglobin and cell content release) that might occur simultaneously or not. Since calorimetry is a non-specific technique, the observed heat effect can not identify any particular event and shows the overall outcome of these process.

The experience achieved during this work lead us to avoid the calorimetric titration procedure described by [16]. Since the drug membrane interaction occurred partially in each drug addition, the weak calorimetric responses of this interaction were always superposed by the much more expressive drug dilution effect. In addition, we noted that erythrocytes sediment during the long period demanded by the titration technique. Due to the above considerations, we present the described protocol, in which drug is added once or, in the case of DBC, in two portions, which favors membrane interaction sign determination and reduces the total experimental time.

4. Conclusion

The erythrocyte membrane interaction of the drugs TFP, DBC and PZQ studied in this work showed a strong correlation between the drug membrane partition (P) and the disruption of the red blood cell membrane (haemolysis). Since the drug membrane exothermic heat effect of haemolysis (Q_{hem}), which reflects the totality of events that culminates in haemolysis, is directly correlated with the partition coefficients, it suggests that (Q_{hem}) is mainly reflecting drug erythrocyte membrane interaction.

The proposed protocol to study drug erythrocyte membrane interaction by calorimetry provides precise and confident results.

Acknowledgements

This work was supported by CNPq (Grant 520539-8) and CAPES. S.V.P.M. is the recipient of a fellowship from FAPESP (Grant 96/08048-5).

5. References

- [1] P. Seeman, *Biochem. Pharmacol.*, 15 (1966), 1753.
- [2] P. Seeman and S. Roth, *Biochim. Biophys. Acta*, 255 (1972) 207.
- [3] Y. Kanaho, T. Sato and T. Fujii, *Mol. Pharmacol.*, 20 (1981) 704.
- [4] O. Gessner, M. Walther and K. Reinhardt, *Naunym-Schmiedeberg's Arch. Exp. Path. Pharmacol.*, 186 (1937) 329.
- [5] N. C. Meirelles, S. V. P. Malheiros, A. C. Ruggiero and I. A. Degterev, *Eur. J. Drug Met. Pharmacokin.*, 19 (1994) 349.
- [6] S. V. P. Malheiros, N. C. Meirelles, A.C. Ruggiero, N. K. Tatarskaya, A. E. Zaikov, and I.A. Degterev, *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 30 (1996) 6.
- [7] S. V. P. Malheiros, N. C. Meirelles, N. K. Tatarskaya, A. E. Zaikov, and I. A. Degterev, *Oxidation Communications*, 19 (1997) 1.
- [8] M.J. Koenigbauer, *Pharmaceutical Research*, 6 (1994) 777.
- [9] M. Monti and I. Wadsö, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 32 (1973) 47.
- [10] M. Monti and I. Wadsö, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 36 (1976) 573.
- [11] J. Grarup, E. Hasselager and M. Hjelm, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 37 (1977) 85.
- [12] B. Fagher, H. Liedholm and M. Monti, *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 45 (1993) 571.
- [13] T. Issauter, H. Kovacic, P. Gallice, D. Raccach, P. Vague and A. Crevat, *Clin. Chim. Acta*, 228 (1994) 161.
- [14] H. Kovacic, P. Gallice, P. Brunet, Y. Berland and A. Crevat, *Clin. Chim. Acta*, 259 (1997) 31.
- [15] H. Aki and M. Yamamoto, *Biochem. Pharmacol.*, 39 (1990) 396.
- [16] H. Aki and M. Yamamoto, *Biochem. Pharmacol.*, 41 (1991) 133.
- [17] J. T. Dodge, C. Mitchell and D. J. Hanahan, *Arch. Biochem. Biophys.*, 100 (1963) 131.
- [18] O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, S. Farrah and R. J. Randall, *J. Biol. Chem.*, 193 (1951) 265.
- [19] G. Rouser, S. Fleicher and A. Yamamoto, *Lipids*, 5 (1970) 494.
- [20] A. C. Moffat, *Clarke's Isolation and Identification of drugs*, The Pharmac. Press, London, 2nd. edn., 1986.
- [21] Y. Katz and J. M. Diamond, *J. Membr. Biol.*, 17 (1974) 69.
- [22] N. P. Franks and W. R. Lieb, *Nature*, 292 (1981) 248.
- [23] M.R. Lieber, Y. Lange, R. S. Weinstein and T. L. Stick, *J. Biol. Chem.*, 259 (1984) 9225.
- [24] E. Lissi, M. L. Bianconi, A. T. AmaraL, E. de Paula, L. E. B. Blanch and S. Schreier, *Biochim. Biophys. Acta*, 1021(1990) 46.
- [25] J. Suurkuursk and I. Wadsö, *Chem. Scr.* 20 (1982) 155.
- [26] I. Wadsö, *Acta Chem. Scand.*, 22 (1968) 927.
- [27] M. Minetti and A. M. N. Di Stasi, *Biochemistry*, 26 (1987) 8133.

- [28] P. J. Marroum and S. H. Curry, *J. Pharmac. Pharmacol.*, **45** (1993) 39.
- [29] A. C. Ruggiero, Ph.D thesis, Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia, UNICAMP (1994).
- [30] S. Barghouthi, R. Puri and M. R. Eftink, *Biophys. Chem.*, **46** (1992) 1.
- [31] S. Barghouthi and M. R. Eftink, *Biophys. Chem.*, **46** (1993) 13.
- [32] I. Ueda, J. Chiou, P. R. Krishna and H. Kamaya, *Biochim. Biophys. Acta*, **1190** (1994) 421.
- [33] H. J. Hird, E. J. T. Mclean and H. N. Munro, *Biochim. Biophys. Acta*, **87** (1964) 219.
- [34] R. C. Warren, *Physics and architecture of cell membranes*, Adam-Hilger, Bristol and Philadelphia. (1987) pp. 1-26.
- [35] M. R. Vist and J. H. Davis, *Biochemistry*, **29** (1990) 451.

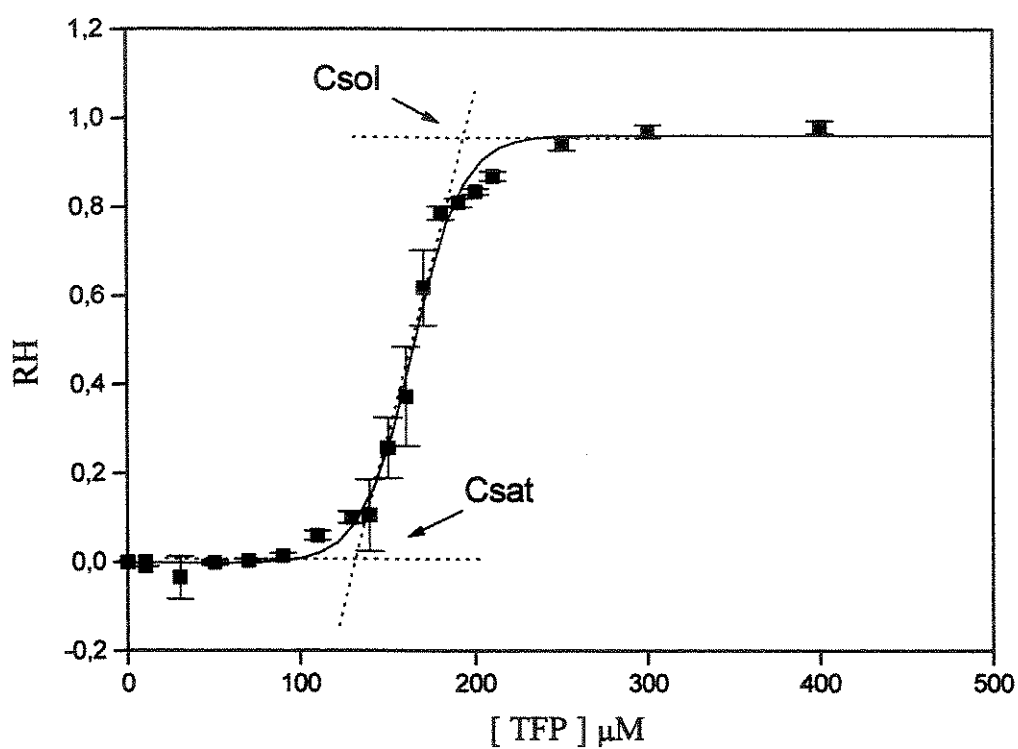


Fig. 1: TFP-INDUCED ISOTONIC HAEMOLYSIS. Haematocrit = 1 % in 5 mM PBS, pH 7.4, incubation time = 10 min at room temperature. C_{sat} and C_{sol} (see text) are shown.

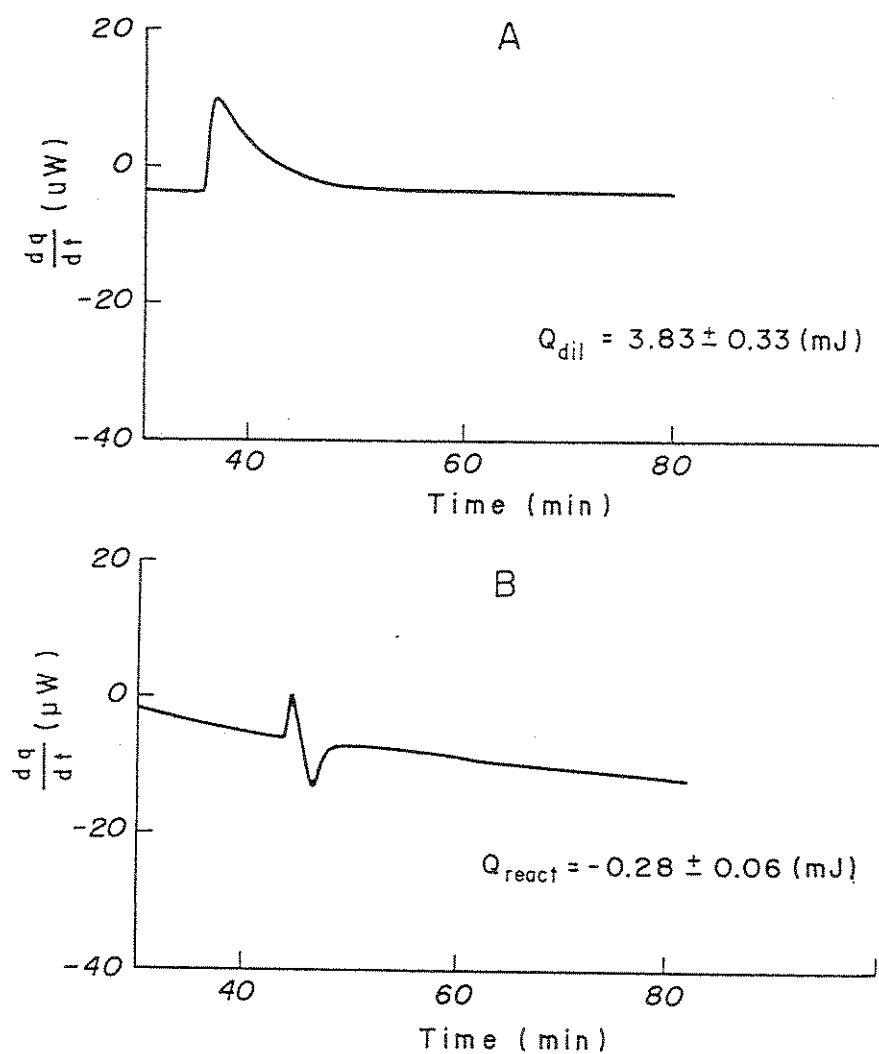


Fig. 2: HEAT EFFECT OF TFP DILUTION AND OF TFP-INDUCED HAEMOLYSIS. A) TFP, 250 μM dilution in PBS, pH 7.4 B) TFP, 250 μM dilution in erythrocyte suspension (haematocrit = 1 %).

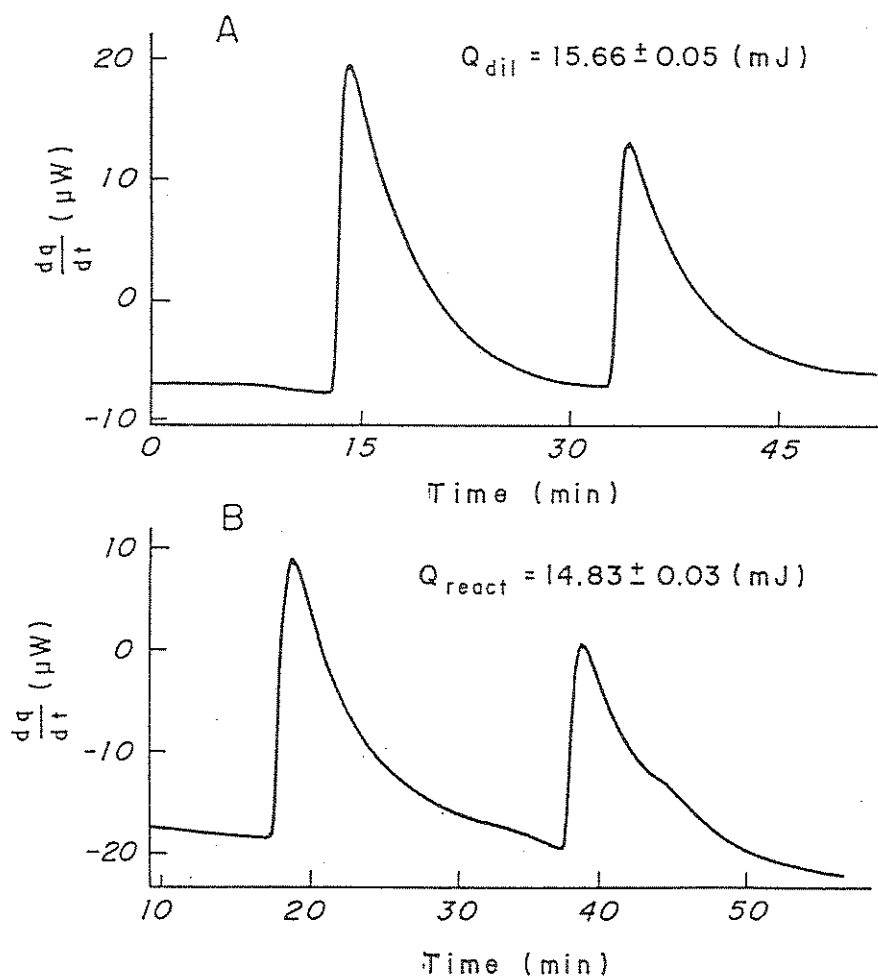


Fig. 3: HEAT EFFECT OF DBC DILUTION AND OF DBC-INDUCED HAEMOLYSIS. A) two step 6 mM DBC dilution in PBS, pH 6.8 B) two step 6 mM DBC dilution in erythrocyte suspension (haematocrit = 1 %).

TABLE I: Partition coefficients^a for TFP, DBC and PZQ between microsomes (P^{MIC}), erythrocyte ghosts (P^{GHOST}) and liposomes (P^{LIP}) vs water (PBS)

	P^{MIC}	P^{GHOST}	P^{LIP} ^c
TFP	7172 ± 1229	1380 ± 429	1916 ± 341
DBC ^b	793 ± 119	375 ± 62	2219 ± 436
PZQ	488 ± 179	210 ± 52	^d -

^a Each P value represents the mean ± SEM of nine experiments; samples in PBS, pH 7.4, incubation time 10 min, room temperature. ^b For DBC experiments, pH 6.8 PBS, was used. ^c For P^{LIP} , we used four freeze-thawing cycles which increased the incubation time to nearly 30 min. ^d P^{LIP} values for PZQ were not obtained due to high scattering that overlaid PZQ absorbance ($\lambda = 324$).

TABLE II: Haemolytic concentrations of TFP, DBC and PZQ

	<i>C_{sat}</i> (μ M)	<i>C_{sol}</i> (μ M)
TFP ^a	108	184
DBC ^b	2300	4000
PZQ ^a	2570	14200

^a Samples in PBS, pH 7.4, incubation time of 10 and 90 min for TFP and PZQ, respectively, at room temperature. ^b For DBC experiments, PBS, pH 6.8, an incubation time of 30 min and room temperature were used.

TABLE III: Heat effect^a of drugs dilution (Q_{dil}), drug erythrocyte total reaction (Q_{react}) and drug-induced haemolysis (Q_{hem})^b

	Q_{dil} (mJ)	Q_{react} (mJ)	Q_{hem} (mJ)	Q_{hem} (pJ/cell)
TFP	3.83 ± 0.33	-0.28 ± 0.06	-4.1 ± 0.2	-18.2 ± 0.9
DBC	15.66 ± 0.05	14.83 ± 0.03	-0.83 ± 0.04	-3.6 ± 0.01

^a Each Q value represents the mean $\pm$ SEM of at least four experiments.

^b Q_{hem} corresponds to $Q_{react} - Q_{dil}$.

2.3. Pathways Involved in Trifluoperazine-, Dibucaine- and Praziquantel-Induced Hemolysis

Resumo

A interação do antipsicótico trifluoperazina (TFP), do anestésico local dibucaína (DBC) e do antihelmíntico praziquantel (PZQ) com membranas de eritrócito foi analisada a fim de interpretar o efeito hemolítico destes compostos. Coeficientes de partição (P) destes compostos entre n -octanol e membranas modelo/água, em pH 7,4, foram determinados. O perfil foi $P^{TFP} > P^{DBC} > P^{PZQ}$ em todos os sistemas estudados (microssomas, lipossomas, "ghosts" de eritrócito e n -octanol/água). A contribuição das formas carregada/não carregada da TFP e DBC foi analisada, desde que resulta em maiores valores de P para a TFP em pH 7,4. A hemólise foi bifásica em todos os casos, i.e., inicialmente protetora, e lítica para concentrações de droga mais altas. A concentração hemolítica de TFP foi coincidente com sua CMC. Aplicando às curvas hemolíticas um tratamento clássico para compostos surfactantes, calculamos as razões molares efetivas droga/lipídio para o início (Re^{SAT}) e completa solubilização da membrana (Re^{SOL}). Este tratamento aparentemente somente prestou-se bem para a TFP. Alternativamente, uma análise quantitativa utilizando nossos valores de P forneceu resultados mais razoáveis: Re^{SAT} e Re^{SOL} foram 0,06 e 0,09 para TFP, 0,34 e 0,69 para DBC e 0,25 e 1,89 para o PZQ, indicando que a taxa de remoção dos lipídios da bicamada é determinante para a hemólise e que a micelização da TFP facilita o efeito hemolítico enquanto uma real saturação da membrana ocorre no caso da DBC e do PZQ.

PATHWAYS INVOLVED IN TRIFLUOPERAZINE-, DIBUCAINE- AND PRAZIQUANTEL-INDUCED HEMOLYSIS

Sônia Valéria Pinheiro Malheiros, Nilce Correa Meirelles and Eneida de Paula*

Department of Biochemistry, Institute of Biology, State University of Campinas (Unicamp), P.O. Box 6109, CEP 13083-970, Campinas, SP, Brazil.

* Corresponding author: Fax: +55-19-2893124

Key-words: erythrocyte, surfactant, membrane, partition, ionization.

Summary

The interaction of the antipsychotic trifluoperazine (TFP), the local anesthetic dibucaine (DBC) and the antihelminthic praziquantel (PZQ) with erythrocyte membranes was analyzed to interpret the hemolytic effect of these agents. Their partition coefficients (P) were measured at pH 7.4 between *n*-octanol and model membranes/water. The profile was $P^{TFP} > P^{DBC} > P^{PZQ}$ in all studied systems (microsomes, liposomes, erythrocyte ghosts and *n*-octanol/water). The contribution of charged/uncharged forms of TFP and DBC was analyzed, since it results in higher P values for TFP at pH 7.4. Hemolysis was always biphasic, i.e., initially protective and then lytic, at higher drug concentrations. The hemolytic concentration of TFP was coincident with its CMC. By applying classical surface-active compound treatment to the hemolytic curves, we calculated the effective drug:lipid molar ratios for the onset (Re^{SAT}) and complete membrane solubilization (Re^{SOL}). The approach apparently fitted well just for TFP. Alternatively, a quantitative analysis using our P values gave more reasonable results: Re^{SAT} and Re^{SOL} were 0.06 and 0.09 for TFP, 0.34 and 0.69 for DBC and 0.25 and 1.89 for PZQ, indicating that the rate of lipid removal from the bilayers is determinant for hemolysis and TFP micellization facilitates its hemolytic effect while real membrane saturation is reached for DBC and PZQ.

1. Introduction

Erythrocyte membranes have been extensively studied since the cells can be copiously obtained by venous puncture and the membranes are easily isolated by low-speed centrifugation [1]. Consequently, erythrocytes have become a good model for drug-membrane interaction, providing information concerning, for instance, changes in lipid composition or in cytoskeleton [2], enzymes [3] or other membrane proteins [4].

The information obtained using erythrocytes as a model is especially important when the drugs under study have their site of action at the membrane level, such as antipsychotic agents [5-7] and local anesthetics [8].

Hemolysis is the disruption of the red blood cell which can be caused by the interaction of chemical compounds with the membrane. The hemolytic activity of many amphiphilic substances, including anesthetic, antiinflammatory and neuroleptic drugs have been described by Seeman early in 1966 [9]. According to Kanaho and coworkers [10], the effect of a drug on the erythrocyte membrane can be attributed to two main phenomena: its insertion into the membrane and the intensity of the membrane-perturbing action of the molecule once incorporated. Once inside the membrane, the drug can occupy specific (protein) and/or nonspecific (lipid) binding(s) site(s). Some factors are considered determinant in hemolysis establishment: the hydrophobicity of the compound and the presence of an ionizable group [11].

We have recently published a quantitative study of the interaction of the phenothiazinic antipsychotic agent trifluoperazine (TFP) with the erythrocyte membrane in which we determined the TFP/lipid ratio for erythrocyte membrane protection or lysis [12]. In the present study we report the interaction of three different drugs with erythrocyte membranes by measuring their partition coefficients between membrane and water and by monitoring their hemolytic activity (protection or lysis). The comparison of these drugs takes into account the drug/lipid molar ratio to achieve the membrane protection and disruption, as well as the contribution of partitioning, drug micellization and ionization to the hemolytic process. The chosen drugs were TFP, the local anesthetic dibucaine (DBC) and praziquantel (PZQ), an antihelminthic compound (Fig. 1). It is interesting to note that while the interaction of TFP [3,9,11-20] and DBC [9,13,15,17] with erythrocytes has been extensively studied, this is - to our knowledge - the first report concerning PZQ.

2. Material and Methods

TFP hydrochloride, DBC hydrochloride and egg phosphatidylcholine (EPC) were obtained from Sigma Chemical Co., St Louis, MO. Praziquantel was kindly donated by Merck S.A. Indústrias Químicas, São Paulo, SP.

Membrane preparation. Mouse liver microsomes [20], EPC multilamellar vesicles and mouse erythrocyte membranes were prepared as described previously [12]. Erythrocyte ghost membranes were prepared as described by [21].

Protein and phospholipid concentrations were determined according to [22,23].

Partition coefficient (P) determination by phase separation. A known amount of drug was incubated for 10 min. with the membranes, kept in PBS (150 mM NaCl, 5 mM sodium phosphate, pH 7.4) at room temperature (22-25°C). The drug concentration remaining in the supernatant after centrifugation at 105 000 x g for 1 h was optically detected at 256 nm for TFP ($\epsilon_M = 23500$), at 324 nm ($\epsilon_M = 3770$) for DBC and at 260 nm ($\epsilon_M = 320$) for PZQ against the respective control (membrane in PBS). Ghosts rather than whole erythrocytes were used in partition coefficient determination because the spectrum of hemoglobin released during the experiment overlapped the optical spectra of the drugs, preventing their precise determination in the supernatant. The amount of drug (solute) bound to the apolar phase was obtained by subtracting the supernatant concentration from the total solute concentration measured before phase mixing. The partition coefficient, P , was calculated according to Eq.1 [24]:

$$P = \frac{n_m(s)/V_m}{n_w(s)/V_w} \quad (1)$$

where s denotes the solute compound, n is the number of moles of solute, V = volume and the subscripts m and w refer to the membrane and aqueous phase, respectively. The apolar phase volume (V_m) was calculated assuming a lipid density of 1 g/mL for the membranes [12].

Octanol/water P determination. PBS and n -octanol solutions were pre-equilibrated overnight; after drug addition the mixture was vortexed and incubated for 10 min. before centrifugation at 260 x g, for 5 min. The drug concentration in the water phase was optically determined and P was calculated as described for the phase separation experiments.

Determination of critical micelle concentration (CMC). CMC was determined with a K12 Krüss tensiometer. The surface tension of TFP

solutions ranging from 0.1 to 100 μM was measured using PBS buffer and the surface tension of DBC solutions ranging from 0.5 to 30 mM was measured using 50 mM phosphate buffer, pH 6.8, both at room temperature.

Assay of protection against hemolysis. Erythrocytes (0.14% hematocrit) were incubated in hypotonic condition (PBS buffer with 66 mM NaCl, 5 mM phosphate, pH 7.4) to induce 50% hemolysis. Each compound was added in an appropriate concentration range (0.01-100 μM for TFP, 0.001-2.5 mM to DBC and 0.005-5 mM to PZQ) and the samples were incubated for 10, 30 and 60 min. After centrifugation at $260 \times g$ for 3 min., released hemoglobin was measured in the supernatant at 412 nm. The results were expressed on a relative absorbance (RA) scale, with statistical analysis of variance conducted at the SAS program [25], as previously described [12]. RA is the average value of 15 experiments.

Hemolytic assay. TFP (1-200 μM) and PZQ (0.05-10 mM) were prepared in isotonic PBS. DBC (0.1-10 mM) was prepared in PBS adjusted to pH 6.8. PZQ was dissolved in DMSO before PBS addition so that the final DMSO concentration never exceeded 5% (v/v). Erythrocytes (hematocrits ranging from 0.04 to 0.14%) were added, and the samples kept at room temperature, for 10 min. (TFP), 30 min. (DBC) and 90 min. (PZQ) before centrifugation at $260 \times g$, for 3 min. The different incubation times are due to discrepancies in the time required to induce the maximum effect. Hemoglobin released into the supernatant was detected at 412 nm (for lower hematocrits) and 540 nm (0.14% hematocrit).

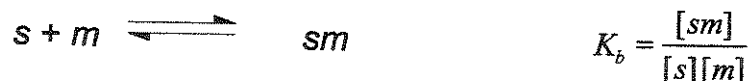
The hemolytic effect, measured as percent relative hemolysis (RH), was determined on the basis of released hemoglobin, subtracting the hemolysis obtained for the control (erythrocytes in PBS) from the hemolysis of samples.

Re (drug/lipid ratio) calculation. Lichtenberg defined C^{SAT} and C^{SOL} as the solute concentration needed for saturation and total membrane solubilization, respectively [26]. These concentrations were determined in the hemolytic experiments and plots of C^{SAT} and C^{SOL} as a function of erythrocyte membrane lipid concentration permitted the determination of Re , the effective solute/lipid molar ratio both for initial (saturation) and total hemolysis (solubilization), according to Eq. 2 [27,28] :

$$Dt = Re [L + 1/Kb (Re + 1)] \quad (2)$$

where Dt is the total solute (C^{SAT} , C^{SOL}) and L the lipid concentration in the system. Re is taken from the slope of the resulting straight line and the Y

intercept corresponds to D_w , the concentration of the free solute in water, equivalent to its CMC [26,29]. Finally K_b (M^{-1}) describes the solute binding to membranes in terms of equilibrium:



where s is the free solute and sm is the membrane-forming compound. Binding constants (K_b) and partition coefficients (P) are related through the partial molar volume, ∇ , of the lipid phase, according to [8,30]:

$$K_b = P \cdot \nabla \quad (3)$$

for erythrocytes, ∇ was taken as 0.658 L/mol [12].

3. Results and Discussion

Although the drug-induced hemolysis phenomenon has been studied since 1937 [31], up to now the nature of drug-membrane interaction has not been clearly elucidated. Many authors have described the interaction of amphiphiles with the erythrocyte membranes, reporting the general characteristics of this interaction. For instance, since 1966, Seeman has established that tertiary amines like phenothiazine neuroleptics and local anesthetics induce hemolysis in a biphasic manner [9]; Seeman and coworkers [32,33] reported that many amphiphiles are able to protect erythrocytes against hypotonic hemolysis by intercalating into the membrane, increasing the membrane-area/volume ratio of the cell and thereby the critical hemolytic volume of the erythrocyte. Sheetz and Singer [14] proposed that anionic drugs are echinocytogenic while cationic compounds induce stomatocytosis. Aki and Yamamoto [18] suggested that potent hemolytic drugs such as cationic phenothiazines trigger a thermal effect differing from that of other hemolytic compounds, like anionic antiinflammatories, which induce a slightly negative ΔH . In a recent report we have used microcalorimetry to compare hemolysis induced by TFP, DBC and PZQ. We showed that the heat effect of TFP is 4 times greater than that of DBC, indicating putative different pathways in hemolytic activity [34]. Since calorimetry is a nonspecific technique, the observed heat effect cannot discriminate between any particular events and shows the overall outcome of the hemolytic phenomenon.

Here we intend to analyze the hemolysis caused by these three compounds (TFP, DBC and PZQ) which probably use distinct mechanism ₅

for their membrane-disruption action. Table I shows some physicochemical properties of the drugs studied. The phenothiazine derivative TFP and the local anesthetic DBC have an ionizable amine group with a pK of 8.1 and 8.3, respectively [35,36], so that, as discussed further in this paper, both charged (+) and uncharged (:) species are present at physiologic pH. Water solubility is given for both species (Table I). As amphiphilics, these drugs have a surfactant behavior: they are able to form micelles at the CMC values determined (Table I). PZQ has a low water solubility and it does not ionize or show any aggregate property.

Drug partitioning between membranes and water

Table II shows TFP, DBC and PZQ partition coefficients (P) between membrane (microsomes, erythrocyte ghosts, liposomes) and water and octanol/water systems, determined at pH 7.4. It can be seen that TFP partition into the membranes is higher than those of DBC and PZQ into any of the membranes. This is curious because TFP is also highly water soluble (see Sw for charged form in Table I) and should not present the highest partition into membranes at pH 7.4. Differences in ionization, i.e., charged/uncharged drug ratios at physiologic pH, can explain these results. A detailed look at the ionization properties reveals that at pH 7.4 and in the presence of membranes TFP is ca. 40% in the uncharged form [12] while DBC is just 16% uncharged (see later in discussion of Eq. 6). That is why TFP becomes more hydrophobic than DBC at pH 7.4. But what about PZQ? It does not ionize at all around physiologic pH. Why does PZQ show the worst interaction with membranes (Table II) and — as will be shown further on in the hemolytic experiments — why does it need longer incubation times than TFP and DBC to induce hemolysis? It appears that the low solubility of PZQ determines a non-ideal partitioning (defined by K_b , $Sw < 2$) limiting its entrance into the membrane, as described before for *n*-alcohol series [37-39] and local anesthetics [40]. In this case there is a restraint in membrane partitioning related to the incomplete exclusion of the drugs from the membrane — the “cutoff” effect — once saturation of the water phase is reached. This non-ideal partitioning of PZQ will also explain the large amounts of the drug and long incubation times required for the hemolytic effect.

Anyway, the high affinity of TFP for biomembranes allows it to easily penetrate the central nervous system and thus to be one of the most potent antipsychotic agents. The stronger binding of TFP to microsomes may reflect some TFP-protein interaction, as discussed before [12]. Table II also shows that for each drug used the partition into ghost membranes is lower than the partition into the other bilayers (microsomes and EPC liposomes). To explain the rather small P^{GHOST} values, we must consider the lower

fluidity of the ghost membranes, related to their high cholesterol content (30% in weight) [41] and to the cytoskeleton rigidity [42] that may restrict drug partition into them.

The P values obtained for the drugs into different membranes show that the partition varies greatly for each membrane studied. Absolute P values determined between the organic phase (octanol) and water were lower than P values between membranes and water (Table II); as also reported by other authors [11,13], P^{OCT} values rarely coincide with those found in biomembranes and should be used with caution [12,43].

Even in real anisotropic systems like membranes, our data reveal large differences in P values, depending on the composition of the bilayer and membrane nature (EPC vesicles, microsomes or erythrocyte ghosts). So, we wish to emphasize that when P is used as a hydrophobic parameter it gives an approximate idea, but the nature of the membrane must be always considered, for each apolar/polar partition system.

Hypo- and isotonic drug-induced hemolysis and drug/lipid ratio determination

In a previous work we showed the hemolytic action of TFP under hypo- and isotonic conditions [12]. A biphasic TFP hemolytic curve obtained for Ht = 0.14% is shown in Fig. 2. TFP — at concentrations up to 17 μ M — stabilizes and protects erythrocytes against *hypotonic* lysis, while at higher concentrations — above 17 μ M — the upward curvature indicates lysis. The maximal protective TFP concentration (C^{PROT}) is 13 μ M, with TFP in its monomer form. The hypotonic curves were performed at three different incubation times, i.e., 10, 30 and 60 min. with no significant differences with increasing times, which means that 10 min. is enough for TFP to reach the partition equilibrium.

Fig. 2 also shows the biphasic hemolytic effect under *hypotonic conditions* for DBC and PZQ. The protective effect of DBC against hemolysis (inward curvature) is maximum at ca. 120 μ M and stabilises after 30 min. of incubation. For PZQ, the concentration and the lower incubation time required to produce a stable protective effect were 1 mM and 60 min., respectively. The upward curvature in the DBC and PZQ curves ($RA > 1$, Fig. 2) reveals the lytic effect of these drugs. C^{PROT} values for the three compounds are listed in Table III, as well as Re^{PROT} , the effective drug/lipid ratio in the membrane for maximal protection, calculated from P^{GHOST} values and Eq. 1; these ratios will be discussed later, on together with hemolytic Re values.

Fig. 3 presents the hemolytic curves obtained in *isotonic* medium (150 mM NaCl in PBS buffer) for TFP, DBC and PZQ. At low drug concentrations the membrane incorporates the amphiphiles without losing its integrity, and after membrane saturation the addition of a small of the drug quickly induces lysis. From the curves in Fig. 3 we obtained C^{SAT} and C^{SOL} values, i.e., the drug concentration for the onset and complete solubilization of erythrocyte membranes. We point out here the direct correlation observed between P^{GHOST} and hemolytic activity (C^{SAT} , C^{SOL} and also C^{PROT} in Fig. 2). As seen for protection, the most effective drug in inducing lysis was TFP, which also had the higher partition coefficient, while large amounts of PZQ, the drug with the lowest partition into ghosts, are required to disrupt erythrocyte membranes. These data are in agreement with Kanaho's theory that drug entrance into the bilayer is a major step in the hemolytic process [10].

Hemolytic experiments with DBC were conducted at pH 6.8 to prevent the low solubility of DBC at pH 7.4 from limiting its partitioning inside the erythrocyte membranes. We will discuss further that DBC partitioning was not very different at these two pH values.

C^{SAT} and C^{SOL} are plotted as a function of lipid concentration in Fig. 4, to give the straight lines predicted by Eq. 2. The corresponding drug-to-lipid molar ratio in the membrane, Re , (Table IV) was readily calculated from the saturation and solubilization lines in Fig. 4. As described above, the straight lines in Fig. 4 (A, B and C) should intercept the y axis at Dw , the free drug concentration in water that would correspond to the CMC of the amphiphilic molecule in the presence of membranes. For TFP, the obtained Dw (59 and 94 μ M) closely resemble the CMC determined at pH 7.4 (42 μ M, Table I). For DBC at pH 6.8, Dw values (1.17 and 1.70 mM) were 10 times lower than its CMC and far from its charged form' water solubility (Table I). Dw values came close to zero for PZQ, as if the drug concentration in the aqueous environment were negligible.

TFP showed surfactant-like behavior [12] since its CMC was low (Table I), indicating a high degree of intermolecular (TFP-TFP) hydrophobic interactions. The aggregate properties of TFP corroborate to its lytic activity since erythrocyte lysis occurs as membrane phospholipids are released to the forming mixed-micelles [12]. Keeping this consideration in mind, and going back to DBC, we see that the Dw values (Table II) are very different from the CMC (10.7 mM at pH 6.8, Table I) of the anesthetic, indicating that the amphipathic DBC induces lysis in its monomer form. The antihelminthic PZQ is not a surfactant molecule and does not form micelles, but it forms another (solid) phase in the system at concentrations above C^{SOL} .

Table IV lists C^{SAT} , C^{SOL} , Re and Dw values, obtained for TFP, DBC and PZQ. Re was determined for saturation (Re^{SAT}) and solubilization (Re^{SOL}) experiments, according to [26-28] and they represent the effective drug:lipid molar ratio *in the membrane* for the onset and completion of membrane rupture.

We see that a 0.43:1 TFP:lipid ratio (Re^{SAT}) leads to membrane saturation. Above this point, erythrocyte phospholipids probably move to the hydrophobic micelle environment, causing membrane disruption [12] and complete membrane solubilization is achieved at ca. 1.5:1 TFP:lipid molar ratio (Re^{SOL}). These ratios are in good agreement with those obtained with other amphiphilics' like Triton X-100 (0.7:1 and 3:1) lytic effect on egg phosphatidylcholine vesicles [27, 44] and erythrocytes [45]. Concerning DBC, Re^{SAT} is 33:1 and Re^{SOL} is 51:1. These very high drug:lipid ratios do not represent a real situation since it is not possible to keep the membrane arrangement with 33 or 51 DBC molecules per lipid molecule. From this point of view, it seems to us that Lichtenberg's treatment [26] can be a useful tool to describe the hemolytic activity of surfactant-like compounds such as TFP, but not of DBC. The high CMC of dibucaine does not characterize it as a surfactant. In the case of PZQ, whose behaviour is much more distant from that of a surfactant, the values of Re^{SAT} and Re^{SOL} are completely unreasonable (163:1 and 765:1, respectively), at least concerning drug:lipid molar ratios in the membrane (Re).

Following this approach a little further, and assuming ideal partitioning of lipid and drugs in dilute aqueous media [26,29], we can obtain the drug-membrane binding constants (K_b) from the saturation straight lines of Fig. 4 according to Eq. 4:

$$Re^{SAT} = K_b \cdot Dw / (1 - K_b \cdot Dw) \quad (4)$$

The K_b value for TFP between erythrocytes/water was $4.8 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ (Table IV). Since K_b and P are related (Eq. 3), for trifluoperazine $P = 7268$. The K_b value obtained for DBC between erythrocytes/water was $8.9 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$ (Table IV) corresponding to a partition coefficient of 1356. For PZQ, the K_b obtained between erythrocytes/water was quite unreasonable ($9.9 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ or $P = 1.5 \times 10^{10}$), probably distorted by the very low Dw value, and non-ideal partitioning [37], that does not allow PZQ to be studied by Lichtenberg's treatment.

The K_b determined here for TFP and DBC give overestimated P values in comparison to P^{GHOST} (Table II) determined by phase-separation. Nevertheless, the values for DBC showed better agreement than those for

TFP. The hemolytic activity of DBC is mainly determined by its membrane partitioning, while the activity of TFP reflects partition and aggregate phenomena, leading to an overestimate of K_b from the hemolytic experiments (Table IV).

If Lichtenberg's approach seems inappropriate for the three drugs, let us take another look at the drug:lipid ratios for hemolysis, applying P^{GHOST} and Eq. 1 to calculate Re^{SAT} and Re^{SOL} . The calculated drug:lipid molar ratio inside the membrane for saturation and solubilization, Re^{SAT} and Re^{SOL} , will be 0.06 and 0.09:1 for TFP in the experiment of Fig. 3, with an $H_t = 0.14\%$. The low ratios indicate that TFP-induced hemolysis is not the result of membrane saturation with the drug but is caused by the association of partitioning with achievement of TFP critical micelle concentration. Now for DBC Re^{SAT} and Re^{SOL} will be 0.34 and 0.69:1, respectively, and these ratios seem quite reasonable for true saturation of the membrane phase [46]. Even PZQ, with its small water solubility and non-ideal partitioning, reveals Re^{SAT} and Re^{SOL} values of 0.25 and 1.89:1, indicative of real membrane saturation.

Our data indicate that Lichtenberg's treatment is appropriate for classic surfactant molecules, and only if the concentrations required for hemolysis do not match the CMC range of the surface active compound. For the three drugs studied here the determination of P values by phase separation and *calculations* of drug:lipid molar ratios give more reasonable results. It seems that hemolysis occurs with membrane destabilization due to lipid sequestration from the bilayer caused by the amphiphilic exchange between water (monomer), membrane and also micelle (in the case of TFP) phases; this last exchange facilitates the process as it enhances lipid sequestration from the bilayer, explaining the hemolytic action of TFP at very low (0.06-0.09%) drug:lipid molar ratios. Moreover, the necessity for significant exchange rates justifies the low hemolytic efficiency of PZQ despite its hydrophobic nature.

Protection against hypotonic hemolysis (Table III) always occurred at lower drug:lipid ratios than Re^{SAT} and Re^{SOL} calculated by this alternative method, for the three drugs. Re^{PROT} values (Table III) strongly support the accuracy of this analysis.

Real charged/uncharged ratios for TFP and DBC at physiologic pH

We have mentioned that the low water solubility of PZQ restricts its partition into membranes, explaining the huge amounts of drugs required for hemolysis. But how to explain the higher P values and hemolytic effect of TFP compared to DBC? In previous studies we reviewed the effect of different partitioning of ionizable local anesthetics [8] and TFP [12] at their

ionization constants. It was shown that whenever the binding of charged/uncharged forms is different, it will imply a pK shift of the partitioning compound. Trifluoperazine, for example, has its ionization constant downshifted from 8.1 to 7.6 in the presence of egg PC multilamellar vesicles [12].

Table V shows quite different P values for TFP charged/uncharged species, with the neutral form partitioning better ($P^{LIP} = 2463$) than the protonated, less hydrophobic species ($P^{LIP+} = 812$). For DBC, the P^{LIP} value was less than two times greater than the P^{LIP+} value (Table V) and pK_{app} , the apparent ionization constant in the presence of membranes, calculated according to [46]:

$$pK_{app} = pK - \log \left[\frac{(P_- \cdot V_m + V_w)}{(P_+ \cdot V_m + V_w)} \right] \quad (5)$$

was found to be 8.1 in the presence of 12 μ M lipids (Ht = 0.14%, Table IV), revealing a downshift of ca. 0.2 pH units. At higher phospholipid concentrations, calculated pK_{app} was the same.

Using pK_{app} in the Henderson-Hasselbalch equation (Eq. 6), one can calculate the neutral (:) to charged (+) molar ratio at pH 7.4:

$$pH = pK_{app} + \log [\text{base}] / [\text{acid}] \quad (6)$$

The neutral/charged molar ratio (Z) for TFP and DBC at pH 7.4 is 0.67:1 and 0.19:1. As a consequence, we can say there is no predominant form of TFP at pH 7.4 while the charged DBC is always the major species under physiologic conditions, with or without membrane.

Now, taking into account the P_- and P_+ values and Z at pH 7.4, an average partition coefficient ($P_{average}$) can be calculated, as shown by Eq. 7:

$$P_{average} = \frac{P_+ + (P_- \cdot Z)}{1 + Z} \quad (7)$$

The calculated values of $P_{average}$, obtained from P_- and P_+ values of TFP and DBC forms (measured at pH 5.0 and 10.5, respectively) between liposomes and water, are listed in Table V. For TFP $P_{average}$ is 1432 [12].

For DBC in multilamellar liposomes, the calculated $P_{average}$ value was 1919, reflecting the contribution of both charged (84 %) and

uncharged (16 %) forms to its partition at pH 7.4, and showed a very good correlation with the experimental value ($P^{LIP} = 1884$, Table II). At pH 6.8, used for the hemolytic experiments for DBC, $P_{average}$ was 1827, i.e., very close to that of DBC at pH 7.4.

$P_{average}$ indicates that partitioning is higher than one would expect by ignoring the pK shift, and hemolytic experiments support this analysis. Hydrophobic membrane interaction is important for the interpretation of the hemolytic effects of the three drugs studied. This explains the direct correlation between the hydrophobicity and biological effects of phenothiazine compounds [11,16,19] and local anesthetics [47].

Besides, $P_{average}$ values reveal that TFP and DBC have similar hydrophobicity at pH 7.4 in phospholipid membranes and their quite different effect on erythrocyte membranes must reflect a different mechanism of action for TFP - involving micelle formation and its stronger interaction to erythrocyte's membrane proteins - and DBC.

4. Conclusion

This work comparatively describes the biphasic (protective/inductive) effect of TFP, DBC and PZQ on mouse erythrocyte hemolysis and elucidates differences in the hemolytic pathway developed by each drug.

The protective effect promoted by the three drugs seems to be triggered by the monomer insertion into the membrane and is directly related to the drugs' hydrophobicity. Protection occurs at low drug:lipid molar ratios (0.01 to 0.14:1), lower than those required for membrane saturation and solubilization.

The hemolytic effect reveals more details about the mechanism of lysis of each drug. Hemolysis is proportional to the drugs' hydrophobicity (P values) but TFP acts as a surfactant and above CMC it solubilizes membranes [12], while the hemolytic effects of DBC and PZQ are not correlated with the formation of micelles and hemolysis occurs at monomer concentration.

By applying classical treatments for the study of the interaction between surface-active compounds and lipid vesicles [26] to the hemolytic curves, it was possible to calculate drug:lipid molar ratios for the onset of hemolysis (Re^{SAT}) and for complete membrane solubilization (Re^{SOL}). This approach also permitted the calculation of P values from the hemolytic curves, i.e., between whole erythrocytes and water. The results were coherent for TFP, except for the high K_b and P values, but did not seem to

be appropriate (very high Re values) for the interpretation of DBC and PZQ interaction with erythrocyte membranes.

Instead, the knowledge of P^{GHOST} values allowed the direct calculation of the Re values, with better results. Membrane saturation and solubilization occurred at low Re values for TFP (0.06 and 0.09), because C^{SAT} and C^{SOL} were close to its CMC while for DBC and PZQ a real membrane saturation (at ca. 0.30:1 drug:lipid) was reached before hemolysis takes place.

We conclude that Lichtenberg's treatment is not always appropriate to interpret surfactant:membrane interaction (even with surface active compounds like TFP). Rather, calculation of the effective drug:lipid molar ratios, based on previously determined P values seems to give more reliable results.

The amount of uncharged and charged TFP and DBC species at pH 7.4 was analyzed, taking into account the differences between neutral (:) and protonated (+) binding to membranes and its effect on the real ionization constant, pK_{app} [8,48]. P average, the mean partition coefficient at pH = 7.4, was estimated and presented good agreement with the experimental data. For trifluoperazine, P average received an important contribution from the uncharged species, while for DBC there was no important contribution of uncharged species to membrane interaction, explaining the higher hydrophobicity of TFP at pH 7.4 compared to DBC.

This work presents the first report of the effect of PZQ on erythrocyte membranes, showing some of its particular features. Low solubility limits PZQ entrance in the bilayer, configuring a slow partition equilibrium (about 60 min. between erythrocytes and water) and the need of high quantities of total drug to induce lysis (in order to obtain appropriate Re^{SAT}).

Although hemolysis was always committed to the drug's hydrophobicity, the mechanisms of action of the three drugs were also determined by the aggregate properties of TFP and the restricted water solubility of PZQ. The rate of lipid removal from the bilayer was very high for TFP and hemolysis occurred before a real saturation of the membrane took place; this saturation was in fact observed for DBC and PZQ.

The results presented here should be of help in the understanding of the molecular mechanisms involved in drug-induced hemolysis and in the development of new amphipathic drugs (those which site of action is at the membrane level) with low hemolytic activity.

5. References

- [1] A. Elgsaeter, A. Mikkelsen, *Biochim. Biophys. Acta* 1071 (1991) 273-290.
- [2] M.A. Brito, R.M. Silva, D.C. Matos, A.T. da Silva, D. Brites, *Clin. Chim. Acta* 249 (1996) 149-165.
- [3] A. Spinedi, L. Pacini, C. Limatola, P. Luly, R.N. Farias, *Biochem. Pharmacol.* 44 (1992) 1511-1514.
- [4] A.C. Ruggiero, N.C. Meirelles, *Mol. Gen. Metab.* 64 (1998) 148-151.
- [5] P.B. Bradley, J.H. Wolstencroft, L. Hösli, G.L. Avanzino, *Nature* 212 (1966) 1425-1427.
- [6] I. Creese, D.R. Burt, S.H. Snyder, *Science* 192 (1976) 481-488.
- [7] V. Bolotina, K.R. Courtney, B. Khodorov, *Mol. Pharmacol.*, 42 (1992) 423-431.
- [8] E. de Paula, S. Schreier, *Braz. J. Med. Biol. Res.* 29 (1996) 877-894.
- [9] P. Seeman, *Biochem. Pharmacol.* 15 (1966) 1753-1766.
- [10] Y. Kanaho, T. Sato, T. Fujii, *Mol. Pharmacol.* 20 (1981) 704-708.
- [11] P.J. Marroum, S.H. Curry, *J. Pharmac. Pharmacol.* 45 (1993) 39-42.
- [12] S.V.P. Malheiros, E. de Paula, N.C. Meirelles, *Biochim. Biophys. Acta* 1373 (1998) 332-340.
- [13] S. Roth, P. Seeman, *Biochim. Biophys. Acta* 255 (1972) 207-219.
- [14] M.P. Sheetz., S.J. Singer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71 (1974) 4457-5561.
- [15] T. Fujii, T. Sato, A. Tamura, M. Wakatsuki, Y. Kanaho, *Biochem. Pharmacol.* 28 (1979) 613-620.
- [16] M.R. Lieber, Y. Lange, R.S. Weinstein, T.L. Stick, *J. Biol. Chem.* 259 (1984) 9225-9234.
- [17] H. Hägerstrand, B. Isomaa, *Chem. Biol. Interact.* 79 (1991) 335-347.
- [18] H. Aki, M. Yamamoto, *Biochem. Pharmacol.* 39 (1990) 396-398.
- [19] H. Aki, M. Yamamoto, *Biochem. Pharmacol.* 41 (1991) 133-138.
- [20] N.C. Meirelles, S.V.P. Malheiros, A.C. Ruggiero, I.A. Degterev, *Eur. J. Drug Met. Pharmacokin.* 19 (1994) 349-357.

- [21] J.T. Dodge, C. Mitchell, D.J. Hanahan, *Arch. Biochim. Biophys.* 100 (1963) 131-139.
- [22] O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, S. Farrah, R.J. Randall, *J. Biol. Chim.* 193 (1951) 265-275.
- [23] G. Rouser, S. Fleicher, A. Yamamoto, *Lipids* 5 (1970) 494-496.
- [24] Y. Katz, J.M. Diamond, *J. Membr. Biol.* 17 (1974) 69-86.
- [25] SAS Institute, S.A.S. Users Guide: Statistics, 6th edn., Cary, North Carolina, 1987.
- [26] D. Lichtenberg, *Biochim. Biophys. Acta* 821 (1985) 470-478.
- [27] M.A. Partearroyo, M.A. Urbaneja, F.M. Goñi, *FEBS Lett.* 302 (1992) 138-140.
- [28] M.A. Requero, F.M. Goñi, A. Alonso, *Biochemistry* 34 (1995) 10400-10405.
- [29] D. Lichtenberg, in: M. Shinitzky (Ed.), *Biomembranes. Physical Aspects*, Weinheim, 1993, pp. 63-95.
- [30] M.L. Bianconi, S. Schreier, *J. Phys. Chem.* 95 (1991) 2483-2487.
- [31] O. Gessner, M. Walther, K. Reinhardt, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Exp. Path. Pharmacol.* 186 (1937) 329-335.
- [32] P. Seeman, *Pharmacol. Rev.* 24 (1972) 583-655.
- [33] H. Machleidt, S. Roth, P. Seeman, *Biochim. Biophys. Acta* 255 (1972) 178-189.
- [34] S.V.P. Malheiros, N.C. Meirelles, P.L.O. Volpe, *Thermochim. Acta* (in press) 1998.
- [35] A.C. Moffat, in: *Clarke's Isolation and Identification of Drugs*, 2nd edn., Pharmac. Press, London, 1986, p. 1044.
- [36] D. Agin, L. Hersh, D. Holtzman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 53 (1965) 952-958.
- [37] M.W. Hill, *Biochim. Biophys. Acta* 356 (1974) 117-124.
- [38] A.G. Lee, *Biochim. Biophys. Acta* 472 (1977) 285-344.
- [39] M.J. Pringle, K.B. Brown, K.W. Miller, *Mol. Pharmacol.* 19 (1981) 49-55.
- [40] E. de Paula, S. Schreier, *Biochim. Biophys. Acta* 1240 (1995) 25-33.
- [41] H.P. Duwe, E. Sackmann, *Phys. Acta* 163 (1990) 410-428.

- [42] A.C. Ruggiero, Ph.D thesis, Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia, UNICAMP, 1994.
- [43] E. Lissi, M.L. Bianconi, A.T. Amaral, E. de Paula, L.E.B. Blanch, S. Schreier, *Biochim. Biophys. Acta.* 1021 (1990) 46-50.
- [44] E.A. Dennis, *Arch. Biochim. Biophys.* 165 (1974) 764-773.
- [45] J. M. Maraculla, A. Alonso, J. L. R. Arrondo, J. M. González-Mañas, F.M. Goñi, J. I. G. Gurtubay, A. Prado, M. A. Urbaneja. *Rev. Esp. Fisiol.* 45 (1989) 1-7.
- [46] A.G Lee, S. Schreier, in: G. Gregoriades (Ed.), *Liposome Technology. Vol II, Entrapment of drugs and other materials*, C.R.C. Press, Boca Raton, FL, 1993, pp. 1-25.
- [47] Gupta S.P., *Chem. Rev.* 91 (1991) 1109-1119.
- [48] M.A. Requero, F.M. Goñi, A. Alonso, *J. Coll. Interf. Sci.* 161 (1993) 343-346.

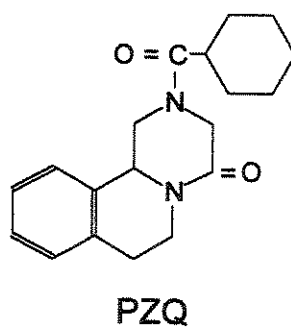
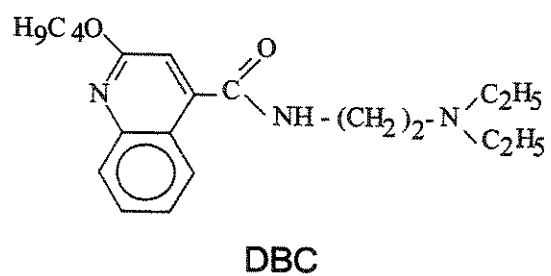
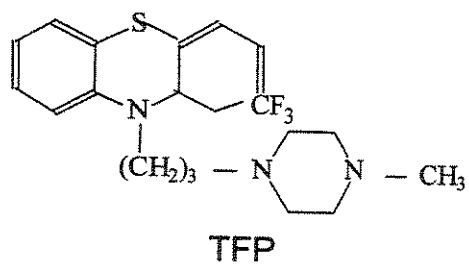


Figure 1: CHEMICAL STRUCTURE OF TRIFLUOPERAZINE (TFP), DIBUCAINE (DBC) AND PRAZIQUANTEL (PZQ).

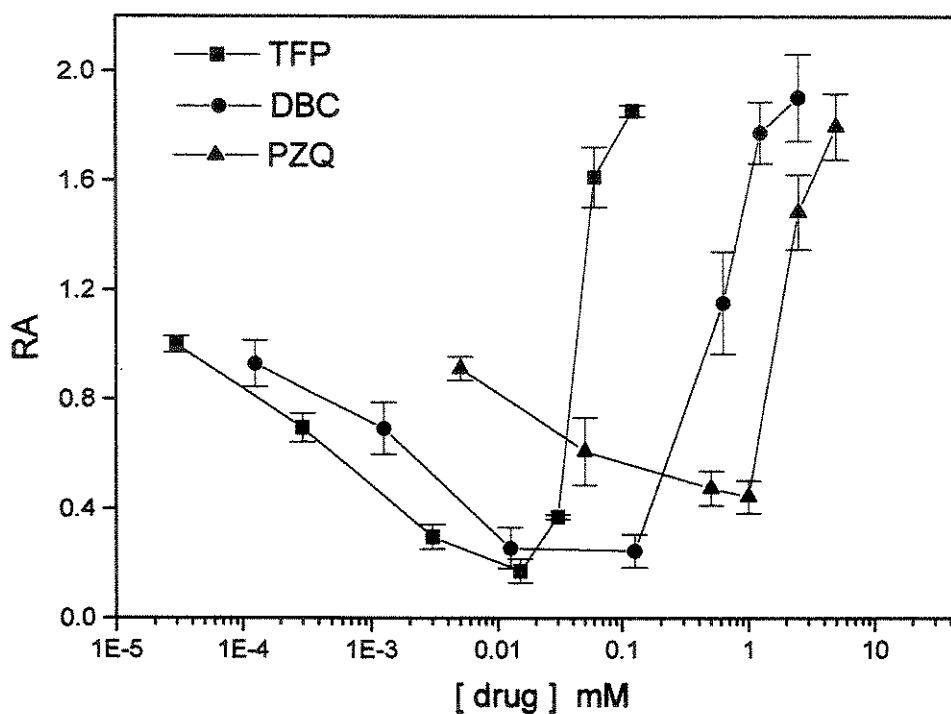


Figure 2: DRUG-INDUCED PROTECTION OF ERYTHROCYTE LYSIS UNDER HYPOTONIC CONDITIONS. For TFP (■), pH 7.4, incubation time = 10 min; for DBC (●), pH 6.8, incubation time = 30 min; for PZQ (▲), pH 7.4, incubation time = 90 min. Ht = 0.14%, hypotonic (66 mM NaCl) 5 mM PBS, room temperature.

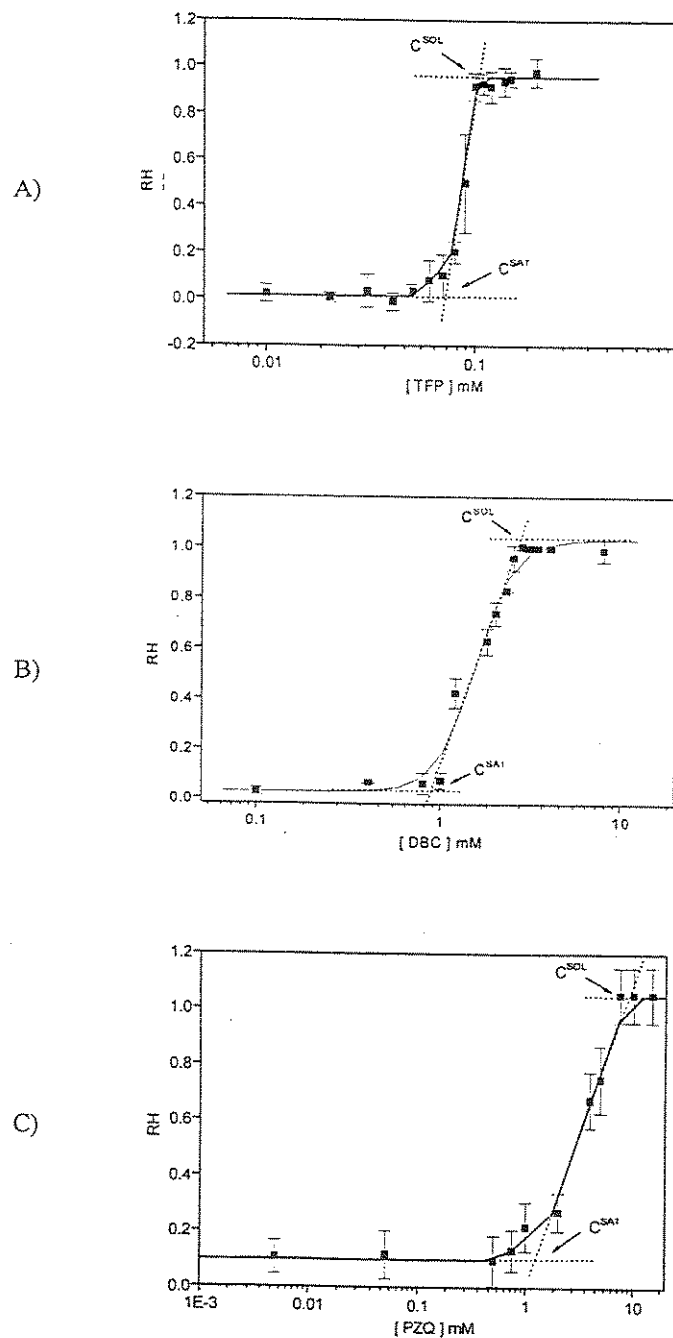


Figure 3: HEMOLYTIC EXPERIMENTS UNDER ISOTONIC CONDITIONS.
 A) TFP, pH 7.4, incubation time = 10 min; B) DBC, pH 6.8, incubation time = 30 min; C) PZQ, pH 7.4, incubation time = 90 min. Ht = 0.14%, 5 mM PBS, room temperature. C^{SAT} and C^{SOL} (see text) are shown.

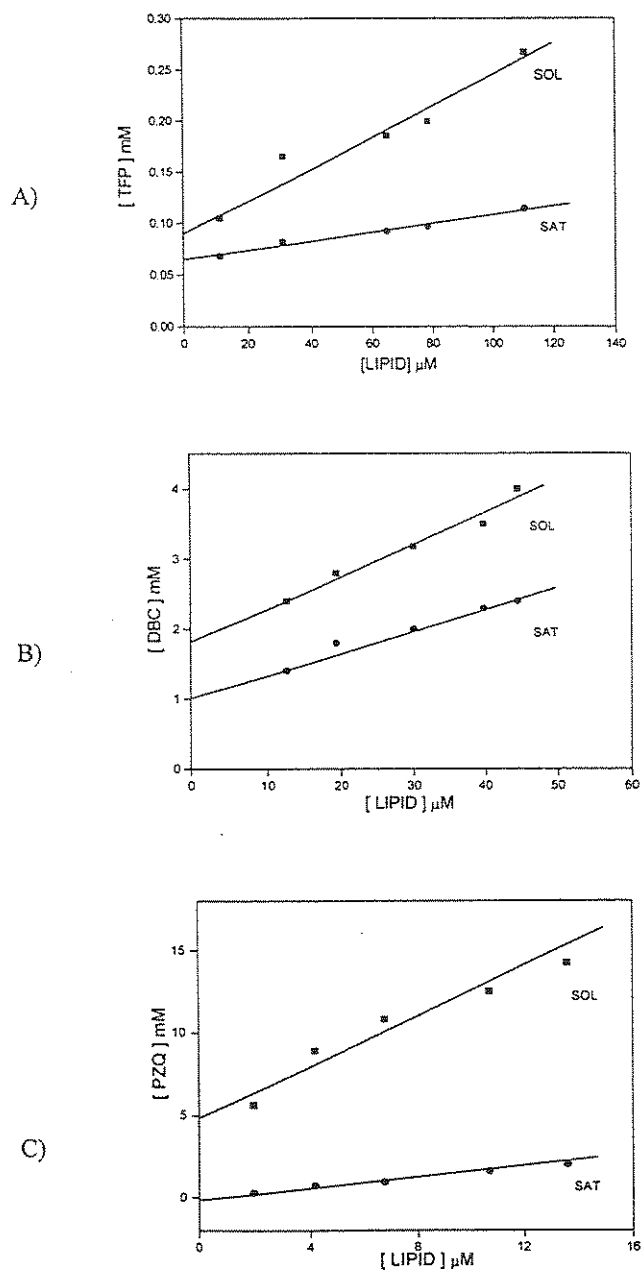


Figure 4: EFFECTIVE DRUG/LIPID MOLAR RATIO FOR MEMBRANE SATURATION AND SOLUBILIZATION: A) TFP; B) DBC; C) PZQ. C^{SAT} (●) and C^{SOL} (■) were plotted as a function of erythrocyte lipid concentration. Re values were taken from the slope of the straight lines.

TABLE I: Physicochemical properties of TFP, DBC and PZQ. Molecular weight (MW), aqueous solubility (Sw) and critical micellar concentration (CMC).

Drug	MW	Sw (M)	Sw (M) ^a	CMC (M)
		Charged form	Uncharged form	
TFP	480.4	1 ^b	$3.0 \cdot 10^{-5}$	$4.2 \cdot 10^{-5}$ ^d
DBC	379.9	1.9 ^c	$3.0 \cdot 10^{-5}$	$10.7 \cdot 10^{-3}$ ^e
PZQ	312.4	-	$1.3 \cdot 10^{-3}$	-

^a Determined in 20 mM carbonate buffer, pH = 10.5.

^b In water, according to the Merck Index.

^c In 0.02 acetate buffer, pH 5.0, according to [40]

^d Determined in 5 mM PBS, pH 7.4.

^e Determined in 50 mM PBS, pH 6.8.

TABLE II: Partition Coefficients ^a for TFP, DBC and PZQ between microsomes (P^{MIC}), erythrocyte ghosts (P^{GHOS}), liposomes (P^{LIP}), octanol (P^{OCT}) and water phase, in 5 mM PBS buffer, pH 7.4. Room temperature.

Drug	P^{MIC}	P^{GHOS}	P^{LIP} ^b	P^{OCT}
TFP	7172 ± 1229	1380 ± 429	1916 ± 341	452 ± 55
DBC	793 ± 119	375 ± 62	1884 ± 125	265 ± 25
PZQ	488 ± 179	210 ± 52	^c	50 ± 12

^a Each P value represents the mean ± SEM of nine experiments.

^b For P^{LIP} we used four freeze-thawing cycles, increasing the incubation time to nearly 30 min..

^c Not determined due to the high light dispersion that masks PZQ absorbance at 324 nm.

TABLE III: *Effective drug/lipid molar ratio in the hyposmotic hemolytic protection of erythrocytes by TFP, DBC and PZQ. Experimental condition is given in Fig. 2*

	TFP	DBC	PZQ
C^{PROT} (mM)	0.013	0.12	1.00
Re^{PROT}	0.012	0.03	0.14

TABLE IV: Effective drug/lipid molar ratios^a and related parameters in the lysis of erythrocytes by TFP, DBC and PZQ. Experimental condition is given in Fig. 3.

	TFP	DBC	PZQ
C^{SAT} (mM)	0.068	1.4	1.8
C^{SOL} (mM)	0.104	2.8	13.7
Re^{SAT}	0.43	32.9	163
Re^{SOL}	1.45	50.7	765
Dw (μ M) ^b	59	1117	~ 0
K_b (M ⁻¹)	4783	892	9.9×10^9
P	7268	1356	1.5×10^{10}

^a According to [26].

^b Taken from the saturation curves in Fig. 4.

TABLE V: Partition coefficients for charged and uncharged TFP and DBC species between liposomes and water. Ionization constants determined in water (pK) and calculated in the presence of membrane (pK_{app}) and average partition coefficient at pH 7.4 ($P_{average}$) calculated using pK_{app} .

Drug	P^{LIP+} ^a	P^{LIP-} ^b	pK	pK_{app} ^c	$P_{average}$ ^d
TFP	812±198	2463±274	8.1 ^e	7.62	1432
DBC	1790±545	2614±488	8.3 ^f	8.13	1919

^a Determined in 20 mM acetate buffer, pH = 5.0.

^b Determined in 20 mM carbonate buffer, pH = 10.5.

^c Calculated from Eq. 5 for H_t = 0.14% (12 μ M membrane lipid concentration).

^d Calculated by Eq. 7 for pH 7.4, using pK_{app} instead of pK in the determination of the base/acid molar ratio (Eq. 6).

^e According to [35].

^f According to [36].

2.4. Membrane Effects of Trifluoperazine, Dibucaine and Praziquantel on Human Erythrocytes

Resumo

A trifluoperazina (TFP) é um potente agente antipsicótico, a dibucaína (DBC) é um anestésico local e o praziquantel (PZQ) é um agente altamente eficiente contra a esquistossomose. O presente trabalho foi conduzido para: (i) investigar os efeitos da TFP, DBC e PZQ sobre membranas eritrocitárias; (ii) comparar as alterações citotóxicas induzidas pelas drogas catiônicas (TFP e DBC) com as alterações induzidas pela droga neutra (PZQ); e (iii) esclarecer os mecanismos da interação de cada droga com a membrana eritrocitária. Microscopia eletrônica de varredura e o cálculo do índice morfológico foram utilizados para estabelecer a extensão das alterações morfológicas dos eritrócitos induzidas por concentrações sublétricas destas drogas. A interação droga-membrana eritrocitária também foi monitorada pela comparação da hemólise induzida por estas drogas com a liberação de lipídios da membrana (fosfolipídios e colesterol) quando as concentrações de droga eram triplicadas. Os resultados mostraram que a droga neutra PZQ induzia a mesma alteração morfológica (estomatocitose) que as catiônicas, TFP e DBC. O efeito hemolítico variou com a droga empregada e mostrou-se ser dependente da concentração. Diferentes curvas dose-resposta foram obtidas para a eluição de lipídios, embora os perfis de liberação de colesterol e fosfolipídios tenham sido similares para cada droga. Os diferentes efeitos induzidos pela TFP, DBC e PZQ na morfologia do eritrócito, na hemólise e na eluição de lipídios estão relacionados às características físico-químicas de cada droga. Estes resultados sugerem que distintos mecanismos celulares de interação com a membrana são responsáveis pelos mecanismos de citotoxicidade de cada droga.

Membrane Effects of Trifluoperazine, Dibucaine and Praziquantel on Human Erythrocytes

Sônia V. P. Malheiros¹, M. Alexandra Brito², Dora Brites² And Nilce C. Meirelles¹

¹Department of Biochemistry, Institute of Biology, State University of Campinas, Campinas, SP, Brazil; ²Centro de Patogénese Molecular, Faculty of Pharmacy, University of Lisbon, Lisbon, Portugal

Corresponding author:

Nilce Correa Meirelles, Ph.D.

Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), CP 6109, 13083-970, Campinas, SP, Brazil.

Tel.: +55-019-7887572; FAX: +55-019-2893124

Abstract

Trifluoperazine (TFP) is a potent antipsychotic agent, dibucaine (DBC) is a local anesthetic and praziquantel (PZQ) is a highly effective agent against schistosomiasis. The present work was conducted to (i) investigate the effects of TFP, DBC and PZQ on human erythrocyte membranes, (ii) to compare the cytotoxic alterations induced by the cationic drugs (TFP and DBC) with those induced by the neutral compound (PZQ), and (iii) to clarify the mechanisms of each drug-membrane interaction. Scanning electron microscopy was used to establish the extent of the morphological erythrocyte alterations induced by sublytic concentrations of these drugs and the morphological index was calculated. Drug erythrocyte membrane interaction was also monitored by comparing drug-induced hemolysis with the release of membrane lipids (phospholipids and cholesterol), when triplicate drug concentrations were used. Our results showed that neutral PZQ induces the same morphological alterations (stomatocytosis) as the cationic drugs TFP and DBC. Hemolysis was shown to vary with the drug used and to be concentration-dependent. Different dose-response curves were obtained for lipid elution, although the profiles of cholesterol and phospholipids release were similar for all drugs. The different effects induced by TFP, DBC and PZQ on erythrocyte morphology, hemolysis and lipid exfoliation are related to the physical and chemical characteristics of each drug. These results suggest that distinct cell membrane interaction pathways lead to drug-specific mechanisms of cytotoxicity.

1. INTRODUCTION

Trifluoperazine (TFP) is a potent antipsychotic agent (Baldessarini, 1996), dibucaine (DBC) is a local anesthetic (Strichartz *et al.*, 1987) and praziquantel (PZQ) is a highly effective agent against schistosomiasis (Andrews *et al.*, 1983). The effectiveness of PZQ against schistosomes and other helminths (Andrews *et al.*, 1983; Harnet, 1988; Froberg, 1989), as well as the absence of systemic toxicity of the drug (Froberg, 1989) have been well documented. Nevertheless, the precise mechanism by which the drug affects the parasite have yet to be elucidated (Day *et al.*, 1992). Moreover, although the interaction of TFP (Seeman, 1966; Roth and Seeman, 1972; Sheetz and Singer, 1974; Fujii *et al.*, 1979; Marroum and Curry, 1993; Hägerstrand and Isomaa, 1991; Meirelles *et al.*, 1994; Malheiros *et al.*, 1998a) and DBC (Roth and Seeman, 1972; Fujii *et al.*, 1979; Hägerstrand and Isomaa, 1991) with erythrocytes has been extensively studied, there are - to our knowledge - no reports concerning the interaction of PZQ with erythrocytes. Erythrocytes have become the most used model of drug-membrane interaction and have provided a large quantity of information of clinical interest. In fact, the erythrocyte membrane is the most studied biological membrane because blood can be copiously obtained by venous puncture and the membrane can be easily isolated by low speed centrifugation (Elgsaeter and Mikkelsen, 1991).

The effect of a drug on the erythrocyte membrane involves two major steps: the entrance into the bilayer and the intensity of the membrane-perturbing action of the molecule once incorporated (Kanaho *et al.*, 1981). Hydrophobicity, the size of the compound and the presentation of an ionizable group are among the factors considered to be determinant in drug-membrane interaction (Marroum and Cury, 1993). It is also well known that mature human erythrocytes suffer changes in shape (stomatocytosis or echinocytosis) under the *in vitro* action of amphipatic compounds (Deuticke, 1968; Sheetz and Singer, 1974; Fujii *et al.*, 1979; Hägerstrand and Isomaa, 1991; Brito *et al.*, 1996; Brites *et al.*, 1997).

In the present work we investigated the interaction of several concentrations of TFP, DBC and PZQ with human erythrocytes, following 1 hr incubation at 37°C. The cytotoxic effects were analyzed based on morphological alterations observed by scanning electron microscopy and are reported in term of morphological index, extent of hemolysis and release of membrane phospholipids and cholesterol into the incubation medium. Results obtained with the cationic drugs TFP and DBC were compared with those obtained for the neutral drug PZQ when triplicate

concentrations of the drugs were used, in an attempt to clarify the mechanisms of each drug-membrane interaction.

2. MATERIALS AND METHODS

Chemicals

Trifluoperazine (TFP) hydrochloride and dibucaine dihydrochloride (DBC) were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO.). Praziquantel (PZQ) was donated by MERCK S.A. Indústrias Químicas, RJ, Brazil. Osmium tetroxide was obtained from BDH Chemicals (Poole, UK). Glutaraldehyde, dimethylsulfoxide (DMSO) and all other chemicals were of analytical grade and were obtained from Merck (Darmstadt, Germany).

Cell preparation

Human blood was collected from healthy donors into 50 U/mL heparin and used within 30 minutes. Erythrocytes were separated from plasma and buffy coats by centrifugation at 600 x g for 10 min at 4°C, washed three times with cold isotonic saline buffer (145 mmol/L NaCl and 5 mmol/L sodium phosphate, pH 7.4). Washed adult erythrocytes were resuspended at a 50% hematocrit in 7.5 mmol/L phosphate, 145 mmol/L NaCl, 5 mmol/L glucose, 1 mmol/L MgSO₄, pH 7.4 (incubation buffer).

Interaction of TFP, DBC and PZQ with erythrocytes

Stock solutions of 10 mM TFP and 40 mM DBC were prepared in water, while the 200 mM PZQ solution was prepared in DMSO.

Washed human erythrocytes at a final 10% hematocrit were incubated separately with TFP (60, 120, 240, 360 and 480 µM), DBC (0.75, 1.5, 2.25 and 3.0 mM) and PZQ (1.5, 3.0 and 4.5 mM) in incubation buffer at a final reaction volume of 5 mL for 1 hr at 37°C, under gentle shaking. Controls were performed in the absence of drugs and in the presence of equivalent volumes of water or DMSO, as appropriate. The maximal final DMSO concentration in the incubation medium was 2%.

The incubation was stopped by centrifugation at 600 x g for 10 min at 4°C and the erythrocytes were prepared for scanning electron microscopy. Supernatants were collected and used to evaluate both hemolysis and lipid content (phospholipids and cholesterol) after a further centrifugation at 600 x g for 10 min.

In order to assess the eventual hemolytic effect of DMSO in the assays where lysis induced by PZQ was analyzed, hemolysis was also evaluated following 1 hr incubation at 37°C of an erythrocyte suspension

(10% hematocrit) with 2% DMSO. The presence of 2% DMSO in the incubation medium induced a $0.3 \pm 0.1\%$ release of hemoglobin.

Morphological analysis

Analysis of the erythrocyte morphology was performed by scanning electron microscopy, as previously described (Kaul *et al.*, 1981; Brito *et al.*, 1996; Brites *et al.*, 1997). The specimens were examined with a JEOL-JSM-T220 scanning microscope, operating at 20 KV.

According to morphological appearance, cells were classified as discocytes, stomatocytes, spherostomatocytes, spherocytes and fusion-like cells (whenever fusion-like phenomena were visible). In order to express quantitatively the extent of cell alteration the morphological index was calculated according to the following formula: morphological index = Σ (morphological score) x [(number of distorted cells)/(total cell number)] (Fujii *et al.*, 1979). Considered scores were: 0 for normal discocytes, -1 for stomatocytes, -2 for spherostomatocytes, -3 for spherocytes and -4 for fusion-like cells. A total of 200 to 300 cells were counted in 3-4 randomly selected fields.

Hemolysis determination

The extent of hemolysis was determined by direct measurement of hemoglobin absorption at 542 nm in the supernatant (Todd *et al.*, 1979). Results are expressed as percentage of total hemolysis achieved by complete lysis of RBC with water.

Extraction and quantification of cholesterol and phospholipids eluted from the membranes

In order to characterize the amount of cholesterol and phospholipids released from the erythrocyte membrane due to the interaction with each drug, a lipid extraction of the supernatants (obtained as described above) was performed by the method of Brito *et al.* (1998). Briefly, 3 mL of the supernatant were mixed by vortexing with 5 mL of isopropanol; after 1 hr incubation, 3 mL of chloroform were added with vortexing and incubated for another 1 hr. The mixture was then centrifuged at $600 \times g$ for 10 min, the isolated organic layer was dried under a nitrogen stream at 37°C , and the lipid extract was reconstituted in 100 μL chloroform/methanol (1:1, v/v). Lipid phosphorus and cholesterol content were determined using 10 μL aliquots of the reconstituted extract according to previously described methods (Rouser *et al.*, 1969; Bartlett, 1959; Ott *et al.*, 1982; Brito *et al.*, 1996).

Statistical analysis

Results were compared using the two-tailed Student *t*-test, performed on the basis of equal or unequal variance, as appropriate, and expressed as mean $\pm$ SEM. Correlation coefficients were determined whenever relationships between two different parameters were analyzed. *P* values lower than 0.05 were considered to be statistically significant.

3.RESULTS

Erythrocyte morphology

All the drugs studied were able to induce evident morphological alterations at the end of the incubation period (Fig. 1). All drugs induced stomatocytosis, even at the lowest concentration tested. As the drug concentration in the medium increased, a clearly visible change towards a spherostomatocytic stage was observed. Spherocytes were already present at 240 μ M TFP, at 2.25 mM DBC and at the lowest PZQ concentration tested (1.5 mM). Moreover, significant membrane disruption and fusion were clearly visible when working with 240 μ M TFP and were almost complete at 480 μ M, or with 2.25 mM DBC, a phenomenon not observed with PZQ at the highest concentration tested (4.5 mM). Even when a final PZQ concentration of 6.0 mM was assayed no membrane disruption or fusion was observed (results not shown). However, this concentration was avoided due to the low solubility of PZQ, despite the use of DMSO. The morphological changes of the erythrocytes were expressed quantitatively by the morphological index and are indicated in Table 1. Correlations between the morphological index and drug concentrations were found for TFP ($r=0.968$, $P<0.05$) and DBC ($r=0.986$, $P<0.05$) but not for PZQ ($r=0.853$, N.S.). Moreover, the intensity of the shape-transforming effect varied among the different drugs, as expected due to their different molecular characteristics. In an attempt to compare the dose-response intensity of the studied drugs in terms of morphology, and considering that the concentration ranges employed for each drug were quite different as a consequence of their physical and chemical properties, we analyzed the effect of triple concentrations of each drug on the morphological index response. A 3-fold increment was observed for TFP (360/120 μ M) and DBC (2.25/0.75 mM) while only a 1.3-fold increment was obtained for PZQ (4.5/1.5 mM). The absence of proportionality between the PZQ concentrations and the corresponding shape changes indicates that this drug interacts with the erythrocyte membrane differently from TFP and

DBC. The difficult PZQ partition into membranes or a deficient solubility may have accounted for the observed phenomenon.

Hemolytic effect

The dose-dependent lysis of erythrocytes by TFP, DBC and PZQ is depicted in Figure 2. When added to the erythrocyte suspension, the three drugs showed a hemolytic effect, with statistical significance even for the lowest concentrations of TFP ($P<0.01$), DBC ($P<0.05$) and PZQ ($P<0.01$) when compared to controls. Hemolysis varied with drug concentration, and was statistically significant when results for triplicate concentrations of each drug were compared. Significant correlations ($P<0.01$) between drug concentrations and lytic effect were noticed for all the three compounds. TFP and DBC induced the highest extent of hemolysis and revealed two different concentration-dependent action intensities, a lower increment phase (60-240 μM and 0.75-1.5 mM, respectively) followed by a marked one (240-480 μM and 1.5-3.0 mM, respectively). The hemolytic dose-response curve for PZQ was similar to those obtained for the lowest concentrations of TFP and DBC. Moreover, PZQ was the drug with the lowest lytic capacity with triplicate concentrations (4.5/1.5 mM), inducing a 3.4-fold increase in the extent of hemolysis, while a 4.5- and a 10.8-fold elevation was observed for TFP (360/120 μM) and DBC (2.25/0.75 mM), respectively. Nevertheless, considering the low concentrations used in the TFP assays, this drug was still the most efficient hemolytic agent.

Cholesterol and phospholipids release into the supernatants

The levels of cholesterol release from erythrocyte membranes during interaction with TFP, DBC and PZQ are indicated in Figure 3. Cholesterol concentration was shown to increase significantly even for the lowest concentrations of TFP ($P<0.01$), DBC ($P<0.05$) and PZQ ($P<0.01$) when compared to controls. Cholesterol release into the supernatant was correlated ($P<0.01$) with the drug concentration in the medium for all the compounds tested. When the effect on cholesterol elution from the erythrocyte membrane by triplicate concentrations of each compound were compared, a higher increase was found for TFP and DBC ($P<0.01$), than for PZQ ($P<0.05$). In fact, PZQ (4.5/1.5 mM) only induced a 2.0-fold increase while TFP (360/120 μM) and DBC (2.25/0.75 mM) led to a 8.7- and 4.7-fold elevation, respectively. So, in contrast to hemoglobin release, for which the most intense effect was observed for DBC, cholesterol exfoliation from the erythrocyte membrane into the supernatant was more pronounced for TFP.

The phospholipids, expressed as lipid phosphorus, released from the erythrocyte membrane bilayer into the supernatants are presented in Figure 4. Although all the studied drugs induced a phospholipid elution, their ability

to promote this exfoliation differed from drug to drug. Correlations were obtained for TFP ($r=0.905$, $P<0.01$) and DBC (0.854 , $P<0.01$) but not for PZQ ($r=0.264$, N.S.) when the concentrations of each drug were related to the concentration of phospholipids found in the supernatants. Although the dose-response curves obtained for phospholipids elution induced by the three drugs were similar to those for cholesterol release, the effect obtained with triplicate concentrations of each compound was less marked for phospholipids than for cholesterol. In fact, while this effect was observed even for the lowest concentration ($60\text{ }\mu\text{M}$) of TFP ($P<0.05$), it was not observed until the 2.25 mM concentration of DBC was reached ($P<0.05$) and was only significant for the highest (4.5 mM) PZQ concentration ($P<0.05$). Moreover, a lag phase was apparent for concentrations of 0.75 and 1.5 mM DBC. Reinforcing the above data are the significant increments of 5.5-times ($P<0.01$) and 3.0-times ($P<0.05$) for TFP and DBC, respectively, not verified for the 1.4-fold (N.S.) increase produced by PZQ, when effects resulting from the already mentioned triplicate concentrations were compared.

4. DISCUSSION

Concerning the bilayer couple hypothesis (Sheetz and Singer, 1974), cationic amphiphiles are stomatocytogenic while anionic amphiphiles are echinocytogenic. In this report, we show that at low concentrations the cationic amphiphiles TFP and DBC induce stomatocytosis, while at higher concentrations they induce spherocytosis (Fig. 1 and Table 1), ending with membrane disruption and hemolysis (Table 1 and Fig. 2). The morphological alterations induced by TFP and DBC agree with those previously described (Fujii *et al.*, 1979; Hägerstrand and Isomaa, 1991). Considering that the ionization constant (pK) values at pH 7.4 for TFP and DBC are 8.1 (Moffat, 1986) and 8.4 (Agin *et al.*, 1965; de Paula and Schreier, 1995), respectively, two different species of each drug exist, corresponding to ionized and neutral forms. Even though the neutral PZQ also induces stomatocytosis (Fig. 1), usually this morphological alteration is triggered by interaction of cationic compounds with the inner monolayer of erythrocytes (Sheetz and Singer, 1974; Fujii *et al.*, 1979).

Other studies indicate more complicated mechanisms than inner monolayer molecule intercalation, such as inhibition of calmodulin-regulated activities (Bereza *et al.*, 1982; Nelson *et al.*, 1983) and drug-induced lipid scrambling (Schreier *et al.*, 1992), which were proposed to be implicated in the stomatocytogenic phenomenon induced by chlorpromazine, another

phenothiazine compound. However, the hypothesis of calmodulin-mediated morphological cell changes was considered unsatisfactory (Reinhart *et al.*, 1986; Isomaa and Engblom, 1988; Chen and Huestis, 1997). According to Chen and Huestis (1997), since lipid scrambling is only partly responsible for the overall chlorpromazine-induced stomatocytosis, drug-induced loss of lipid asymmetry by selective inner monolayer intercalation of the amphipath still provides the most general explanation for its morphological effects. Moreover, loss of lipid asymmetry was proposed to be at the origin of the membrane fusion events (Beyers *et al.*, 1996) observed here, when erythrocytes were incubated with 360 μ M TFP. The stomatocytosis observed in our PZQ studies also indicates that electrostatic interaction is not the single force involved in the morphological changes induced by the drugs.

Drug-induced membrane distortion was proposed as a sensitive indicator of membrane toxicity (Fujii *et al.*, 1979; Kanaho *et al.*, 1981; Brito *et al.*, 1996), which varied considerably in the intensity of shape-transforming effect among the different drugs studied, due to their particular molecular characteristics. Therefore, the concentration ranges employed for each drug were quite different. The intensity of the dose-response effect of the tested drugs on morphology was then compared based on the mean value of the morphological index increment observed when the drug concentration in the medium was tripled. The results showed a higher degree of erythrocyte shape changes for interaction with DBC closely followed by TFP, with PZQ presenting the lowest morphological index (Table 1). Although 3 mM PZQ induced stomatocytosis, further morphological alterations were not achieved when concentration was increased to 4.5 mM, reflecting a difficult penetration of PZQ through the membrane, in line with its small partition coefficient (Malheiros *et al.*, 1998b). Moreover, echinocytosis was observed for 6 mM PZQ (data not shown). These findings may indicate a preferential location of PZQ in the inner leaflet of the red cell membrane for low concentrations, and an overall distribution in both leaflets at higher levels, as previously indicated for benzyl alcohol (Bassé *et al.*, 1992). Also, it may be hypothesized that general drug-induced lipid scrambling follows the intercalation of PZQ within the inner monolayer, resulting in crenation, as proposed by Chen and Huestis (1997) for the interaction of chlorpromazine with erythrocytes.

When the hemolytic activity of the three drugs tested was compared (Fig. 2), TFP was found to be the most efficient hemolytic agent (83.9 %) for the highest concentration used (480 μ M). DBC, induced 50 % hemolysis at 3 mM and PZQ induced only 6.4 % hemolysis at 4.5 mM. According to Kanaho *et al.* (1981), the effect of a drug on erythrocyte membranes could

be divided into two main steps: the selective transfer of drugs from the external medium to the membrane (described by partition coefficient), and the intensity of the membrane-perturbing action of the drug molecule once incorporated into the membrane. The results obtained in the hemolytic study (Fig. 2) are in agreement with other reports showing that TFP has both a higher partition coefficient and a higher exothermic heat effect when compared with DBC and PZQ (Malheiros *et al.*, 1998b), supporting the predictions of Kanaho *et al.* (1981).

The release of cholesterol from the membrane into the supernatants following interaction with the tested drugs, although more marked for TFP and for DBC than for PZQ (Fig. 3), may be implicated in a decrease in membrane microviscosity, already described for the interaction of anaesthetic agents with the erythrocyte membrane (Norman *et al.*, 1997). Furthermore, the exfoliation of membrane phospholipids indicates that the interaction of these drugs with erythrocytes increases the fluidity of the erythrocyte membrane, as already described for the hemolytic activity of some detergents (Galembeck *et al.*, 1998). This drug-induced membrane disorganization was much stronger for the cationic drugs TFP and DBC than for the neutral drug, PZQ.

Analyzing the differences in phospholipids and cholesterol release from the membrane bilayer that accompanies drug-induced lysis, together with the increase of hemolysis, no proportionality was found. In fact, when compared to DBC, TFP promoted a two times higher elution of cholesterol, suggesting that TFP interacts more directly with cholesterol or induces particular membrane disturbances that culminate in cholesterol release. Based on the low CMC of TFP (about 40 μM) (Spinedi *et al.*, 1992; Malheiros *et al.*, 1998a) and its surfactant properties, it is conceivable that micellar hydrophobic environment created by drug aggregation may attract cholesterol, leading to mixed-micelles formation that facilitate cholesterol elution from the membrane. The aggregant property of TFP may contribute to the high efficacy of TFP as a hemolytic agent (Malheiros *et al.*, 1998a). The lower elution of cholesterol by DBC may result from a less specific interaction with cholesterol, or from the inability of DBC to form micelles. Despite the slight exfoliation of lipids induced by PZQ, the elution of cholesterol was ~ 1.6 times greater than that of phospholipids, probably resulting from the large PZQ molecule accommodation in the lipid layer (Schepers *et al.*, 1988) preferentially perturbing the membrane cholesterol stability.

The cytotoxic effects of TFP, DBC and PZQ on human erythrocyte morphology, hemolysis and lipid exfoliation reflect the hydrophobicity,

solubility, ionization state and aggregative properties of each drug, which directly influence drug-membrane interactions.

5. REFERENCES

- Agin, D., Hersh, L. and Holtzman, D. (1965). The action of anesthetics on excitable membranes: a quantum chemical-analysis. *Prod. Natl. Acad. Sci. USA*. **53**, 952-958.
- Andrews, P., Thomas, H., Pohlke, R. and Seubert, J. (1983). Praziquantel. *Med. Res. Rev.* **3**, 147-200.
- Baldessarini, R. J. (1996). Fifty years of biomedical psychiatry and psychopharmacology in America. In: *Fifty years of American Psychiatry* (R. Meninger and J. Nemiah, Ed.), pp. 35-48. American Psychiatric Press, Washington.
- Bartlett, G. R. (1959). Phosphorus assay in column chromatography. *J. Biol. Chem.* **234**, 466-468.
- Bassé, F., Sainte-Marie, J., Maurin, L. and Bienvenüe, A. (1992). Effect of benzyl alcohol on phospholipid transverse mobility in human erythrocyte membrane. *Eur. J. Biochem.* **205**, 155-162.
- Bereza, U. L., Brewer, G. J. and Mizukami, I. (1983). Association of calmodulin inhibition, erythrocyte membrane stabilization and pharmacological effects of drugs. *Biochim. Biophys. Acta*. **692**, 305-314.
- Bervers, E. M., Comfurius, P. and Zwaal, R. F. A. (1996). Regulatory mechanisms in maintenance and modulation of transmembrane lipid asymmetry: pathophysiological implications. *Lupus*. **5**, 480-487.
- Brites, D., Silva, R. and Brito, A. (1997). Effect of bilirubin on erythrocyte shape and haemolysis, under aggregating or non-aggregating conditions, and correlation with cell age. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **57**, 337-350.
- Bruto, M. A., Silva, R. M., Matos, D. C., da Silva, A. T. and Brites, D. T. (1996). Alterations of erythrocyte morphology and lipid composition by hyperbilirubinemia. *Clin. Chim. Acta*. **249**, 149-165.
- Bruto M. A., Silva R., Tiribelli, C. and Brites, D. (1998). Concentration- and temperature-dependent toxicity of bilirubin in erythrocytes. *Blood* (submitted).

Chen, J. Y. and Huestis, W. H. (1997). Role of membrane lipid distribution in chlorpromazine-induced shape change of human erythrocytes. *Biochim.*

Biophys. Acta. **1323**, 299-309.

Day, T. A., Bennet, J. L. and Pax, R. A. (1992). Praziquantel: the enigmatic antiparasitic. *Parasitology Today*. **8**, 342-344.

De Paula, E. and Schreier, S. (1995). Use of a novel method for determination of partition coefficient to compare the effect of local anesthetics on membrane structure. *Biochim. Biophys. Acta.* **1240**, 25-33.

Deuticke, B. (1968). Transformation and restoration of biconcave shape of human erythrocytes induced by amphiphilic agents and shapes of ionic environment. *Biochim. Biophys. Acta.* **163**, 494-500.

Elgsaeter, A. and Mikkelsen, A. (1991). Shapes and changes *in vitro* in normal red blood cells. *Biochim. Biophys. Acta.* **1071**, 273-290.

Frohberg, H. (1989). The toxicological profile of praziquantel in comparison to other anthelmintic drugs. *Acta Leiden*. **57**, 201-215.

Fujii, T., Sato, T., Tamura, A., Wakatsuki, M. and Kanaho, Y. (1979). Shape changes of human erythrocytes induced by various amphipathic drugs acting on the membrane of the intact cells. *Biochem. Pharmacol.* **28**, 613-620.

Galembeck, E., Alonso, A. and Meirelles, N. C. (1998). Effects of polyoxyethylene chain length on erythrocyte hemolysis induced by poly[oxyethylene (*n*) nonylphenol] non-ionic surfactants. *Chem. Biol. Interact.* **113**, 91-103.

Hägerstrand, H. and Isomaa, B. (1991). Amphiphile-induced antihaemolysis is not causally related to shape changes and vesiculation. *Chem. Biol. Interact.* **79**, 335-347.

Harnett, W. (1988). The antihelminthic action of praziquantel. *Parasitology Today*. **4**, 144-146.

Isomaa, B. and Engblom, A. C. (1988). Is calmodulin inhibition involved in shape transformation induced by amphiphiles in erythrocytes? *Biochim. Biophys. Acta.* **940**, 121-126.

Kanaho, Y., Sato, T. and Fujii, T. (1981). The affinity of various phenothiazine drugs for membranes of intact erythrocytes and their membrane-transforming activity. *Molec. Pharmacol.* **20**, 704-708.

Kaul, R., Bajpai, U. K., Shipstone, A. C., Kaul, A. H. and Murti, C. R. K. (1981). Bilirubin-induced erythrocyte membrane cytotoxicity. *Exp. Mol. Pathol.* **34**, 290-298.

Marroum, P. J. and Curry, S. H. (1993). Red blood cell partitioning, protein binding and lipophilicity of six phenothiazines. *J. Pharmac. Pharmacol.* **45**, 39-42.

Malheiros, S. V. P., de Paula, E. and Meirelles, N. C., (1998a). Contribution of trifluoperazine/lipid ratio and drug ionization to hemolysis. *Biochim. Biophys. Acta.* **1373**: 332-340.

Malheiros, S. V. P., Meirelles, N. C. and Volpe, P. L. O. (1998b). A critical analysis of microcalorimetric methodology for drug-induced haemolysis. *Thermochim. Acta.* (submitted).

Meirelles, N. C., Malheiros, S. V. P., Ruggiero, A. C. and Degterev, I. A. (1994). 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 an unidentified water-soluble microsomal factor (UF). *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* **19**, 349-357

Moffat, A. C. (1986). Analytical and Toxicological Data. In: *Clarke's Isolation and Identification of Drugs*, pp. 1044. The Pharmaceutical Press, London.

Nelson, M. J., Daleke, D. L. and Huestis, W. H. (1983). Control of erythrocyte shape by Calmodulin. *J. Cell Biol.* **96**, 730-735.

Norman, R. I., Hirst, R., Appadu, B. L., McKay, M., Bradley, P., Griffiths, R. and Rowbotham, D. J. (1997). Anaesthetic potency of inhalation agents is independent of membrane microviscosity. *Brit. J. Anaesthesia* **78**, 290-295.

Ott, P., Binggeli, Y. and Brodbeck, U. R. S. (1982). A rapid and sensitive assay for determination of cholesterol in membrane lipid extracts. *Biochim. Biophys. Acta.* **685**, 211-213.

Reinhart, W. H., Sung, L. A., Schueesler, G. B. and Chien, S. (1986). Membrane protein phosphorylation during stomatocyte-echinocyte transformation of human erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta.* 862, 1-7.

Roth, S. and Seeman, P. (1972). The membrane concentration of neutral and positive anesthetics (alcohols, chlorpromazine, morphine) fit the Meyer-

Overton rule of anesthesia, negative narcotics do not. *Biochim. Biophys. Acta.* 255, 207-219.

Rouser, G., Fleischer, S. and Yamamoto, A. (1969). Two dimensional thin layer chromatographic separation of polar lipids and determination of phospholipids by phosphorus analysis of spots. *Lipids.* 5, 494-496.

Scherier, S. L., Zachowski, A. and Devaux, P. F. (1992). Mechanisms of amphipath-induced stomatocytosis in human erythrocytes. *Blood.* 79, 782-786.

Schepers, H., Brasseur, R., Goormaghtigh, E., Duquenoy, P. and Ruyschaert, J. M. (1988). Mode of insertion of praziquantel and derivatives into lipid membranes. *Biochem. Pharmacol.* 37, 1615-1623.

Seeman, P. (1966). Erythrocyte membrane stabilization by local anesthetics and tranquilizers. *Biochem. Pharmacol.* 15, 1753-1766.

Sheetz, M. P. and Singer, S. J. (1974). Biological membranes as bilayer couples. A molecular mechanism of drug-erythrocyte interactions. *Prod. Natl. Acad. Sci. USA.* 71, 4457-5561.

Singer, S.J. and Nicolson, G. L. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science.* 175, 720-731.

Spinedi, A., Pacini, L., Limatola, C., Luly, P. and Farias, R. N. (1992). Phenothiazines inhibit acetylcholinesterase by concentration-dependent-type kinetics. *Biochem. Pharmacol.* 44, 1511-1514.

Strichartz, G. K. and Ritchie, J. M. (1987) The action of local anesthetic on ion channels of excited tissues. *In: Local Anesthetics. Handbook of Experimental Pharmacology* (Strichartz G.R. ed) vol. 81, cap 2, Springer Verlag, Berlin.

Todd, J. C., Sanford, A. H. and Davidsohn, I. (1979). Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. WB Saunders Company, Philadelphia:

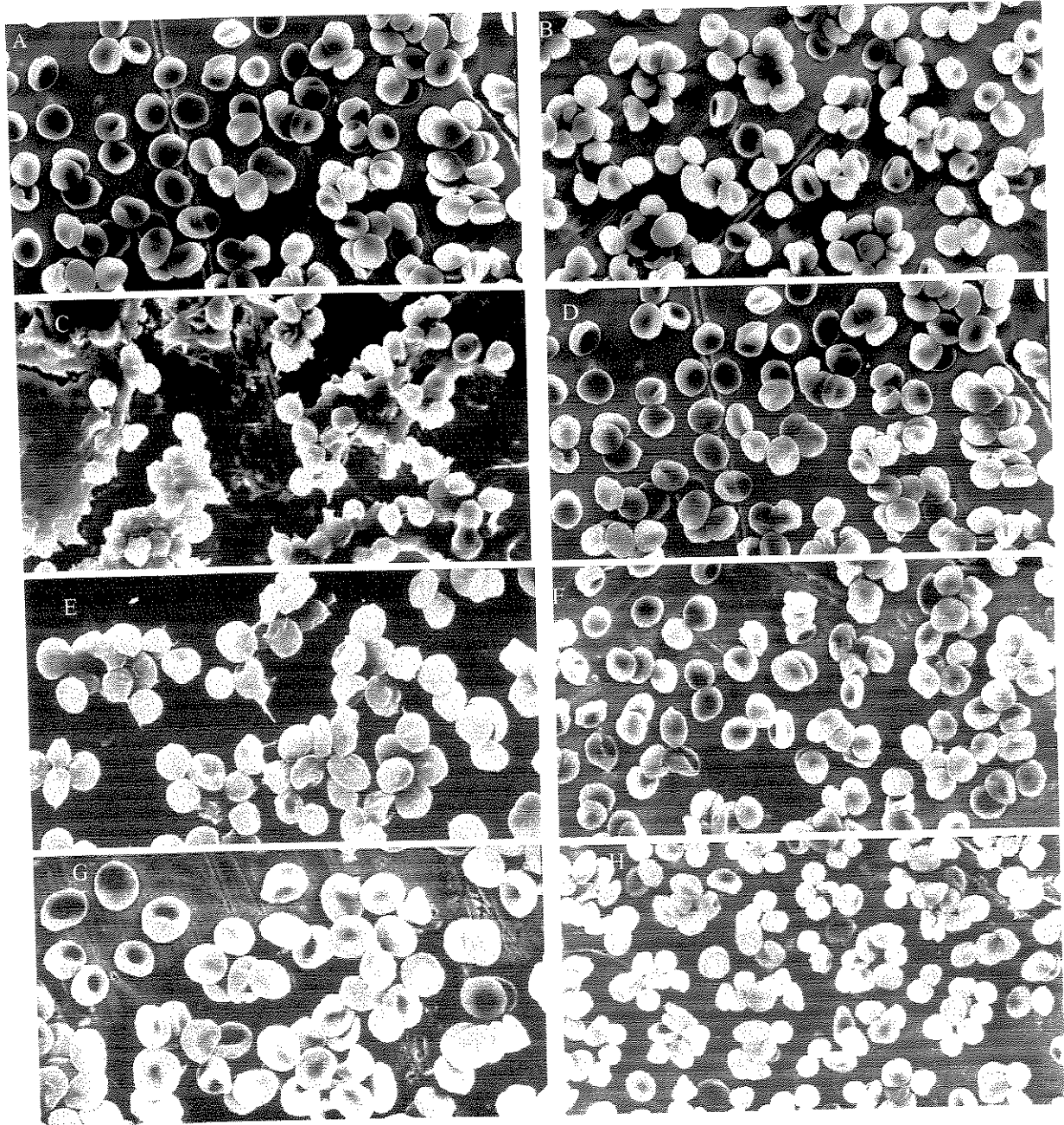


Fig. 1. Scanning electron micrographs showing the effect of increasing concentrations of trifluoperazine (TFP), dibucaine (DBC) and praziquantel (PZQ) on human erythrocyte morphology. Erythrocytes (final hematocrit, 10%) were incubated at 37°C for 1 hr under the following conditions: (A) in the absence of any drug, (B) in the presence of 120 (C) and 360 μ M of TFP, (D) in the presence of 0.75 (E) and 2.25 mM of DBC, (F) in the absence of any drug but with DMSO 2 %, (G) in the presence of 1.5 (H) and 4.5 mM of PZQ. Details of the microscopic preparations are given in Materials and Methods. Magnification: 3700 x.

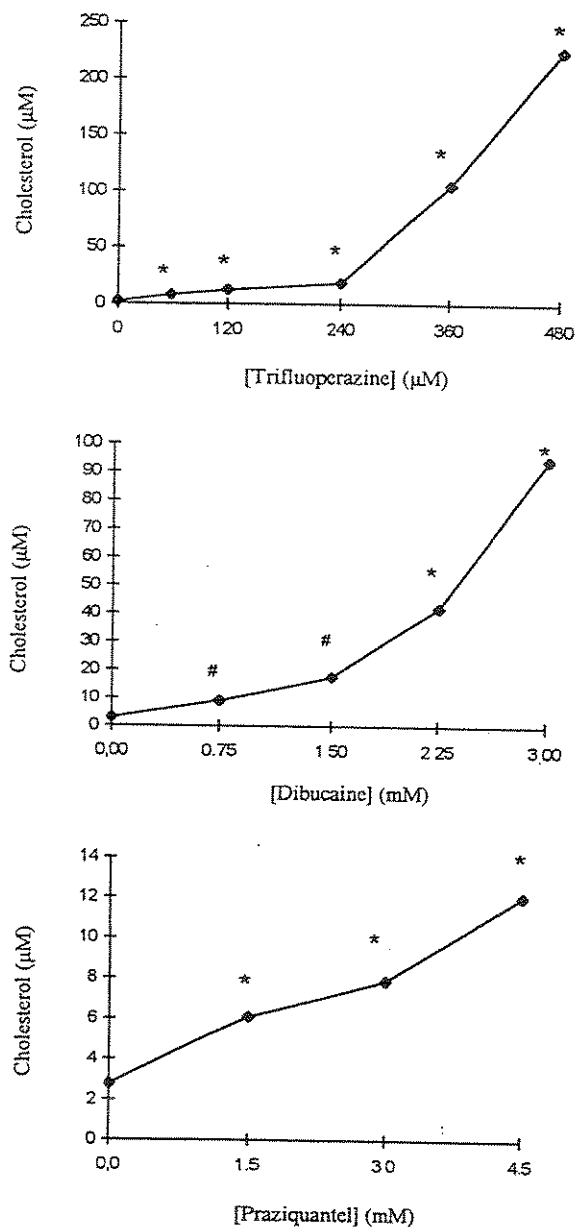


Fig. 3. Cholesterol content in the supernatants following drug interaction with erythrocytes. Erythrocytes in a 10% suspension were separately incubated for 1 hr at 37°C with trifluoperazine, dibucaine or praziquantel, and cholesterol in the supernatants was determined as described in Materials and Methods. Each point represents the mean $\pm$ SEM of four independent experiments. * $P < 0.01$ and # $P < 0.05$ vs. controls.

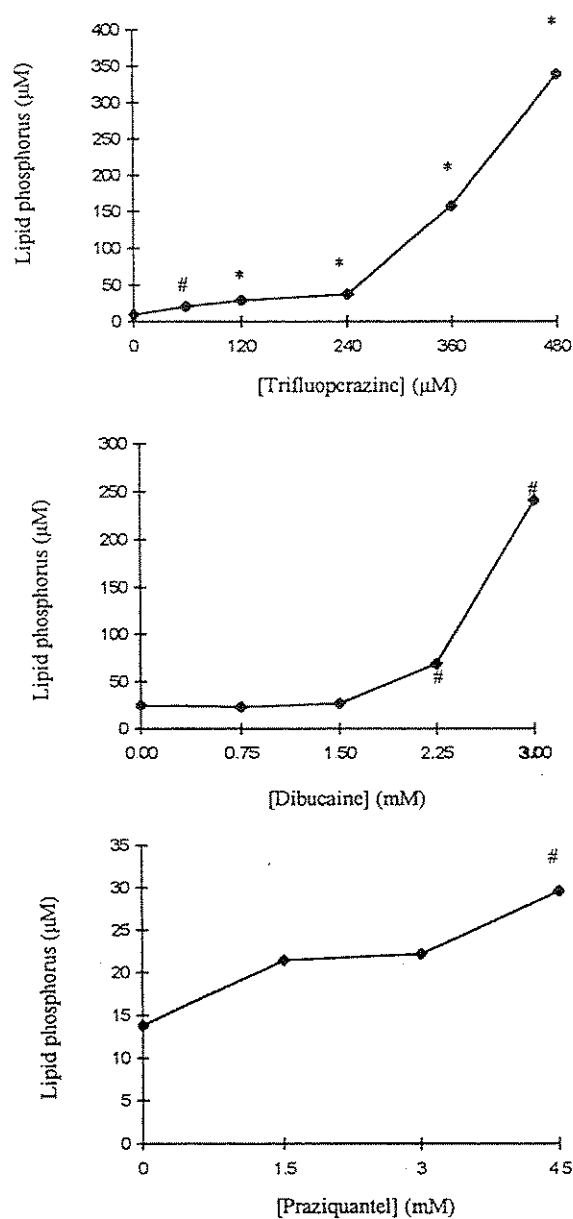


Fig. 4. Phospholipid content in the supernatants following drug interaction with erythrocytes. Erythrocytes in a 10% suspension were separately incubated for 1 hr at 37°C with trifluoperazine, dibucaine or praziquantel, and lipid phosphorus in the supernatants was determined as described in Materials and Methods. Each point represents the mean $\pm$ SEM of four independent experiments. * $P < 0.01$ and # $P < 0.05$ vs. controls.

Table 1: Dose-response effects of trifluoperazine, dibucaine and praziquantel on erythrocyte shape, expressed as morphological index of the treated cells

	Trifluoperazine				Dibucaine				Praziquantel		
	(μM)				(mM)				(mM)		
	60	120	240	360	0.75	1.5	2.25	3.0	1.5	3.0	4.5
Morphological index	-0.6	-1.3	-1.8	-3.9	-0.9	-1.4	-2.7	-3.5	-1.1	-1.4	-1.4

Erythrocytes in a 10% suspension were incubated for 1 hr at 37°C with different concentrations of the three drugs tested. The morphological index was calculated according to the following formula: morphological index = Σ (morphological score) x [(number of distorted cells)/(total cell number)] based on the analysis of erythrocyte morphology by scanning electron microscopy of a total of 200 to 300 cells counted in 3-4 randomly selected fields. The scores assigned were: 0 for normal discocytes, -1 for stomatocytes, -2 for spherostomatocytes, -3 for spherocytes and -4 for fusion-like cells.

3. DISCUSSÃO

Como medida da ação perturbadora da TFP, da DBC e do PZQ sobre membranas, analisamos quali e quantitativamente a eficiência hemolítica, o efeito térmico envolvido na hemólise, as alterações morfológicas e o perfil de eluição de lipídios (fosfolipídios e colesterol) de eritrócitos submetidos a concentrações líticas e/ou sublíticas destas drogas. Porém, é o conhecimento estrutural e físico-químico de cada substância que nos auxilia a compreender os resultados obtidos e suas atividades biológicas.

Assim, neste trabalho consideramos também o modo pelo qual o coeficiente de partição (P), o grau de ionização (pK), as propriedades de agregação (CMC) e os efeitos estéricos dos anfífilicos podem influenciar a interação dos xenobióticos com as membranas biológicas.

É interessante, inicialmente, considerar alguns aspectos físico-químicos dos xenobióticos estudados.

A TFP é um derivado fenotiazínico de caráter anfipático. O núcleo fenotiazínico possui três anéis dos quais dois são benzênicos e se ligam por um átomo de nitrogênio e por um átomo de enxofre e corresponde a porção hidrofóbica da molécula, enquanto a porção hidrofílica corresponde à cadeia lateral piperazínica inserida na posição 10 (ver Figura 2, página 12). A DBC é um anestésico local do tipo aminoamida também anfipática que possui como porção hidrofóbica um anel quinolínico, e como grupamento hidrofílico uma amina terciária unida por uma cadeia acila intermediária contendo 4 carbonos (Gupta, 1991) (ver Figura 3, página 13).

Tanto a TFP quanto a DBC possuem um grupamento amina ionizável com pK de 8,1 e 8,3 respectivamente (Agin *et al.*, 1965; Moffat, 1986) de modo que, em pH fisiológico (7,4) ambas as formas, neutra e carregada encontram-se presentes. Os valores de solubilidade para a TFP e DBC são bastante próximos e ambas, como moléculas anfífilicas, quando protonadas possuem comportamento surfactante e formam micelas (Malheiros *et al.*, 1998b). A observação do pK , da solubilidade e suas implicações práticas nos foi útil desde o primeiro momento, já que a concentração de DBC nos experimentos hemolíticos excedia a sua solubilidade em pH 7,4. Alternativamente, realizamos estes ensaios em pH 6,8 de modo que a fração de droga carregada foi aumentada e conseqüentemente, sua solubilidade.

O PZQ é uma molécula plana composta por quatro anéis alicíclicos bastante hidrofóbicos que conferem a esta molécula uma dificuldade de interação com o ambiente aquoso (ver Figura 4, página 15). A dificuldade inicial dos estudos com o PZQ foi justamente encontrar um sistema no qual esta droga fosse solúvel e, ao mesmo tempo, inerte para as hemáceas. Após diversas tentativas com vários solventes (etanol, glicerina, detergentes não iônicos, óleo de mamona), aquecimento e sonicação conseguimos uma boa solubilização em dimetilsulfóxido (DMSO). A concentração máxima de DMSO inclusa na amostra de trabalho foi de 5 %, já que acima de 10 % havia indução de hemólise causada pelo próprio DMSO.

3.1. Partição de Drogas entre Fases Apolares (Membranas/Octanol) e Água

O coeficiente de partição dos xenobióticos entre sistemas apolares e água foi determinado para diversos modelos de membrana. Utilizamos uma membrana lipídica pura (lipossomas multilamelares de fosfatidilcolina de ovo), uma membrana com alto conteúdo (70% em peso) de proteínas (microssomas) (Hird, 1964) e uma membrana com quantidades equivalentes de lipídios e proteínas ("ghosts" de eritrócitos) (Warren, 1987), além de uma fase apolar isotrópica, o n-octanol. A diferença de afinidade da droga pelos vários sistemas apolares pode indicar mecanismos específicos da interação droga-membrana.

Em todas as fases apolares (membranas e octanol) o coeficiente de partição da TFP foi maior do que o dos demais xenobióticos, exceto para lipossomas onde os valores de *P* da TFP e da DBC são praticamente iguais. Este é um fato curioso, já que a TFP também é bastante solúvel em água e não deveria apresentar maior solubilidade em membranas. Dois fatores poderiam contribuir para explicar estes resultados: (i) a afinidade específica da TFP com algum componente da membrana e (ii) uma alteração do grau de ionização (razão de droga protonada e neutra) nas condições experimentais.

Comparativamente a da DBC, a maior partição da TFP em microssomas e "ghosts" de eritrócitos e uma partição similar no ambiente exclusivamente lipídico (lipossomas), pode refletir uma interação específica da TFP com proteínas membranares (Malheiros *et al.*, 1998a,b,c). Evidências de que a TFP interage com proteínas de membrana de eritrócitos têm sido descritas (Minetti & Di Stasi, 1987; Marroum & Curry, 1993; Ruggiero *et al.*, 1998). Conforme será discutido posteriormente, a modificação da ionização da TFP na presença de membranas também parece favorecer sua partição (Malheiros *et al.*, 1998a,c). Mostramos que a TFP encontra-se 40% na forma neutra em pH 7,4 enquanto a DBC somente 15% (Malheiros *et al.*, 1998c).

Assim, podemos supor, por esse aumento da forma neutra da TFP, que haja uma maior contribuição de interações hidrofóbicas na interação TFP-membrana do que na interação DBC-membrana. Por outro lado, as propriedades agregativas da TFP parecem favorecer a troca de monômeros entre os ambientes da micela e da membrana (Malheiros *et al.*, 1998a,c), o que aumentaria a penetração de ambas as formas da TFP, em pH 7,4.

A característica da TFP de possuir alta afinidade por membranas biológicas tem uma implicação clínica importante, pois permite que ela atravesse facilmente a barreira hematoencefálica e possua alta potência antipsicótica.

A primeira vista parece incoerente que o PZQ, o composto de menor solubilidade aquosa e, portanto, mais hidrofóbico, interaja menos com os ambientes apolares (menores valores de P). No entanto, é justamente a baixa solubilidade no ambiente aquoso que limita sua entrada na membrana (Malheiros *et al.*, 1998c). Outros autores já descreveram que a solubilidade aquosa é tão importante quanto a hidrofobicidade para a farmacodinâmica de compostos tais como AL, pois a velocidade de transferência dos mesmos entre membranas é mediada pela sua solubilidade nos compartimentos aquosos intermediários (Kubinyi, 1979; de Paula & Schreier, 1995).

Podemos observar que a partição de um soluto entre dois ambientes distintos é influenciada não somente pelas características físico-químicas do composto mas também pelas características intrínsecas do ambiente com o qual irá interagir. Por exemplo, os valores de P^{GHOST} para todas as drogas eram menores do que os valores de P das outras membranas. A restrição à entrada do soluto reflete a menor fluidez da membrana eritrocitária, em consequência da presença de um citoesqueleto proteico e de seu alto conteúdo de colesterol (Malheiros *et al.*, 1998a).

A validade da informação oferecida pelos valores de P entre solventes e água, por exemplo P^{OCT} , tem sido muito discutida porque o solvente apresenta um ambiente muito diferente do membranar (não possui simetria bilateral como as bicamadas) e por isso tem-se sugerido que valores de P^{OCT} devem ser utilizados parcimoniosamente como modelos para inferir a distribuição da droga em membranas biológicas (Korten & Miller 1979; de Yong & Dill, 1988; Gobas *et al.*, 1988; Lissi *et al.*, 1990). Korten & Miller (1979) descreveram a partição de diversos barbituratos em membranas biológicas e em solventes e seus resultados mostram uma superestimação da partição nos sistemas modelo. Nossos resultados também mostram grandes divergências entre os valores de P^{OCT} e P nas diversas membranas (Malheiros *et al.*, 1998a,b,c). Porém, mesmo entre as membranas biológicas estudadas, a partição variou

significativamente, (Malheiros *et al.*, 1998a,b,c) o que sugere que não se pode generalizar a correspondência de valores de P para quaisquer ambientes hidrofóbicos distintos, antes, há que se levar em conta a composição e a estrutura das biomembranas.

Os valores de coeficientes de partição apresentados são resultados de pelo menos três experimentos independentes, com pelo menos, três diferentes concentrações de membrana ou octanol ($n \geq 9$), obtendo variações de desvios padrões de 11 até 35 %. Esta variação é considerada aceitável se levarmos em conta a metodologia utilizada, isto é, a de separação de fases (com determinação do soluto feita na fase aquosa). Este procedimento pode levar a erros devido a possibilidade de alguma membrana permanecer no sobrenadante ou de haver co-sedimentação de soluto entre as membranas depositadas (van Hoogevest & de Kruijff, 1978; Lissi *et al.*, 1990) por exemplo porque uma certa quantidade de droga poderia permanecer ligada à superfície da membrana por simples interação eletrostática (Ogiso *et al.*, 1986).

3.2. Curvas Hemolíticas

Todos os compostos estudados apresentaram um comportamento bifásico, isto é, protegeram eritrócitos quando expostos ao meio hiposmótico (Malheiros *et al.*, 1998c) e induziram lise eritrocitária concentração-dependente em meio isosmótico (Malheiros *et al.*, 1998a,b,c,d). Embora este fato já houvesse sido descrito na literatura para a TFP e para a DBC (Seeman, 1966; Roth & Seeman, 1972) é um dado inédito para o PZQ.

A proteção contra a lise hiposmótica parece ser consequência da intercalação de moléculas na bicamada que poderia favorecer a resistência mecânica da mesma (Seeman *et al.*, 1966), ou ainda promover um aumento da permeabilidade da membrana e um rápido efluxo de íons, diminuindo a pressão osmótica entre o meio intracelular e o tampão hipotônico (Hagerstränd & Isomaa, 1991). A partir das curvas de proteção podemos determinar a concentração de droga que causa o efeito protetor máximo, C^{PROT} (Malheiros *et al.*, 1998c). Para os compostos que têm capacidade de agregação (TFP e DBC), notamos que a C^{PROT} é inferior aos valores de CMC, indicando, portanto, que a interação estabilizadora destas drogas com a membrana eritrocitária dá-se pela intercalação do monômero na membrana.

Para todos os xenobióticos estudados o efeito hemolítico em condições isosmóticas apresentou um comportamento sigmoidal característico. Em baixas concentrações, observa-se que a membrana eritrocitária é capaz de absorver uma certa quantidade de xenobióticos sem que a lise ocorra, é o

período que corresponde ao primeiro platô da curva sigmóide. A partir de determinada concentração (C^{SAT}) a membrana fica saturada pela droga e qualquer acréscimo de concentração levará à desorganização da membrana e lise celular. O incremento de concentração acima de C^{SAT} , induz uma desorganização muito rápida da membrana (porção ascendente da curva sigmóide) que reflete o efeito cooperativo da bicamada lipídica. Finalmente, quando a concentração de droga é suficientemente alta para promover total desestruturação da membrana, (C^{SOL}) temos o segundo platô da curva sigmóide.

De acordo com a literatura (Kanaho *et al.*, 1981), as propriedades hemolíticas estão relacionadas à partição dos xenobióticos na membrana eritrocitária. Concordante com esta afirmação, nossos resultados mostraram que a TFP, a droga que melhor interage com a membrana eritrocitária, tem o maior P e é a melhor indutora de lise, seguida pela DBC e pelo PZQ (Malheiros *et al.*, 1998b,c,d).

A TFP protege eritrócitos da hemólise hiposmótica independentemente do tempo de incubação estudado (10, 30 ou 60 min) (Malheiros *et al.*, 1998c). O mesmo não ocorre com a DBC e o PZQ, os quais em 10 minutos de incubação induzem uma proteção significativamente menor do que em 30 e 90 minutos (dados não mostrados). Os experimentos de lise em meio isosmótico (Malheiros *et al.*, 1998a,b,c) também mostram a importância da cinética da interação entre o xenobiótico e a membrana eritrocitária: a TFP induz lise total em 10 minutos de incubação, enquanto a DBC precisa de 30 minutos e o PZQ de 90 minutos de incubação para que a lise ocorra.

Segundo Kanaho e colaboradores (1981), o efeito de uma droga na membrana pode ser dividido em duas etapas: (i) a transferência seletiva da droga do meio externo para a membrana e uma vez que a droga tenha sido incorporada à membrana, (ii) a intensidade da ação perturbadora da estrutura membranar.

Kanaho e colaboradores (1981) já haviam descrito que a incorporação da TFP a eritrócitos e "ghosts" de eritrócitos é instantânea e independente da temperatura, e que portanto, o equilíbrio de distribuição da TFP entre o meio aquoso e a membrana dá-se muito rapidamente. É possível que a incorporação da TFP esteja refletindo as rápidas trocas entre monômeros de TFP e fosfolipídios de membrana que se estabelecem no equilíbrio dinâmico entre a micela mista (TFP mais fosfolipídios) e a bicamada lipídica.

No caso da DBC e do PZQ poderíamos considerar duas alternativas: (i) a partição da droga na membrana é lenta, ou seja, a constante de equilíbrio

da droga entre a fase aquosa e o ambiente da membrana requer bastante tempo (30 ou 90 minutos) e faz com que a desestruturação da membrana, que é dependente da partição, somente ocorra depois deste tempo, ou ainda, (ii) a partição da droga na membrana é rápida, ou seja, a constante de equilíbrio da droga entre a fase aquosa e o ambiente da membrana é atingida rapidamente, porém a desorganização da membrana (rearranjo lipídico e/ou modificações no citoesqueleto proteico) é lenta.

No entanto, há vários artigos científicos que descrevem a incorporação da DBC em vesículas lipídicas por métodos diferentes: RPE (Giotta *et al.*, 1974), filtração em gel (Mayer *et al.*, 1985), titulação microcalorimétrica (Seelig & Ganz, 1991) e fluorescência (Barghouthi *et al.*, 1993) que são unânimes em afirmar que a incorporação da DBC aos diferentes lipídios estudados dá-se rapidamente, no máximo em alguns minutos. Portanto, podemos considerar que o efeito lítico atribuído à DBC provavelmente ocorre de acordo com, a segunda alternativa descrita acima, ou seja, sua partição na membrana é rápida, porém a desorganização que ela desencadeia na estrutura da bicamada é que requer trinta minutos para efetuar-se.

Já o efeito lítico induzido pelo PZQ que requer um tempo muito maior para ocorrer poderia ser justificado por uma lenta incorporação na membrana pois sua baixa solubilidade aquosa provavelmente limita muito sua entrada na membrana (Malheiros *et al.*, 1998c).

A TFP mostrou a maior eficiência hemolítica, seguida pela DBC e pelo PZQ. Além da questão cinética considerada acima, se observarmos os valores de C^{PROT} , C^{SAT} e C^{SOL} (Malheiros *et al.*, 1998a,b,c) constatamos que a concentração de TFP capaz de induzir quaisquer dos efeitos sobre a membrana (proteção, saturação ou lise) é sempre muito menor (na ordem de μM) que as concentrações de DBC e PZQ (na ordem de mM) indutoras do mesmo efeito. Estes dados estão de acordo com os valores de P , ou seja, a droga que menos particiona na membrana, o PZQ, precisa de uma concentração e de um tempo maior para promover o mesmo efeito do que uma droga que se distribui muito facilmente na membrana.

Se observarmos as concentrações de droga que iniciam o processo hemolítico (C^{SAT}) em todos os hematócitos estudados, vemos que C^{SAT} para a TFP é coincidente ou maior que sua CMC, ou seja, a droga sempre induz lise na forma agregada. O mesmo não ocorre para a DBC, que inicia um processo hemolítico enquanto monômero (Malheiros *et al.*, 1998a,c). Isto justifica porque a TFP consegue promover lise total da membrana mesmo estando presente em concentrações tão baixas. O ambiente hidrofóbico das micelas promove a saída de lipídios da membrana eritrocitária,

desestabilizando-a. Este fato é bastante conhecido para os agentes surfactantes clássicos, os detergentes (Atwood & Florence, 1983; Galembeck *et al.*, 1998). Obviamente o PZQ, que não possui cargas, não forma micelas e induz lise sempre na forma monomérica.

3.3. Determinação da Razão Efetiva Droga/Lipídio na Hemólise

A análise quantitativa do efeito hemolítico induzido pelos xenobióticos, ou seja, a determinação da razão efetiva droga/lipídio na membrana (Re) para proteção, saturação ou solubilização da membrana eritrocitária, foi realizada de dois modos distintos: (i) utilizando uma metodologia clássica para compostos surfactantes proposta por Lichtenberg (1985) e (ii) calculando a concentração real de droga na membrana a partir dos valores de C^{PROT} , C^{SAT} e C^{SOL} corrigidos pela partição na membrana de eritrócito (P^{GHOST}).

Além de permitir o cálculo da razão droga/lipídio efetiva para saturação e solubilização da membrana eritrocitária, a metodologia proposta por Lichtenberg permite o cálculo de outros parâmetros como a CMC e a constante de ligação (K_b). Além do mais, à partir de K_b e do volume parcial molar da fase lipídica podemos deduzir o valor de P entre eritrócito/água sem utilizarmos a técnica de separação de fases.

Os resultados obtidos utilizando o modelo proposto para o estudo da solubilização de bicamadas lipídicas por detergentes (Lichtenberg, 1985) mostraram-se coerentes somente para a TFP, que é o único composto com características surfactantes semelhantes às dos detergentes: alto grau de interações hidrofóbicas intermoleculares que resultam na formação de micelas em baixas concentrações ($CMC = 42 \mu M$) (Malheiros *et al.*, 1998a).

Com o emprego desta metodologia, o valor de CMC obtido para TFP foi próximo ao valor determinado experimentalmente, enquanto que para a DBC foi cerca de 10 vezes menor. Além do mais, enquanto as razões molares droga/lipídio (Re) para saturação (0,43:1) e solubilização (1,5:1) da membrana eritrocitária obtidas para a TFP (Malheiros *et al.*, 1998a,c) estavam próximas de valores encontrados para a solubilização de membranas lipídicas induzidas por outros agentes surfactantes (Partearroyo *et al.*, 1992; Requero *et al.*, 1993), os valores de Re obtidos para DBC e PZQ (Malheiros *et al.*, 1998c), mostraram valores inconcebíveis.

Os valores de P em eritrócitos/água obtidos a partir de K_b pelo método de Lichtenberg para TFP e DBC foram superiores aos valores de P^{GHOST}

experimentais, embora para a DBC os valores tenham sido mais próximos, sugerindo que o valor de K_b da TFP esteja superestimado pois além da partição na membrana temos a formação de micelas, enquanto o K_b da DBC refletiria somente a partição na membrana (Malheiros *et al.*, 1998c).

Nossos resultados (Malheiros *et al.*, 1998c), sugerem que o tratamento clássico proposto por Lichtenberg para solubilização de vesículas lipídicas por agentes surfactantes não se aplica para a solubilização de membranas biológicas mesmo considerando as propriedades surfactantes da TFP, talvez por estarmos utilizando uma membrana de composição heterogênea com características diferentes do modelo utilizado por Lichtenberg.

Já que as determinações de Re pelo modelo proposto por Lichtenberg (1985) não foram satisfatórias, utilizamos uma segunda alternativa: escolhemos um hematócrito definido e calculamos a concentração efetiva de droga na membrana a partir de C^{PROT} , C^{SAT} e C^{SOL} e do valor de partição na membrana de eritrócito (P^{GHOST}). Para a TFP, tanto o início da hemólise quanto a lise total dá-se em razões droga/lipídio muito baixas, inferiores ao esperado para saturação da membrana (Malheiros *et al.*, 1998c), o que sugere que a desagregação da membrana que resulta na hemólise induzida por este composto, não se deva exclusivamente à sua partição na membrana eritrocitária, mas sim, à associação da partição com o favorecimento da eluição de lipídios da membrana para a fase micelar da TFP, semelhante à lise induzida por detergentes (Galembeck *et al.*, 1998). Em relação à DBC e PZQ, as razões droga/lipídio encontradas (Malheiros *et al.*, 1998c) foram bastante satisfatórias em ambos os casos e indicam que a lise ocorre por uma real saturação da membrana eritrocitária conseqüente da intercalação dos monômeros de DBC e PZQ.

3.4. Contribuição da Ionização dos Xenobióticos na Interação com Membranas

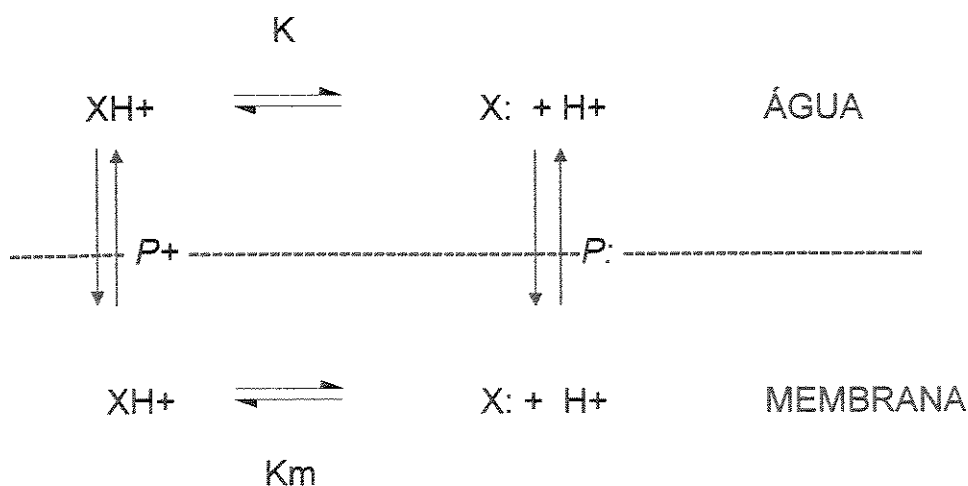
Considerando o pK da TFP e da DBC, respectivamente 8,1 e 8,3, esperamos que em pH fisiológico ambas as drogas encontrem-se parcialmente ionizadas. A interação diferencial das formas neutra e protonada de um composto pode ser particularmente importante ao considerarmos a movimentação destas moléculas pelas bicamadas lipídicas, já que a forma neutra é muito mais permeável do que a carregada e se liga mais fortemente (Lee & Schreier, 1993).

A interação de moléculas neutras com membranas lipídicas é usualmente justificada pelo efeito hidrofóbico, que pressupõe que os resíduos hidrofóbicos destas moléculas tenham a tendência de evitar o contato com o

ambiente aquoso e penetrar no ambiente hidrofóbico da membrana (Tanford, 1980).

De modo geral, podemos considerar que a maior interação da forma neutra de um composto em relação à forma protonada com membranas deve-se, em primeira instância, às interações hidrofóbicas muito mais favorecidas pelo ambiente membranar do que pelo ambiente aquoso. Um segundo fator que diferencia a interação das formas carregada e não carregada de um composto são as interações eletrostáticas. A ligação de uma droga carregada a uma membrana inicialmente não carregada iria introduzir cargas dentro do ambiente membranar, o qual tenderia a repelir esta carga para a superfície. De modo oposto, a ligação de uma molécula carregada pode ser favorável se a membrana possuir um componente de sinal oposto ao do ligante. Ambos os fatores significam que a constante de ionização (K) de um composto será diferente para moléculas livres ou ligadas a membrana (Lee & Schreier, 1993).

A constante de ionização de um composto pode variar quando este particiona entre dois meios imiscíveis. Na distribuição de um composto ionizável (X) entre membrana e água temos um equilíbrio das contribuições da ionização (K) e da partição (P) diferencial das formas protonada e desprotonada deste composto, como mostra o Esquema I (Schreier *et al.*, 1984).



Esquema I: Partição das forma neutra ($X:$) e protonada (XH^+) de um soluto entre o sistema membrana/água.

Caso a partição das duas formas do composto sejam diferentes a concentração de cada uma encontrada na membrana será diferente. Essa diferença leva a um deslocamento do pK aparente (pK_{ap}) do composto, isto é,

o pH medido em água, na presença de membrana, em que o composto está metade dissociado. Lee *et al.* (1983) determinaram o ΔpK ($pK - pK_{ap}$) para uma série de compostos usando mobilidade eletroforética. Vários trabalhos vêm demonstrando que a interação de anestésicos locais com vesículas lipídicas é influenciada pela variação do pK (Schreier *et al.*, 1984; Eriksson & Westman, 1980; Eftink *et al.*, 1985; Miyazaki *et al.*, 1992).

Em nosso trabalho, analisamos a variação do pK utilizando o cálculo de pK_{ap} segundo a proposta de Lee & Schreier (1993) (Malheiros *et al.*, 1998a,c). Para o cálculo de pK_{ap} é necessária a determinação dos valores de coeficiente de partição das formas neutra ($P:$) e protonada ($P+$) de cada xenobiótico. Considerando que o pK da TFP e da DBC são próximos (8,1 e 8,3, respectivamente (Moffat, 1986; Agin *et al.*, 1965) basta que se altere o pH do meio para valores distantes do pK (10,5 e 5,5) para conseguirmos que as drogas encontrem-se totalmente na forma neutra ou protonada. A variação de pH, apesar de necessária para a análise da contribuição da ionização na interação droga-membrana, apresenta o inconveniente de ser incompatível com a estabilidade do modelo de estudo original (membrana eritrocitária) de modo que optamos por um modelo de estudo estável nestas condições: lipossomas multilamelares de fosfatidilcolina de ovo (EPC).

A partir da determinação do pK_{ap} pudemos calcular a contribuição das formas neutra e protonada dos xenobióticos, em pH 7,4, através do coeficiente de partição médio ($P_{médio}$) (Malheiros *et al.*, 1998a,c).

Considerando o pK da TFP e da DBC, respectivamente 8,1 e 8,3, poderíamos supor, a princípio, que ambas as drogas em pH 7,4 teriam um comportamento parecido no que se refere ao grau de ionização. No entanto, quando calculamos o pK na presença de uma fase apolar (lipossomas multilamelares de EPC), ou seja pK_{ap} , observamos que há uma maior contribuição da forma neutra no caso da TFP resultante da diferença entre os coeficientes de partição das formas neutra e protonada ($P:$ é 3 vezes maior do que $P+$), o que leva a um maior deslocamento do pK inicial (ΔpK) do que no caso da DBC, onde $P:$ é somente 1,5 vezes maior que $P+$ (Malheiros *et al.*, 1998a,c).

Como um reflexo das partições diferenciadas das formas neutra e protonada na membrana, a razão molar droga neutra/protonada (Z) em pH 7,4 também se modifica, apesar de, em ambos os casos, termos o predomínio da forma protonada (no caso da TFP em pH 7,4, Z é 0,67:1 e para a DBC, é 0,19:1). Isto pode contribuir para um maior efeito hidrofóbico da TFP e justificar parcialmente porque a TFP apesar de possuir pK e solubilidade (Malheiros *et al.*, 1998c) muito parecidas com a DBC apresenta maiores

valores de P e uma maior eficiência hemolítica e até mesmo, justificar a grande potência antipsicótica deste composto.

Uma outra aplicação importante desta análise, é que quando consideramos a modificação da constante de ionização pela presença de membranas, podemos calcular o valor de $P_{\text{médio}}$ (partição de ambas as formas, neutra e protonada, num pH definido) de modo muito mais preciso do que se não considerássemos este efeito. De modo que em nossos resultados, os valores de P^{LIP} para TFP e DBC obtidos experimentalmente (separação de fases) se aproximaram muito dos valores calculados ($P_{\text{médio}}$) (Malheiros *et al.*, 1998a,c).

3.5. Ensaio Microcalorimétricos

Em nossos experimentos microcalorimétricos, utilizamos a adição de concentrações de TFP e DBC suficientes para causar a lise total e imediata de eritrócitos (hematócrito 1%) e determinamos o efeito térmico deste processo. Os resultados obtidos mostraram que a diluição da TFP e da DBC no tampão de trabalho é um processo endotérmico enquanto que a hemólise induzida por estes compostos possui efeito térmico de direção oposta, isto é, é um processo exotérmico. Observamos ainda, que o efeito térmico da hemólise induzida pela TFP era quatro vezes maior que o induzido pela DBC (Malheiros *et al.*, 1998b). Infelizmente, os ensaios microcalorimétricos de hemólise induzida pelo PZQ não foram bem sucedidos devido ao altíssimo efeito térmico de diluição da mistura PZQ-DMSO que sobrepujava os valores do efeito térmico da hemólise.

A calorimetria é uma técnica não específica, logo, o efeito térmico observado não pode discriminar um evento particular e sim mostrar a somatória de todos as possíveis interações químicas que estão ocorrendo na cela de reação. De um modo geral, podemos descrever que processos químicos que envolvem interação ou agregação de compostos têm ΔH negativo, exotérmicos, enquanto que processos que envolvem diluição ou desagregação têm ΔH positivo, endotérmicos (Mc Glashan, 1979).

Se discriminarmos as possíveis interações que ocorrem desde que a TFP é adicionada à cela de reação e que culminam na lise total das células vermelhas correlacionando-as com os efeitos térmicos esperados, podemos destacar os seguintes eventos: - a diluição da TFP no ambiente da cela de reação ($\Delta H > 0$); - a partição da TFP monomérica (que está em equilíbrio dinâmico com a micela) na fase lipídica da membrana ($\Delta H < 0$); a interação específica da TFP monomérica com as proteínas da fase lipídica ($\Delta H < 0$); - a

elução de fosfolipídios da membrana ($\Delta H > 0$); - a partição dos lipídios eluídos na micela de TFP ($\Delta H < 0$); - a desorganização das interações hidrofóbicas que mantinham a estrutura de bicamada da membrana ($\Delta H > 0$) e conseqüente liberação do conteúdo intracelular (íons e principalmente hemoglobina) ($\Delta H > 0$).

Enquanto que, para a lise induzida pela DBC podemos destacar os seguintes eventos: - a diluição da DBC no ambiente da cela de reação ($\Delta H > 0$); - a partição da DBC monomérica na fase lipídica da membrana ($\Delta H < 0$); - a desorganização das interações hidrofóbicas que mantinham a estrutura de bicamada da membrana ($\Delta H > 0$) e conseqüente liberação do conteúdo intracelular (íons e principalmente hemoglobina) ($\Delta H > 0$).

Com a realização do experimento controle, ou seja, a adição de droga no tampão de trabalho em ausência de células, pudemos descontar o efeito térmico de pelo menos um dos processos simultâneos descritos acima: o da diluição das drogas (TFP e DBC) (Malheiros *et al.*, 1998b).

Considerando, então, os demais eventos envolvidos na hemólise induzida pela TFP, o resultado exotérmico obtido experimentalmente indica que os eventos que mais contribuem para o processo de lise são: a partição da TFP monomérica na fase lipídica, a interação específica da TFP com proteínas da bicamada e a formação de micelas mistas.

No entanto, já que o efeito térmico da hemólise induzida pela TFP é quatro vezes maior que o induzido pela DBC e considerando que a concentração de DBC utilizada para produzir a hemólise total foi muito maior que a de TFP (razões molares efetivas DBC/lipídio 1,4:1 e TFP/lipídio é 0,2:1), e que quanto maior a partição na membrana mais exotérmico é o processo, podemos inferir que o efeito térmico da partição da TFP na membrana parece não ser o principal contribuinte para o efeito térmico obtido. De modo que provavelmente, para a TFP, os eventos que mais contribuem para a lise da membrana eritrocitária são a interação específica da TFP com proteínas da bicamada e principalmente, a formação de micelas mistas. Já na hemólise induzida pela DBC, o único evento exotérmico presente, e portanto, o grande responsável pela lise seria a intercalação dos monômeros na membrana.

Com base nos dados experimentais (Malheiros *et al.*, 1998b) concluímos que a hemólise induzida pela TFP e pela DBC são fenômenos predominantemente entálpicos pressupondo que a entropia é pequena, pois o aumento de entropia que acompanha a perda da camada de solvatação das moléculas de TFP e DBC que entram na bicamada é compensada pela diminuição da entropia devido ao aumento de hidratação que acompanha o

aumento da área superficial da micela mista, no caso da TFP, e da membrana eritrocitária desorganizada que ocorreria com a adição de ambas as drogas. Esta conclusão está de acordo com o trabalho de Seelig & Ganz (1991) que propoem que a interação de vários anfífilos com vesículas lipídicas é um processo entálpico com uma entropia próxima a zero.

O efeito térmico da hemólise induzida por TFP (Malheiros *et al.*, 1998b) está em desacordo com o descrito por Aki & Yamamoto (1990) que reportam que a hemólise induzida pela TFP é um processo endotérmico ($\Delta H = 19,6 \pm 1,9$ pJ/célula). Nota-se que estes autores confundem o conceito (calor produzido por mol de reagente ou produto formado) e a unidade (J/mol de droga) de entalpia. O resultado que eles apresentam em J/célula deve ser, portanto, referente ao efeito térmico (calor) da hemólise. No entanto, se considerarmos os valores absolutos, os resultados são semelhantes: $18,2 \pm 0,9$ pJ/célula em Malheiros *et al.*, (1998b) e $19,6 \pm 1,9$ pJ/célula em Aki & Yamamoto (1990).

3.5.1. Análise Crítica da Metodologia Microcalorimétrica

Há pouquíssimos trabalhos na literatura (Aki & Yamamoto, 1990 e 1991) que utilizam a microcalorimetria na investigação da hemólise induzida por xenobióticos. Estes trabalhos utilizam a técnica de titulação microcalorimétrica para investigar o efeito térmico induzido por diferentes xenobióticos. Uma grande vantagem da técnica titulométrica seria que a adição paulatina de pequenas quantidades de xenobióticos, teoricamente, permitiria, nas concentrações menores que C^{SAT} , identificar o efeito térmico da interação droga-membrana (calor de ligação) e posteriormente, nas concentrações maiores que C^{SAT} , identificar o efeito térmico da desorganização da membrana (Seelig, 1997). No entanto, a experiência adquirida durante a execução dos ensaios microcalorimétricos apresentados nos levou a preterir o procedimento de titulação em favor do protocolo proposto em Malheiros *et al.*, (1998b). Isto se deve ao fato de que, ao executarmos os experimentos controle (adição de droga em tampão) o efeito térmico da diluição era sempre muito maior do que o efeito térmico dos ensaios em presença de células. Isto significava, que a interação da droga com a membrana produzia um efeito térmico insignificante perto do efeito térmico da diluição da droga. Observamos ainda que os eritrócitos, mesmo sob agitação máxima, sedimentavam durante o longo tempo de incubação (no mínimo 6 horas) requerido pela técnica titulométrica. Devido a estas considerações, apresentamos um protocolo no qual a droga é adicionada em uma porção única, ou no caso da DBC como a adição de droga em concentração necessária para indução de lise total e imediata promovia um

signal que sobrepujava a escala de trabalho do calorímetro, em duas porções, favorecendo assim a determinação do sinal da interação com a membrana e reduzindo o tempo total de experimento (Malheiros *et al.*, 1998b).

Outra consideração importante consiste em como interpretar os resultados obtidos em experimentos calorimétricos. No trabalho de Aki & Yamamoto (1990) por exemplo, os dados referentes ao efeito hemolítico têm sido interpretados como variações de entalpia da hemoglobina liberada por célula vermelha (ΔH_{hemol}). Do nosso ponto de vista, o fenômeno hemolítico deveria ser interpretado como resultado da totalidade de eventos que se iniciam com a intercalação da droga na membrana envolvendo uma série de processos que culminam na desorganização da membrana e não simplesmente como a liberação da hemoglobina, o que, segundo os nossos resultados, nem contribui de maneira significativa para o efeito térmico total obtido.

3.6. Análise Morfológica dos Eritrócitos Tratados com Xenobióticos

Em primeiro lugar, é preciso considerar que para efetuarmos os estudos morfológicos dos eritrócitos comparativamente à extração de lipídios foi necessário trabalharmos com um hematócrito alto (10 %). Nesta situação o interessante não é obtermos um máximo de efeito hemolítico, mas uma hemólise moderada, caso contrário teríamos a ruptura total da membrana e não observaríamos as alterações morfológicas. Como se vê para o PZQ, embora apresentando efeito lítico pequeno, as alterações morfológicas foram bastante evidentes (Malheiros *et al.*, 1998d).

De acordo com a hipótese da bicamada acoplada (Sheetz & Singer, 1974), os anfífilos catiônicos são estomatocitogênicos, enquanto os aniônicos são equinocitogênicos. Estas alterações morfológicas devem-se a intercalação preferencial dos anfífilos na monocamada externa ou interna da membrana eritrocitária. Vários estudos vêm tentando correlacionar outros mecanismos mais complexos às alterações morfológicas induzidas por xenobióticos, por exemplo, uma inibição de atividades reguladas pela calmodulina (Bereza *et al.*, 1982; Nelson *et al.*, 1983) e a indução de redistribuição lipídica (Schreier *et al.*, 1992). No entanto, estudos mais recentes vêm demonstrando que estes outros mecanismos poderiam somente explicar parcialmente as alterações morfológicas. Assim a perda de assimetria causada pela intercalação dos anfífilos nas diferentes monocamadas da membrana eritrocitária continua a ser a explicação mais aceita para justificar as alterações morfológicas induzidas por xenobióticos (Reinhart *et al.*, 1986; Isomaa & Engblom, 1988; Chen & Huestis, 1997).

Nossos resultados mostraram que os xenobióticos catiônicos, TFP e DBC, induziram estomatocitose, isto é, promoveram a invaginação da membrana em baixas concentrações, enquanto em concentrações mais altas esta alteração evoluiu para esferocitose terminando em ruptura e hemólise (Malheiros *et al.*, 1998d), o que é concordante com dados já descritos na literatura (Deuticke, 1968; Fujii *et al.*, 1979; Hägerstrand & Isomaa, 1992). É interessante notar que segundo os nossos estudos da contribuição de cargas na interação de xenobióticos com membranas (Malheiros *et al.*, 1998a,c), tanto a TFP como a DBC, em pH fisiológico, apresentam-se parcialmente protonadas. Sendo assim, a análise morfológica parece refletir a interação da forma majoritária, a protonada, o que estaria de acordo com a teoria de Sheetz & Singer (1974).

Nas concentrações mais altas de TFP pôde-se observar uma tendência das células esferocíticas em fundir-se, o que, neste caso também corrobora a teoria de Sheetz & Singer (1974), pois o fenômeno de fusão tem sido descrito como uma consequência da perda de assimetria da membrana (Bever *et al.*, 1996).

Quanto ao PZQ, que é uma molécula não carregada, fica descartada a hipótese de uma interação eletrostática preferencial com quaisquer das monocamadas da biomembrana. No entanto, nossos resultados revelam que este xenobiótico induz estomatocitose, ao passo que em concentrações maiores (6 mM, dados não mostrados) induz equinocitose. Isto poderia indicar uma localização preferencial na monocamada interna da membrana enquanto presente em baixas concentrações, e uma ampla distribuição em ambos os folhetos quando a concentração aumenta, conforme previamente descrito para o comportamento do álcool benzílico em eritrócitos (Bassé *et al.*, 1992). Estes resultados também podem ser comparados com os obtidos por Hägerstrand & Isomaa (1989), que descreveram a indução de invaginação ou crenação da membrana eritrocitária por compostos neutros, dependendo da condição de tratamento. Este fato revela uma importante questão: as interações eletrostáticas não são as únicas forças diretrizes na indução de alterações morfológicas promovida pela interação de substâncias químicas à membranas biológicas.

Embora o tipo de alteração celular induzido pelas três drogas tenha sido o mesmo, estomatocitose, a intensidade de indução do efeito variou consideravelmente entre cada xenobiótico. Se observarmos os índices morfológicos e as concentrações de droga necessárias para indução das alterações celulares, fica evidente, a maior eficiência de interação da TFP com a membrana eritrocitária do que as demais drogas, DBC e PZQ

(Malheiros *et al.*, 1998d), o que está de acordo com os resultados de *P* e hemólise previamente descritos (Malheiros *et al.*, 1998a,b,c).

3.7. Perfil de Eluição de Fosfolipídios e Colesterol

Já que as faixas de concentração estudadas para cada droga eram diferentes, comparamos a eluição preferencial de fosfolipídio e colesterol quando a hemólise induzida pela TFP e DBC varia de 5 para 50% (ver Figura 6, Anexo II). Esta análise não pôde ser feita com o PZQ pois mesmo utilizando as mais altas concentrações permitidas pela solubilidade o PZQ induziu uma hemólise muito menor (12 %) que a induzida pelos demais xenobióticos estudados (Malheiros *et al.* (1998d).

A liberação de colesterol da membrana eritrocitária para o sobrenadante que se seguia a interação dos xenobióticos foi mais evidente para a TFP do que para a DBC, sugerindo que a TFP interage mais diretamente com o colesterol, ou ainda, que induz um desarranjo tal na organização da membrana, que favorece a saída do colesterol. Se considerarmos que nas condições experimentais a TFP encontrava-se em concentração acima da CMC, podemos supor que o ambiente hidrofóbico das micelas poderia atrair o colesterol e facilitar sua eluição da membrana eritrocitária. Já a ação da DBC na membrana favorece a saída de fosfolipídios em maior proporção do que a saída de colesterol. Isto pode ser explicado pela inabilidade da DBC em formar micelas nas concentrações experimentais, o que desfavoreceria o deslocamento de uma molécula bastante volumosa e hidrofóbica, como o colesterol, da membrana eritrocitária para o ambiente aquoso. Na análise comparativa dos dados apresentados na Figura 6 (Anexo II) observa-se que o aumento da hemólise não está proporcionalmente relacionado a liberação de colesterol e fosfolipídios da bicamada, conforme descrito em Malheiros *et al.* (1998d).

Devido ao pequeno desarranjo da estrutura de bicamada (baixa hemólise e pequena eluição de lipídios) induzido pelo PZQ (Malheiros *et al.*, 1998d) não podemos discriminar se o mesmo promove uma saída preferencial de fosfolipídios ou colesterol. Parece, no entanto, evidente a baixa eficiência da interação do PZQ com a membrana do eritrócito (baixos valores de *P*, baixa atividade hemolítica, menor eluição de lipídios e menor índice morfológico) (Malheiros *et al.*, 1998c,d) o que está de acordo com o trabalho de Fohberg (1989) que descreve a ausência de toxicidade sistêmica do PZQ

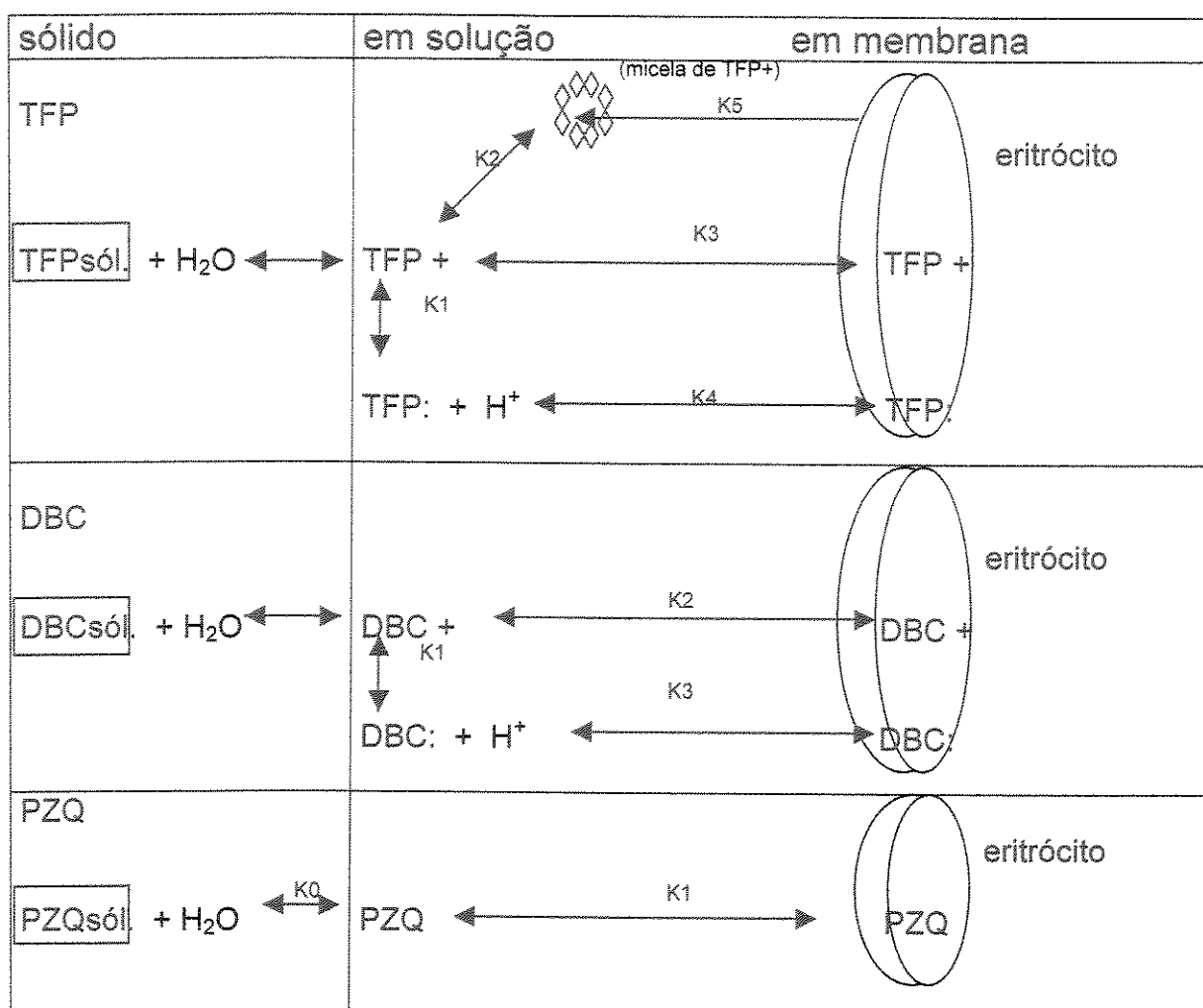
3.8. Complexidade da Interação dos Xenobióticos com Biomembranas

De acordo com a discussão apresentada é possível considerar que a interação de xenobióticos com a membrana biológica dá-se em vários níveis de complexidade dependendo das características físico-químicas (solubilidade, hidrofobicidade, grau de ionização, capacidade de agregação) dos compostos em questão.

Podemos considerar que dos três compostos aqui estudados a TFP apresenta a maior complexidade de interações químicas pois a partir da solubilização da mesma no ambiente aquoso estabelecem-se várias interações químicas que irão interferir com a capacidade da TFP interagir com o ambiente de membrana. Podemos destacar: - além do equilíbrio entre as formas neutras e ionizadas, representado no Esquema II pela constante de ionização, K_1 , - a micelização da forma ionizada, representada no Esquema II pela constante K_2 , - a partição diferencial das formas neutra e protonada entre o ambiente aquoso e o membranar, representadas no Esquema II pelas constantes K_3 e K_4 e ainda a interação de lipídios da membrana com a micelas de TFP, resultando na formação de micelas mistas, representado no Esquema II pela constante de ionização, K_5 .

Em relação a DBC, uma vez solubilizada, podemos considerar que ocorre o equilíbrio entre as formas neutra e protonada, representado no Esquema II pela constante de ionização, K_1 , além da partição diferencial das formas neutra e protonada entre o ambiente aquoso e o membranar, representadas no Esquema II pelas constantes K_2 e K_3 .

Enquanto o PZQ apresenta o menor grau de complexidade de interações químicas regendo sua interação com o ambiente de membrana, podemos considerar que uma vez solubilizado no ambiente aquoso, o único equilíbrio a ser estabelecido seria a sua partição na membrana, representado no Esquema II pela constante K_1 . É preciso levar em conta que devido a grande hidrofobicidade da molécula de praziquantel sua solubilização regida pelo equilíbrio K_0 (Esquema II) é um processo bastante lento, o que acaba por limitar sua entrada na membrana (Malheiros *et al.*, 1998c,d).



Esquema II: Interação da TFP, DBC e PZQ com a membrana do eritrócito.

4. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nos levaram às seguintes conclusões:

- a TFP apresenta maior afinidade por membranas do que a DBC e o PZQ, isto é, possui um maior coeficiente de partição entre membranas/água e também uma maior eficiência hemolítica
- os valores absolutos de coeficiente de partição variam significativamente com o sistema apolar utilizado, embora a ordem de afinidade pela membrana ($P^{TFP} > P^{DBC} > P^{PZQ}$) seja mantida independente da fase apolar estudada
- a TFP apresenta uma interação específica com a porção proteica das membranas o que não foi observado para os demais compostos
- todos os xenobióticos estudados (TFP, DBC e PZQ) promovem hemólise de modo bifásico
- a proteção induzida pelos xenobióticos em condições hiposmóticas está diretamente relacionada à hidrofobicidade dos compostos (valores de P) e é produzida pela inserção das formas monoméricas na membrana em concentrações inferiores às de saturação da membrana
- a lise induzida em condições isosmóticas é proporcional à hidrofobicidade dos xenobióticos e no caso da TFP ocorre quando a mesma encontra-se na forma agregada enquanto que a lise induzida pela DBC e pelo PZQ dá-se com os compostos na forma monomérica
- o tratamento clássico para análise da solubilização de vesículas lipídicas por surfactantes (Lichtenberg, 1985) não mostrou-se adequado para o estudo da solubilização (lise) da membrana eritrocitária induzida pelos xenobióticos estudados
- a razão efetiva droga/lipídio para a hemólise isosmótica induzida pela TFP calculada pelos valores de P^{GHOST} ocorre muito antes da saturação da membrana ($Re^{SAT} = 0,06:1$ e $Re^{SOL} = 0,09:1$), enquanto que as razões efetivas droga/lipídio para DBC e PZQ refletem uma real saturação da membrana (para DBC $Re^{SAT} = 0,34:1$ e $Re^{SOL} = 0,69:1$ e para o PZQ, $Re^{SAT} = 0,25:1$ e $Re^{SOL} = 1,89:1$)
- em pH fisiológico e em presença de membranas, estão presentes ambas as formas, neutra e carregada, da TFP e da DBC, com prevalência da forma

carregada, sendo que a forma neutra da TFP é três vezes mais freqüente que a forma neutra da DBC

- a maior ligação da TFP (maior K_b e P) em relação à DBC deve-se as interações específicas com as proteínas da membrana bem como a maior contribuição da forma neutra em pH fisiológico

- os valores de $P_{\text{médio}}$, calculados teoricamente, considerando a variação do pK em presença de membranas mostraram-se concordantes com os valores experimentais (P^{LIP})

- a lise induzida pela TFP resulta de uma ação sinérgica da intercalação das formas neutra e carregada com o ambiente lipídico, da interação específica com as proteínas de membrana e da agregação micelar desta droga no ambiente aquoso, a qual gera a saída de fosfolipídios e de grandes quantidades de colesterol da membrana eritrocitária que migram para o ambiente hidrofóbico da micela

- já a lise induzida pela DBC e pelo PZQ está relacionada à saturação da membrana pela intercalação da forma neutra, e também da forma carregada, no caso da DBC

- o grande volume que o PZQ ocupa e sua baixa solubilidade limitam sua entrada na membrana resultando em um lento equilíbrio de partição (90 minutos) e na necessidade de grandes concentrações de droga para induzir lise

- o efeito térmico do conjunto de reações químicas que ocorrem pela interação da TFP com a membrana eritrocitária e que resulta na lise da mesma é exotérmico e quatro vezes maior do que o calor liberado pela interação da DBC

- a hemólise induzida pela TFP e pela DBC são processos predominantemente entálpicos com uma baixa contribuição entrópica onde os eventos que mais contribuem são: a interação com proteínas da membrana e a formação de micelas mistas, no caso da TFP, e, a intercalação do monômero na membrana, no caso da DBC

- todos os xenobióticos estudados induziram estomatocitose relacionada à perda de assimetria lipídica causada pela intercalação preferencial do composto na monocamada interna da membrana eritrocitária

- as alterações morfológicas induzidas pelos xenobióticos estudados não são unicamente um reflexo das interações eletrostáticas entre estes compostos e

a membrana eritrocitária já que o PZQ é uma molécula de caráter neutro e induz estomatocitose assim como os demais

- embora o tipo de alteração celular induzido pelas três drogas tenha sido o mesmo, estomatocitose, a intensidade do efeito variou consideravelmente entre cada xenobiótico como uma resposta particular às suas características físico-químicas diferenciadas, de modo concordante com os demais resultados (hidrofobicidade e hemólise)
- a interação da TFP com a membrana eritrocitária resulta numa maior eluição de colesterol do que de fosfolipídios, que relaciona-se à capacidade de agregação da TFP enquanto que a DBC promove preferencialmente a eluição de fosfolipídios
- a hemólise induzida pelos xenobióticos não está proporcionalmente relacionada à eluição de fosfolipídios e colesterol

Estes resultados sugerem que distintos mecanismos celulares de interação com a membrana são responsáveis pelos mecanismos de citotoxicidade de cada droga e revelam a multiplicidade de fatores (hidrofobicidade, solubilidade, grau de ionização, propriedades de agregação, afinidade específica por determinado componente da membrana e efeitos estéricos) que devem ser considerados na interpretação do fenômeno hemolítico ou, de uma maneira mais genérica, da interação de anfífilos com membranas biológicas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agin, D., Hersh, L. & Holtzman D. (1965) The action of anesthetics on excitable membranes: a quantum-chemical analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **53**: 952-958.
- Aki, H. & Yamamoto, M. (1990) Biothermodynamic characterization of erythrocyte hemolysis induced by phenothiazine and anti-inflammatory drugs. *Biochem. Pharmacol.* **39**: 396-398.
- Aki, H. & Yamamoto, M. (1991) Drug binding to human erythrocytes in the process of ionic drug-induced hemolysis. *Biochem. Pharmacol.* **41**: 133-138.
- Andrews, P., Thomas, H., Pohlke, R. & Seubert, J. (1983) Praziquantel. *Med. Res. Rev.* **3**: 147-200.
- Andrews, P. (1985) Praziquantel: mechanisms of anti-schistosomal activity. *Pharmacol. Ther.* **29**: 129-156.
- Attwood, D. & Florence, A.T. (1983) Surface activity and colloidal properties of drugs and naturally occurring substances. In: *Surfactant Systems, their chemistry, pharmacy and biology*, 2nd. ed, Chapman and Hall, New York London, 124-185.
- Baldessarini, R.J. (1996) Fármacos e o tratamento de distúrbios psiquiátricos. In: *As bases farmacológicas da terapêutica*, 9th ed, Mc Graw-Hill Interamericana Editores S.A., Santiago de Chile, 290-3131.
- Barghouthi, S. & Eftink, R. (1993) Fluorescence studies of a local anesthetic-phospholipid interaction. *Biophys. Chem.* **46**: 13-19.
- Barghouthi, S., Puri, R.K. & Eftink, R. (1993) Local anesthetic-phospholipid interactions. Effects of ionic strength, temperature, and phospholipid mixtures on the binding of dibucaine to phospholipids. *Biophys. Chem.* **46**: 1-11.
- Bassé, F., Sainte-Marie, J., Maurin, L. & Bienvenüe, A. (1992) Effect of benzyl alcohol on phospholipid transverse mobility in human erythrocyte membrane. *Eur. J. Biochem.* **205**: 155-162.
- Becker, B., Mehlhorn, H., Andrews, P., Thomas, H. & Ekert, J. (1980) Light and electron microscopic studies on the effect of praziquantel on *Schistosoma mansoni*, *Dicrocoelium dendriticum* and *Fasciola hepatica* (trematoda) in vitro. *Z. Parasitenk.* **63**: 113-128.
- Benet, L.Z., Kroetz, D.L. & Sheiner, L.B. (1996) Farmacocinética. A dinâmica da absorção, distribuição e eliminação dos fármacos. In: *As bases farmacológicas da*

- terapêutica, 9th ed, Mc Graw-Hill Interamericana Editores S.A., Santiago de Chile, 3-21.
- Berèza, U.L., Brewer, G.J. & Mizukami, I. (1983) Association of calmodulin inhibition, erythrocyte membrane stabilization and pharmacological effects of drugs. *Biochim. Biophys. Acta*. **692**: 305-314.
- Beyers, E.M., Comfurius, P. & Zwaal, R.F.A. (1996) Regulatory mechanisms in maintenance and modulation of transmembrane lipid asymmetry: pathophysiological implications. *Lupus* **5**: 480-487.
- Bianconi, M.L., Amaral, A.T. & Schreier, S. (1988) Use of membrane spin label spectra to monitor rates of partitioning compounds: hydrolysis of a local anesthetic analog. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **152**: 344-350.
- Blair, K.J., Bennet, J.L. & Pax, R.A. (1992) Praziquantel: physiological evidence for its site(s) of action in magnesium paralysed *Schistosoma mansoni*. *Parasitology* **104**: 59-66.
- Boulanger, Y., Schreier, S., Leitch, L.C. & Smith, I.C.P. (1980). Multiple binding sites for local anesthetics in membranes: characterization of the sites and their equilibria by deuterium NMR of specifically deuterated procaine and tetracaine. *Can. J. Biochem.* **58**: 986-995.
- Borissevitch, I.E., Borges, C.P.F., Yushmanov, V.E. & Tabak, M. (1995) Localization of dipyrindamole molecules in ionic micelles: effect of micelle and drug charges. *Biochim. Biophys. Acta* **1238**: 57-62.
- Bricker, C.S., Depenbusch, J.W., Bennet, J.L. & Thompson, D. (1983) The relationship between tegumental disruption and muscle contraction in *Schistosoma mansoni* exposed to various compounds. *Z. Parasitenk.* **69**: 61-71.
- Brindley, P.J. & Sher, A. (1987) The chemotherapeutic effect of praziquantel against *Schistosoma mansoni* is dependent on host antibody response. *J. Immunol.* **139**: 215-220.
- Bull, B.S., Breton-Gorius J. & Beutler E. (1990) Morphology of the erythron. In *Hematology*, 4th ed, Mc Graw-Hill, New York, 297-316.
- Chasis, J.A. & Shohet, S.B. (1987) Red cell biochemical anatomy and membrane properties. *Ann. Rev. Physiol.* **49**: 237-248.
- Chen, J.Y. & Huestis, W.H. (1997) Role of membrane lipid distribution in chlorpromazine-induced shape change of human erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta* **1323**: 299-309.

- Chi, L.M. & Wu, W. (1991) Mechanism of hemolysis of red blood cell mediated by ethanol. *Biochim. Biophys. Acta* **1062**: 46-50.
- Clari, G. & Moret, V. (1989) Comparative characterization of membrane-associated and cytosolic Tyr-protein kinase in human erythrocytes. *Eur. J. Biochem.* **179**: 581-588.
- Cohen, G. & Hochstein, P. (1964) Generation of hydrogen peroxide in erythrocytes by hemolytic agents. *Biochemistry* **35**: 895-900.
- Coles, G.C. (1979) The effect of praziquantel on *Schistosoma mansoni*. *J. Helminthol.* **53**: 31-33
- Covino, B.G. & Vassalo, H.G. (1985) Anestésicos Locais: mecanismos de ação e uso clínico, Colina, Rio de Janeiro.
- Cullis, P.R. & Verkleij, A.J. (1979) Modulation of membrane structure by Ca^{++} and dibucaine as detected by ^{31}P NMR. *Biochim. Biophys. Acta* **552**: 546-551.
- Darnell, J., Lodish, H. & Baltimore, D. (1990) In: Molecular Cell Biology, Sci. Am. Books, New York, 85-109.
- de Paula, E. & Schreier S. (1995) Use a novel method for determination of partition coefficients to compare the effect of local anesthetics on membrane structure. *Biochim. Biophys. Acta* **1240**:25-33.
- de Paula, E. & Schreier, S. (1996). Molecular and physicochemical aspects of local anesthetic-membrane interaction. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **29**: 877-894.
- Desormeaux, A. & Bergeron, M.G. (1998) Liposomes as drug delivery system: a strategic approach for the treatment of HIV infection. *J. Drug Target* **6**: 1-15.
- Deuticke, B. (1968) Transformation and restoration of biconcave shape of human erythrocytes induced by amphiphilic agents and shapes of ionic environment. *Biochim. Biophys. Acta* **163**: 494-500.
- de Young, L.R. & Dill, K.A. (1988) Solute partitioning into lipid bilayer membranes. *Biochemistry* **27**: 5281-5289.
- Devaux, P.F. (1991) Static and dynamic lipid asymmetry in cell membranes. *Biochemistry* **30**: 1163-1173.
- Doenhoff, M.J., Sabah, A.A., Fletcher, C., Webbe, G. & Bain, J. (1987) Evidence for an immune-dependent action of praziquantel on *Schistosoma mansoni* in mice. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **81**: 947-951.

- Eftink, M.R., Puri, R.K. & Ghahramani, M.D. (1985) Local anesthetic-phospholipid interactions. The pH dependence of the binding of dibucaine to dimyristoylphosphatidylcholine vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* **813**: 137-146.
- Elgsaeter, A., & Mikkelsen A. (1991) Shapes and changes in vitro in normal red blood cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1071**: 273-290.
- Eriksson, L.E.G. & Westman, J. (1980) Interaction of charged amphiphilic drugs with phosphatidylcholine vesicles. A spin label study of surface potential effects. *Biophys. Chem.* **13**: 253-264.
- Fetterer, R.H., Pax, R.A. & Bennet, J.L. (1980) Praziquantel, potassium and 2,4-dinitrophenol: analysis of their action on the musculature of *Schistosoma mansoni*. *Eur. J. Pharmacol.* **64**: 31-38.
- Flisser, A., Delgado V.S., McLaren D.J. (1989) *Schistosoma mansoni*: enhanced efficacy of praziquantel treatment in immune mice. *Parasite Immunol.* **11**: 319-328.
- Forrest, I. & Green, D.E. (1972) Phenothiazines: metabolism and analytical detection. *J. Foren. Sci.* **17**: 592-617.
- Frohberg, H. (1989) The toxicological profile of praziquantel in comparison to other antihelminthic drugs. *Acta Leiden* **57**: 201-215.
- Froimowitz, M. & Cody, V. (1993) Biologically active conformers of phenothiazines and tioxanthenes. Further evidence of a ligand model of dopamine D2 receptor antagonists. *J. Med. Chem.* **36**: 2219-2227.
- Fujii, T., Sato, T., Tamura, A., Wakatsuki, M. & KANAHO, Y. (1979) Shape changes of human erythrocytes induced by various amphipathic drugs acting on the membrane of the intact cells. *Biochem. Pharmacol.* **28**: 613-620.
- Galembeck, E., Alonso, A. & Meirelles, N.C. (1998) Effects of polyoxyethylene chain length on erythrocyte hemolysis induced by poly[oxyethylene (n) nonylphenol] non-ionic surfactants. *Chem. Biol. Interact.* **113**: 91-103.
- Gallagher, P.G. & Forget, B.G. (1993) Spectrin genes in health and disease. *Semin. Hematol.* **30**: 4-20.
- Giotta, G.J., Chan, D.S. & Wang, H.H. (1974) Binding of spin-labeled local anesthetics to phosphatidylcholine and phosphatidylserine liposomes. *Arch. Biochem. Biophys.* **163**: 453-458.
- Gobas, F.A.P.C., Lahittete, J.M., Garofalo, G., Shiu, W.Y. & Mackay, D. (1988) A novel method for measuring membrane-water partition coefficients of hydrophobic organic chemicals: comparison with 1-octanol-water partitioning. *J. Pharmac. Sci.* **77**: 265-272.

- Goldberg, B. & Stern, A. (1976) Superoxide anion as a mediator of drug-induced oxidative hemolysis. *J. Biol. Chem.* **251**: 6468-6470.
- Gratzer, W.B. (1981) The red cell membrane and its cytoskeleton. *Biochem. J.* **198**: 1-8.
- Gudi, S.R.P., Kumar, A., Bhakuni, V., Ghodale, S.M. & Gupta, C.M. (1990) Membrane skeleton-bilayer interaction is not the major determinant of membrane phospholipid asymmetry in human erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta* **1023**: 63-72.
- Gupta, S.P. (1991) Quantitative structure-activity relationship studies on local anesthetics. *Chem. Rev.* **91**: 1109-1119.
- Haest, C.W.M. (1982) Interactions between membrane skeleton proteins and the intrinsic domain of the erythrocyte membrane. *Biochim. Biophys. Acta* **694**: 331-352.
- Hägerstrand, H. & Isomaa, B. (1989) Vesiculation induced by amphiphiles in erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta* **982**: 179-186.
- Hägerstrand, H. & Isomaa, B. (1991) Amphiphile induced antihaemolysis is not causally related to shape changes and vesiculation. *Chem. Biol. Interact.* **79**: 335-347.
- Harnett, W. & Kusel, J.R. (1986) Increased exposure of parasite antigens at the surface of adult male *Schistosoma mansoni* exposed to praziquantel in vitro. *Parasitology* **93**: 401-405.
- Helenius, A. & Simons, K. (1975) Solubilization of membranes by detergents. *Biochim. Biophys. Acta* **415**: 29-80.
- Hiemenz, P.C. (1986) In: Principles of colloid and surface chemistry. Lagowsky, J.J. ed., cap.8.1, Marcel Dekker, New York and Basel.
- Hird, H.J.; Mclean, E.J.T. & Munro, H.N. (1964) Incorporation of amino acids by the protein of the post microsomal fraction of rat liver. *Biochim. Biophys. Acta* **87**: 219-231.
- Hornby, A.P. & Cullis, P.R. (1981) Influence of local and neutral anaesthetics on the polymorphic phase preferences of egg yolk phosphatidylethanolamine. *Biochim. Biophys. Acta* **647**: 285-292.
- Huang, C. (1969) Studies on phosphatidylcholine vesicles. Formation and physical characteristics. *Biochemistry* **8**: 344-352.

- Huang C. & Charlton, J.P. (1972) Interactions of phosphatidylcholine vesicles with 2-p-toluidinylnaphthalene-6-sulfonate. *Biochemistry* **11**: 735-740.
- Isomaa, B. & Engblom, A.C. (1988) Is calmodulin inhibition involved in shape transformation induced by amphiphiles in erythrocytes? *Biochim. Biophys. Acta* **940**: 121-126.
- Isomaa, B., Hägerstrand, H., Paatero, G. & Engblom, A.C. (1986) Permeability alterations and atihemolysis induced by amphiphiles in human erythrocyte. *Biochim. Biophys. Acta* **860**: 510-524.
- Kahana, E., Streichman, S. & Silver, B.L. (1991) The role of electrostatic forces in the interaction between the membrane and cytoskeleton of human erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta* **1066**: 1-5.
- Kanaho, Y., Sato, T. & Fujii, T. (1981) The affinity of various phenothiazine drugs for membranes of intact human erythrocytes and their membrane-transforming activity. *Mol. Pharmacol.* **20**: 704-708.
- Karp, G. (1984) In: Cell Biology, Von Hoffman Press, 2nd. ed., New York, 252-308.
- Katsu, T., Ninomyia, C., Kuroko, M., Kobayashi, H., Hirota, T. & Fujita, Y. (1988) Action mechanism of amphipathic peptides gramicidin S and melittin on erythrocyte membrane. *Biochim. Biophys. Acta* **939**: 57-63.
- Koga, T., Moro, K. & Terao, J. (1998) Protective effect of a vitamin E analog, phosphatidylchromanol, against oxidative hemolysis of human erythrocytes. *Lipids* **33**: 589-595.
- Korten, K. & Miller, K.W. (1979) Erythrocyte ghost-buffer partition coefficients of phenobarbital, pentobarbital and thiopental support the pH-partition hypothesis. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **57**: 325-328.
- Kubinyi, H. (1979) Lipophilicity and drug activity. In: Progress in Drug Research, vol. 23, Birkhäuser Verlag, Basel.
- Kuroda, Y. & Fujiwara, Y. (1987) Locations and dynamical perturbations for lipids of cationic forms of procaine, tetracaine and dibucaine in small unilamellar phosphatidylcholine vesicles as studied by nuclear Overhauser effects in ^1H nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta* **903**: 395-410.
- Lang, R.D., Weinstein, R.S., Wynne, J. & Lucy, J.A. (1984) Proteolysis of ankyrin and of band 3 protein in chemically induced cell fusion. Ca^{2+} is not mandatory for fusion. *Biochem. J.* **218**: 295-305.
- Lasic, D.D. (1998) Novel applications of liposomes. *Trends Biotechnol.* **16**: 307-321.

- Laurialt, V.V.M. & O'brien, P.J. (1991) Disulfiram may mediate erythrocyte hemolysis induced by diethyldithiocarbamate and 1,4-naphthoquinone-2-sulfonate. *Arch. Biochem. Biophys.* **284**: 207-214.
- Lee, A.G. (1976a) Model for action of local anaesthetics. *Nature* **262**: 545-548.
- Lee, A.G. (1976b) Interactions between anaesthetics and lipid mixtures amines. *Biochim. Biophys. Acta* **448**: 34-44.
- Lee, A.G., East, J.M., Jones, O.T., McWhirter, J., Rooney, E.K. & Simmonds, A.C. (1983) Binding of dansyl propanolol to the (Ca^{2+} - Mg^{2+})-ATPase. *Biochim. Biophys. Acta.* **732**: 441-450.
- Lee, A.G. & Schreier, S. (1993) Binding of charged molecules to lipid bilayers. In *Liposome Technology. Vol II: Entrapment of drugs and other materials.* G. Gregoriades ed., C.R.C. Press, Boca Raton, 1-15.
- Lee B., Mckenna, K. & Bramhall, J. (1985) Kinetic studies of human erythrocyte membrane resealing. *Biochim. Biophys. Acta* **15**: 128-134.
- Lehninger, A.L., Nelson, D.L. & Cox, M.M. (1993) Biological membranes and transport. In: *Principles of biochemistry*, 2nd ed, Worth Publishers Inc., New York, 275.
- Lichtenberg, D. (1985) Characterization of the solubilization of lipid bilayers by surfactants. *Biochim. Biophys. Acta* **821**: 470-478.
- Lieber, M.R., Lange, Y., Weinstein, R.S. & Stick, T.L. (1984) Interaction of chlorpromazine with the human erythrocyte membrane. *J. Biol. Chem.* **259**: 9225-9234.
- Lima, S.F., Vieira, L.Q., Harder, A. & Kusel, J.R. (1994) Effects of culture and praziquantel on membrane fluidity parameters of adult *Schistosoma mansoni*. *Parasitology* **109**: 57-64.
- Lissi, E., Bianconi, M.L., Amaral, A.T., de Paula, E., Blanch, L.E.B. & Schreier, S. (1990) Methods for the determination of partition coefficients based on the effects of solutes upon membrane structure. *Biochim. Biophys. Acta* **1021**: 46-50.
- Louro, S.R.W., Nascimento, O. R. & Tabak, M. (1994) Charge- and pH-dependent binding sites for dibucaine in ionic micelles: a fluorescent study. *Biochim. Biophys. Acta* **1190**: 319-328.
- Lux, S.E. (1988) Hereditary in the membrane or metabolism of the red cell. In: *Cecil. Textbook of Medicine*, 18th ed, W.B. Saunders Company. Philadelphia, 909-917.

- Machleidt, H., Roth S. & Seeman, P. (1972) The hydrophobic expansion of erythrocyte membranes by the phenol anesthetics. *Biochim. Biophys. Acta* **255**: 178-189.
- Macnab, G. & Harington, J.S. (1967) Haemolytic activity of asbestos and other mineral dusts. *Nature* **214**: 522-523.
- McGlashan M.L. (1979) Practical Calorimetry. In: Chemical Thermodynamics, Academic Press, London, 48-69.
- Maksymiw, R., Sui, S., Gaub, H. & Sackmann, E. (1987) Electrostatic coupling of spectrin dimers to phosphatidylserine containing lipid lamellae. *Biochemistry* **26**: 2983-2990.
- Malheiros, S.V.P., de Paula, E. & Meirelles, N.C. (1998a) Contribution of trifluoperazine/lipid ratio and drug ionization to hemolysis. *Biochim. Biophys. Acta* **1373**: 332-340,
- Malheiros, S.V.P., Meirelles, N.C. & Volpe, P.L.O. (1998b). A critical analysis of microcalorimetric methodology for drug induced hemolysis. *Thermochim. Acta* (in press).
- Malheiros, S.V.P., de Paula, E. & Meirelles, N.C. (1998c) Pathways involved in trifluoperazine, dibucaine and praziquantel induced hemolysis. *Biochim. Biophys. Acta* (submetido em novembro de 1998).
- Malheiros, S.V.P., Brito, M.A., Brites, D. & Meirelles, N.C. (1998d) Effects of trifluoperazine, dibucaine and praziquantel on erythrocyte cytotoxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* (submetido em novembro de 1998).
- Marroum, P. J. & Curry, S.H. (1993) Red blood cell partitioning, protein binding and lipophilicity of six phenothiazines. *J. Pharmac. Pharmacol.* **45**: 39-42.
- Mayer, L.D. , Bally, M.B., Hope, M.J. & Callis, J. (1985) Uptake of dibucaine into large unilamellar vesicles in response to a membrane potential. *J. Biol. Chem.* **260**: 802-808.
- Mehlhorn, H. Becker, B., Andrews, P., Thomas, H. & Prenkel, J.K. (1981) In vivo and in vitro experiments on the effect of praziquantel on *Schistosoma mansoni*: a light and electron microscopic study. *Arzneimittel Forschung* **31**: 544-554.
- Meltzer, H.Y. & Nash, J.F. (1991) VII. Effects of antipsychotic drugs on serotonin receptors. *Pharmacol. Rev.* **43**: 587-604.
- Mertz, C.J. & Lin, C.T. (1991) Solubilization sites and acid-base forms of dibucaine-hydrochloride in neutral and charged micellar solutions. *Photochem. Photobiol.* **53**: 307-316.

- Miyazaki, J., Hideg, K. & Marsh, D. (1992) Interfacial ionization and partition of membrane-bound local anaesthetics. *Biochim. Biophys. Acta* **1103**: 62-68.
- Middelkoop, E., Lubin, B.H., Bevers, E.M. Op den Kemp, J.A.F., Comfurius, P., Chiu, D.T.Y., Zwall, R.F.A., Deenen, L.L.M. & Roelofsen, B. (1988) Studies on sickled erythrocytes provide evidence that the asymmetric distribution of phosphatidylserine in the red cell membrane is maintained by both ATP-dependent translocation and interaction with membrane skeletal proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **937**: 281-288.
- Minetti, M. & Di Stasi, A.M.M. (1987) Involvement of erythrocyte skeletal proteins in the modulation of membrane fluidity by phenothiazines. *Biochemistry* **26**: 8133-8137.
- Modha, J., Lambertucci, J.R., Doenhoff, M.J. & McLaren, D.J. (1990) Immune dependence of schistosomicidal chemotherapy: an ultrastructural study of *Schistosoma mansoni* adult worms exposed to praziquantel and immune serum in vivo. *Parasitol. Immunol.* **12**: 321-334.
- Moffat, A.C. (1986) Analytical and Toxicological Data. In Clarke's Isolation and Identification of Drugs. The Pharmaceutical Press, London. 1044.
- Nelson, M.J., Daleke, D.L. & Huestis, W.H. (1983) Control of erythrocyte shape by Calmodulin. *J. Cell Biol.* **96**: 730-735.
- Ohki, S. (1984) Adsorption of local anesthetics on phospholipid membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **777**: 56-66.
- Ogiso, T., Iwaki, M., Kimori, M. & Tsukawaki, C. (1986) Erythrocyte membrane penetration of basic drugs and relationship between drug penetration and hemolysis. *Chem. Pharmac. Bull.* **34**: 4301-4307.
- Osório e Castro, V.R., Ashwood, E.R., Wood, S.G., Vernon, L.P. (1990). Hemolysis of erythrocytes and fluorescence polarization changes elicited by peptide toxins, aliphatic alcohols, related glycols and benzylidene derivatives. *Biochim. Biophys. Acta* **1029**: 252-258.
- Partearroyo, M. A., Urbaneja, M.A. & Goñi, F.M. (1992) Effective detergent/lipid ratios in the solubilization of phosphatidylcholine vesicles by Triton X-100. *FEBS Lett.* **302**: 138-140.
- Pax, R.A., Bennett, J.L. & Fetterer, R.H. (1978) A benzodiazepine derivative and praziquantel: effects on musculature of *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma japonicum*. *Arch. Pharmac.* **304**: 309- 313.
- Pax, R., Bennet, J.L. & Fetterer, R. (1979) Effects of fluoxetine and imipramine on male *Schistosoma mansoni*. *Comp. Biochem. Physiol.* **64**: 123-127.

- Pax, R., Bricker, C.S., Thompson, D.P., Semeyn, D.R. & Bennet, J.L (1983) Neurophysiology of adult male *Schistosoma mansoni*. *Pharmacol. Therap.* **22**: 117-125.
- Platt, O.S.; Lux, S.E. & Falcone, J.F. (1993) A highly conserved region of human erythrocyte ankyrin contains the capacity to bind spectrin. *J. Biol. Chem.* **268**: 24421-24426.
- Prasad, R. (1996) Manual on membrane lipids, Springer-Verlag, Berlin.
- Privalov, P.L. & Gill, S.J. (1989) The hydrophobic effect: a reappraisal. *Pure Appl. Chem.* **61**: 1097-1104.
- Ramalingam, K. & Bello, J. (1992) Effect of permethylation on the haemolytic activity of melittin. *Biochem. J.* **284**: 663-665.
- Redman, C.A., Robertson, A, Fallon, P.G., Modha, J., Kusel, J.R., Doenhoff, M.J. & Martin, R.J. (1996) Praziquantel: an urgent and exciting challenge. *Parasitol. Today* **12**: 14-20.
- Reinhart, W.H., Lanping, A.S., Schuessler, G.B. & Chien, S. (1986) Membrane protein phosphorylation during stomatocyte-echinocyte transformation of human erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta* **862**:1-7.
- Requero, M.A., Goñi, F.M. & Alonso, A. (1993) The critical micellar concentrations of fatty acyl coenzyme A and fatty acyl carnitines. *J. Coll. Interf. Sci.* **161**: 343-346.
- Requero, M.A., Gonzales, M, Goni, F.M., Alonso, A. & Fidelio, G. (1995) Differential penetration of fatty acyl-coenzyme A and fatty acylcarnitines into phospholipid monolayers. *FEBS Letters* **357**: 75-78.
- Roth, S. & Seeman, P. (1972) The membrane concentrations of neutral and positive anesthetics (alcohols, chlorpromazine, morphine) fit the Meyer-Overton rule of anesthesia; negative narcotics do not. *Biochim. Biophys. Acta* **255**: 207-219.
- Ruggiero, A.C. & Meirelles, N.C. (1998) Effects of trifluoperazine on the conformation and dynamics of membrane proteins in human erythrocytes. *Molec. Gen. Metab.* **64**: 148-151.
- Rumjanek, F.D. (1987) Biochemistry and Physiology. In: the Biology of Schistosomes, from Genes to Latrines, Academic Press, 163 – 183.
- Sabah, A.A . (1986) *Schistosoma mansoni*: chemotherapy of infections of different ages. *Exp. Parasitol.* **61**: 294-303.

- Schepers, H., Brasseur, R., Goormaghtigh, E., Duquenoy, P. & Ruyschaert, J-M. (1988) Mode of insertion of praziquantel and derivatives into lipid membranes. *Biochem. Pharmacol.* **37**: 1615-1623.
- Scherier, S., Frezzatti, Jr.W.A., Araújo, P.S., Chaimovich, H. & Cuccovia, I.M. (1984) Effect of lipid membranes on the apparent pK of the local anesthetic tetracaine. Spin label and titration studies. *Biochim. Biophys. Acta* **769**: 231-237.
- Schreier, S., Amaral, A.T., Stachissini, A.S. & Bianconi, M.L. (1986) Electron spin resonance study of benzoic acid esters, analogs of local anesthetics. Interaction with membranes, aggregation and hydrolysis. *Bull. Magnetic Resonance* **8**: 166-171.
- Schrier, S.L. (1985) Red cell membrane biology. Introduction. *Clin. Haematol.* **14**: 1-12.
- Schrier, S.L., Zachowski, A., Hervé, P., Kader, J-C. & Devaux, P.F. (1992a) Transmembrane redistribution of phospholipids of the human red cell membrane during hypotonic hemolysis. *Biochim. Biophys. Acta* **1105**: 170-176.
- Schrier, S.L., Zachowski, A. & Devaux, P.F. (1992b) Mechanisms of amphipath-induced stomatocytosis in human erythrocytes. *Blood* **79**: 782-786.
- Seelig, A. (1987) Local anesthetic and pressure: a comparison of dibucaine binding to lipid monolayers and bilayers. *Biochim. Biophys. Acta* **899**: 169-204.
- Seelig, J. & Ganz, P. (1991) Nonclassical hydrophobic effect in membrane binding equilibria. *Biochemistry* **30**: 9354-9359.
- Seelig, J. (1997) Titration calorimetry of lipid-peptide interactions. *Biochim. Biophys. Acta* **1331**: 103-116.
- Seeman, P. (1966) A method for distinguishing specific from nonspecific hemolysis. *Biochem. Pharmacol.* **15**: 1775-1782.
- Seeman, P. & Weinstein, J. (1966) Erythrocyte membrane stabilization by tranquilizers and antihistamines. *Biochem. Pharmacol.* **15**: 1737-1752.
- Seeman, P. (1972) The membrane actions of anesthetics and tranquilizers. *Pharmacol. Rev.* **24**: 583-589.
- Seeman, P., Shaafi, R.I., Galey, W.R. & Solomon, A.K. (1970) The effect of anesthetics (chlorpromazine, ethanol) on erythrocyte permeability to water. *Biochim. Biophys. Acta* **211**: 365-368.

- Seigneuret, M., Zachowski, A., Herrmann, A. & Devaux, P.F. (1984) Asymmetric lipid fluidity in human erythrocyte membrane: new spin-label evidence. *Biochemistry* **23**: 4271-4275.
- Seigneuret, M. & Devaux, P.F. (1984) ATP dependent asymmetric distribution of spin labelled phospholipids in the erythrocyte membrane: Relation to shape changes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**: 3751-3755.
- Shaw, J.R. & Erasmus, D.A. (1983) *Schistosoma mansoni*: the effects of a subcurative dose of praziquantel on the structure of worms in vivo. *Z. Parasitenk.* **69**: 73-90.
- Sheetz, M.P. & Singer, S.J. (1974) Biological membranes as bilayer couples a molecular mechanism of drug-erythrocyte interaction. *Prod. Natl. Acad. Sci. USA* **71**: 4457-5561.
- Singer, M. A. (1977) Interaction of dibucaine and propranolol with phospholipid bilayer membranes-effect of alterations in fatty acyl composition. *Biochem. Pharmacol.* **26**: 51-57.
- Skou, J.C. (1954) Local anesthetics. V. The action of local anesthetics on monomolecular layers of stearic acid. *Acta Pharmacol. Toxicol.* **10**: 317-324.
- Storch, J. & Kleinfeld, A.M. (1985) The lipid structure of biological membranes. *Trends Biochem. Sci.* **10**: 418-421.
- Streichman, S.; Kahana, E. & Silver, B.L. (1991) EPR study of hydrophobic interaction of spectrin with fatty acids. *Biochim. Biophys. Acta* **1066**: 9-13.
- Strichartz, G.R. & Ritchie, J.M. (1987) The action of Local Anesthetics on ion channels of excitable tissues. In: *Local Anesthetics, Handbook of Experimental Pharmacology*, (Strichartz G.R. ed.), vol.81, cap. 2, Springer-Verlag, Berlin.
- Suda, T.; Shimizu, D.; Maeda, N. & Shiga, T. (1981) Decreased viscosity of human erythrocyte suspension induced by chlorpromazine and isoxsuprine. *Biochem. Pharmacol.* **30**: 2057-2064.
- Tanford, C. (1980) Origin of the hydrophobic effect. In: *The hydrophobic effect. Formation of micelles & biological membranes*. John Wiley & Sons, New York, 1-22.
- Takagi, M., Taki, Y., Sakane, T., Nadai, T., Sezaki, H, Oku, N. & Yamashita, S. (1998) A new interpretation of salicylic acid transport across the lipid bilayer: implications of pH-dependent but not carrier-mediated absorption from the gastrointestinal tract. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **285**: 1175-1180.

- Thornalley P. J. (1983) A mechanism for primaquine mediated oxidation of NADPH in red blood cells. *Biochem Pharmacol.* **32**: 3571-375.
- Tränger, D. & Csordas, A. (1987) Biphasic interaction of Triton detergents with the erythrocyte membrane. *Biochem. J.* **244**: 605-609.
- Traube, J. (1908) Über die wirkung lipoidlöslicher stoffe auf route blutkörperchen. *Biochem. Z.* **10**: 371-386.
- van Hoogevest, P. & De Kruijff, B. (1978) Effect of amphotericin B on cholesterol-containing liposomes of egg phosphatidylcholine and didocosenoyl phosphatidylcholine. *Biochim. Biophys. Acta* **511**: 397-407.
- Vial, H.J. (1985) Renewel of the membrane complex of *Schistosoma mansoni* is closely associated with lipid metabolism. *Mol. Biochem. Parasitol.* **17**: 203-218.
- Voet D. & Voet J.G. (1990) Lipids and membranes. In: Biochemistry, John Wiley & Sons Inc., New York, 294.
- Wadsö, I. (1987) Calorimetric Techniques. In: Thermal and energtic studies of cellular biological systemas, Wright, Bristol, 32-45.
- Warren, R.C. (1987) The erythrocyte membrane. In: Physics and architecture of cell membranes, cap.1 e 2, Adam-Hilger, Bristol and Philadelphia, 67-74.
- Weisz, P.B.; Kumor, K. & Macarak, E.J. (1993) Protection of erythrocytes against hemolytic agents by cyclodextrin polysulfate. *Biochem. Pharmacol.* **45**: 1011-1016.
- Weltzien, H.U. (1979) Cytolytic and membrane-perturbing properties of lysophosphatidylcholine. *Biochim. Biophys. Acta* **559**: 259-287.
- Wolde-Mousse, E. & Bennet, J.L. (1982) *Schistosoma mansoni*: calcium efflux and the effects of calcium-free media on the response of the adult male musculature to praziquantel and other agents inducing contraction. *Exp. Parasitol.* **53**: 270-278.
- Yang, M. (1993) Effect of sulfhydryl reagents on spectrin states on the erythrocyte membrane. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **192**: 918-925.
- Yushmanov, V.E., Imasato, H., Perussi, J.R. & Tabak, M. (1995) Proton relaxation and spin label studies of papaverine localization in ionic micelles. *J. Magnetic. Resonance* **106**: 236-244.
- Zachowski, A. (1993) Phospholipids in animal eukariotic membranes: transverse assymetry and movement. *Biochem. J.* **294**: 1-14.

6. ANEXO I:

Microcalorímetro de Condução de Calor

A FIGURA 5a mostra esquematicamente um microcalorímetro Thermometric 2277 (TAM, Thermal Activity Monitor), semelhante ao que foi utilizado para a execução dos experimentos microcalorimétricos apresentados nesta Tese. Um banho de água termostatizado circunda quatro estações de trabalho (canais) que podem ser operadas independentemente. A estabilidade da temperatura do banho é $\pm 1 \times 10^{-4} \text{ }^{\circ}\text{C}$ que pode ser mantida por longo período de tempo (dias) desde que a temperatura ambiente não varie mais do que $\pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$ (sala rigorosamente termostatizada). A FIGURA 5 b, mostra um canal calorimétrico do tipo "tween" ao qual se acopla a cela de reação (Figura 5 c) que está associada à uma torre de alumínio de aproximadamente 30 cm de comprimento.

As celas de reação podem ser constituídas de simples ampolas ou podem ter estruturas complexas nas quais vários tipos de acessórios podem estar associados. No nosso caso, a cela de reação possui um agitador e um tubo metálico capilar que permitia a adição de pequenas quantidades de reagentes, conforme esquematizado na FIGURA 5 c.

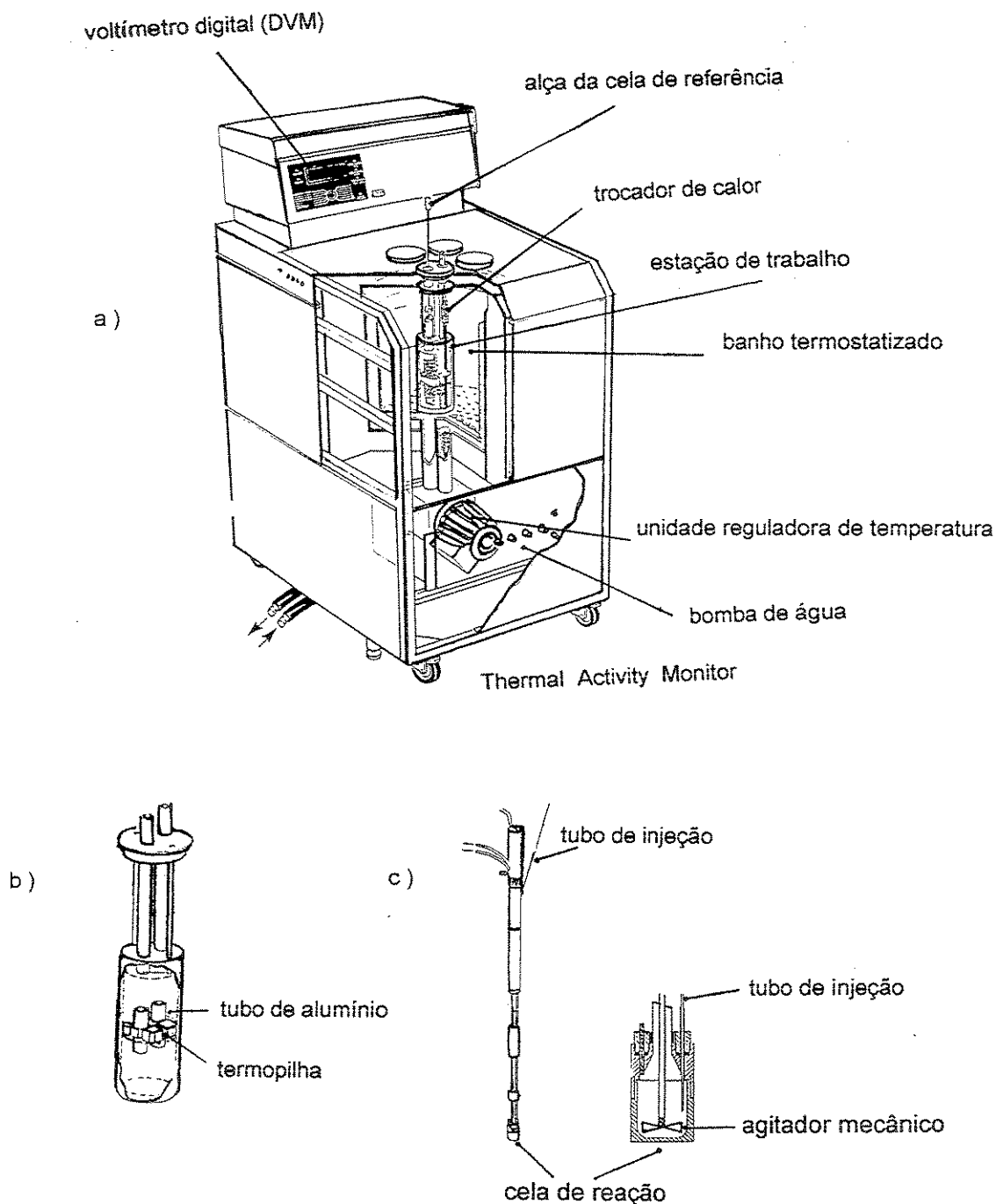


FIGURA 5: MICROCALORÍMETRO de CONDUÇÃO de CALOR (TAM, Thermal Activity Monitor). a-) vista interna do instrumento mostrando uma das quatro estações de trabalho; b-) estação de trabalho contendo os tubos de alumínio que servem de encaixe para a celas de reação e referência e a termopilha; c-) torre de inserção da cela reação contendo um tubo de injeção e um agitador mecânico.

7. ANEXO II:

Hemólise e Eluição de Lipídios na Duplicação das concentrações de TFP, DBC e PZQ

Como nos experimentos de análise morfológica apresentados em Malheiros *et al.*, (1998d) utilizamos diferentes concentrações de cada um dos xenobióticos, apresentamos, na Figura 6, uma análise comparativa da eluição de lipídios (colesterol e fosfolipídios) quando a hemólise induzida pela TFP e DBC varia de 5 para 50%. Esta análise não pôde ser feita com o PZQ pois devido a sua baixa solubilidade o mesmo foi utilizado em concentrações suficientes para induzir uma hemólise máxima de 12%.

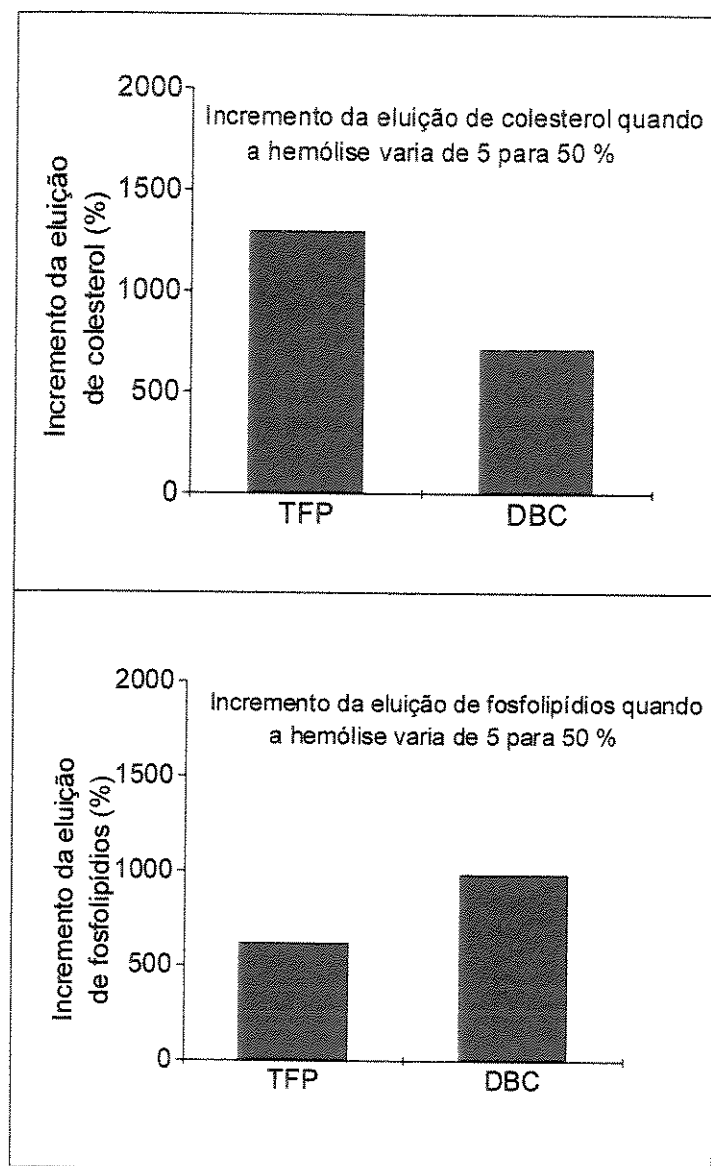


FIGURA 6: INCREMENTO da ELUIÇÃO de COLESTEROL e FOSFOLIPÍDIOS quando a HEMÓLISE INDUZIDA por TFP e DBC VARIA de 5 para 50 %. Ht = 10%, incubação 60 minutos, 37 °C.