

AÇÃO DE FÁRMACOS SOBRE MEMBRANAS: ESTUDOS POR ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA

Lais Alonso, Antonio Alonso, Cássia Alessandra Marquezin

Instituto de Física

Universidade Federal de Goiás, CEP: 74001970, Brasil

laisalonso2@hotmail.com, cassia.m@if.ufg.br

PALAVRAS-CHAVE: Leishmania, Miltefosina, bicamadas lipídicas, RPE.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Tratamentos transdérmicos

Controlar a entrada de drogas no interior do corpo não é somente um dos maiores tópicos de pesquisa como também representa uma das grandes dificuldades encontradas no campo farmacêutico. Grande parte destas drogas é administrada oralmente. Entretanto, para uma variedade delas, esta rota de administração não é possível devido à alta atividade metabólica do fígado e do trato gastro-intestinal. Este problema não se restringe somente às drogas modernas e sofisticadas, mas também alcança outras classes de drogas tradicionais. Outro problema associado a esta administração é que para algumas drogas, é necessário haver uma difusão contínua, a qual é muito difícil de ser controlada via esta rota. Por esta razão, há sempre a necessidade de se buscar novas alternativas. A rota transdérmica (via pele), por exemplo, é uma delas. Sua eficiência está associada a uma menor atividade metabólica da pele e a possibilidade de obter um perfil contínuo de difusão. Contudo, esta rota também apresenta dificuldades. Como a função natural da pele é proteger o corpo dos agentes externos, a principal limitação na aplicação de drogas transdérmicas é a barreira da pele (ANJOS, NETO e ALONSO, 2007a). Desta forma, é necessário conhecer os mecanismos que regulam a passagem de moléculas através da pele, bem como aqueles que possibilitariam aumentar sua permeabilidade.

¹ Revisado pelo orientador. Orientando: Lais Alonso; Orientador: Cássia A. Marquezin; colaborador: Antonio Alonso.

1.2 Leishmaniose

A Leishmaniose é uma doença endêmica em 88 países, localizados principalmente nas regiões tropicais e subtropicais, com ocorrência mundial de 10 a 12 milhões de casos, sendo 1.5 milhões de novos casos por ano (DESJEUX, 2004). Leishmaniose é causada por infecção pelos protozoários do gênero *Leishmania*, os quais se espalham através da picada de mosquitos flebotomíneos. Há várias formas diferentes de leishmaniose, sendo que as mais comuns são a cutânea, que causa feridas na pele, e visceral, que afeta alguns órgãos internos como fígado, medula óssea e baço.

Atualmente o tratamento da doença é feito por quimioterapia, com compostos orgânicos de antimônio pentavalente ministrados por via parenteral em altas doses, exigindo hospitalização do paciente (ALVAR, CROFT e OLLIARO, 2006). As drogas são cardiopáticas, apresentam resposta clínica variável e têm custo elevado. Alquilfosfocolinas (AFCs) representam uma nova classe de agentes antitumorais que induzem apoptose em células tumorais, sem que se saiba exatamente como exercem a ação biológica.

1.3 Miltefosina

A MT é uma alquilfosfocolina desenvolvida originalmente como um quimioterápico antineoplásico. Na década de 80, durante a sua avaliação para esta finalidade terapêutica, descobriu-se a sua potente ação contra leishmanias (KUHLENCOR, MARIERA, EIBL *et al.*, 1992). A MT propiciou o primeiro tratamento oral bem sucedido contra a leishmaniose em pesquisas de campo, com pequenos efeitos secundários, e está licenciada na Índia, Colômbia e Alemanha. Mas seu mecanismo de ação é pouco compreendido. As vantagens da miltefosina são: o fácil acesso e o uso por via oral. A ação terapêutica da miltefosina envolve sua interação com a membrana celular. A estrutura molecular da miltefosina está mostrada na Figura 1 a seguir:

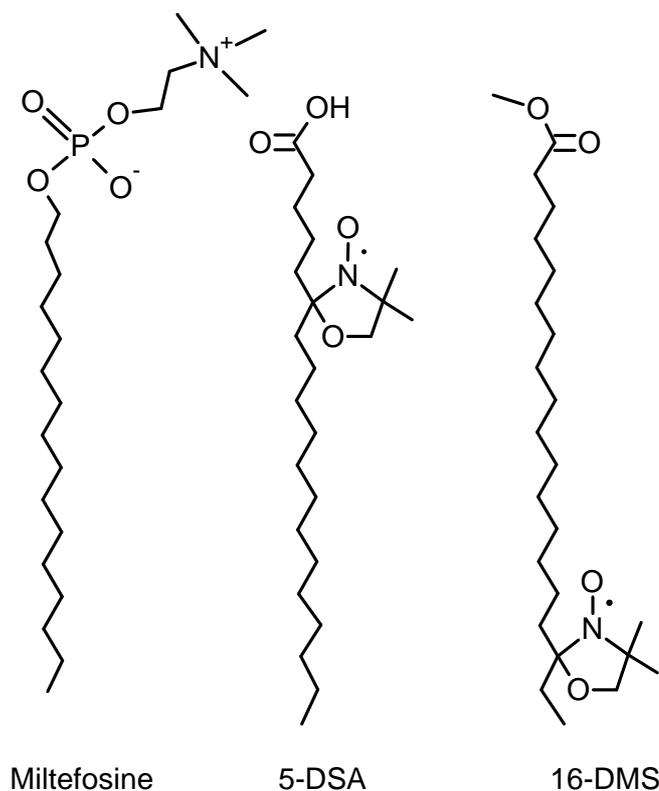


Figura 1: Fórmulas químicas estruturais da Miltefosina e de dois dos marcadores de spin usados neste trabalho (5-DSA e 16-DMS).

1.4 RPE

A técnica de RPE tem sido utilizada no estudo dos mecanismos relacionados ao aumento de permeação do estrato córneo (EC). Foi verificado que em vesículas de dipalmitoil fosfatidil colina (DPPC) e em EC, terpenos aumentam o coeficiente de partição e a taxa de difusão rotacional de marcadores de spin que são moléculas com um elétron desemparelhado no nitrogênio, sendo assim detectados pelo RPE, e ao se ligar com o tecido biológico estudado funciona como um informante (Spin Label). Sugere-se que os terpenos atuem como espaçadores em membranas, aumentando sua fluidez e provocando rupturas na rede de ligações hidrogênio da interface (ANJOS, NETO e ALONSO, 2007a). Efeitos análogos são provocados em estrato córneo por misturas mentol-etanol (ANJOS, NETO e ALONSO, 2007b) e, no caso específico do promotor de permeação 1,8-cineole, a ação afeta apenas a componente lipídica de misturas de EC com proteínas (ANJOS e ALONSO, 2008).

2 OBJETIVOS

Utilizar a espectroscopia de RPE de marcadores de spin para investigar as interações da miltefosina com membranas modelos de DPPC e do estrato córneo. Também serão estudadas as propriedades de auto-agregação da MT em solução aquosa.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Membranas do EC

Como previamente reportado (ALONSO, MEIRELLES e TABAK, 1995), (ALONSO, MEIRELLES, YUSHMANOV *et al.*, 1996), (ALONSO, MEIRELLES e TABAK, 2000), (QUEIRÓS, SOUSA NETO e ALONSO, 2005) o EC foi obtido de ratos recém nascidos da raça Wistar com menos de 24 horas de vida. Depois de sacrificado o animal, sua pele foi extraída e o excesso de gordura removido através de sua fricção em água destilada. A pele foi então colocada dentro de um dissecador contendo ½ litro de hidróxido de amônio por 5 minutos. Posteriormente, foi colocado para flutuar em água destilada com a parte da epiderme em contato com o líquido. Transcorridas 2 horas, o EC foi removido com um papel de filtro e então transferido para uma tela de Teflon, onde foi extensivamente lavado com água destilada e deixado secar em condições ambientais. Este procedimento reduz em grande parte a quantidade de epiderme junto às membranas de EC. Por fim, as membranas foram estocadas em um dissecador contendo sílica gel sob um vácuo moderado até sua utilização.



Figura 2: Etapas do procedimento de obtenção do EC.

3.2 Marcação das amostras de EC

Os marcadores derivados do ácido esteárico, 5-doxil estearato (5-DSEA), 5-doxil metil estearato (5-DMS) e 16-doxil metil estearato (16-DMS) foram comprados da Aldrich (Milwaukee, WI). Uma pequena alíquota do marcador (~ 1 µl) dissolvido em etanol (5 mg/ml) foi colocada sobre uma placa de vidro para que o solvente fosse evaporado. Então, 2 mg de EC foi adicionado ao marcador juntamente com 50 µl de um tampão salino acetato (10 mM de acetato, 150 mM de NaCl e 1 mM de EDTA; pH 5,2) e deixados reagir por 15 minutos. Após a marcação, as amostras foram colocadas dentro de tubos capilares para a realização das medidas de RPE.

3.3 Preparação das vesículas de DPPC

Os lipídios de DPPC com mais de 99 % de pureza foram adquiridos da Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA). 3 mg de DPPC, foi dissolvida em um tubo de ensaio contendo 60 µL de uma solução contendo clorofórmio:metanol (2:1) e a fração correspondente de miltefosina. Em seguida o solvente orgânico foi evaporado com um fluxo moderado de gás de nitrogênio e um filme lipídico fino foi formado na superfície interna do tubo. Para ter certeza que todo o solvente evaporou, o tubo foi colocado sob vácuo em um dissecador contendo sílica gel por ~24 h. O filme foi hidratado com 0,5 mL de tampão fosfato (5 mM com 150 mM NaCl em pH 7.4) para formar vesículas multilamelares. A amostra foi levada ao forno com temperatura de ~50 °C por cerca de 5 minutos, logo em seguida foi submetida à agitação periódica em vórtex à temperatura ambiente, após este processo a amostra foi novamente aquecida a aproximadamente 50 °C, esta medida foi repetida por mais três vezes visando obter uma solução homogênea, que sugere uma boa dispersão dos lipídios de DPPC. Para finalizar, as membranas de DPPC foram agitadas e transferidas para tubos capilares, os quais foram selados e levados para medidas de RPE.

3.4 Espectroscopia de RPE

Nossas medidas de RPE foram realizadas em um espectrômetro Bruker ESP300 equipado com uma cavidade de ressonância ER410 ST. Os parâmetros de operação dos dois equipamentos foram os seguintes: potência da microonda, 10 mW; frequência de modulação,

100 KHz; amplitude de modulação, 1,024 G; varredura do campo magnético, 100 G; tempo de varredura, 168 s e constante de tempo de detecção, 41 ms. A temperatura foi controlada por um sistema de fluxo de nitrogênio (Bruker, Rheinstetten, Alemanha), com uma precisão de 0.3 °C. Um programa de ajuste chamado “Non-Linear Least-Squares” (NLLS), desenvolvido por Jack H. Freed et al., foi utilizado para as simulações dos espectros de RPE. Este programa permite ajustar um único espectro com duas componentes tendo diferentes mobilidades e parâmetros dos tensores magnéticos. Os tensores magnéticos A e g estão definidos num sistema de referência fixo na molécula, onde as taxas das constantes de difusão rotacional em torno dos eixos x, y e z estão incluídas (SCHNEIDER e FREED, 1989). Por convenção, o eixo x aponta na direção da ligação N-O, o eixo z é paralelo ao orbital 2pz do átomo de nitrogênio e o eixo y é perpendicular aos outros eixos (BUDIL, LEE, SAXENA *et al.*, 1996). A Tabela 1 apresenta os autovalores dos tensores A e g, os quais são parâmetros magnéticos usados nos cálculos dos espectros para as componentes espectrais 1 e 2 (os espectros de RPE de marcadores de membranas são muitas vezes formados por duas componentes, indicando duas populações de marcadores diferindo principalmente no estado de mobilidade).

Tabela 1: Componentes principais dos tensores magnéticos g (fator-g) e A (desdobramento hiperfino) utilizados no programa de ajuste NLLS

Parâmetro	Componente1	Componente2
gxx	2.0082	2.0080
gyy	2.0060	2.0058
gzz	2.0022	2.0031
Axx (G)	6.9	6.5
Ayy (G)	6.5	5.5
Azz (G)	31.5	32.5

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Interações da miltefosina com o Estrato Córneo

As fórmulas estruturais de dois dos marcadores de spin utilizados neste trabalho estão apresentadas na Figura 1. Em trabalhos anteriores foi desenvolvida a técnica de inserir

marcadores de spin derivados do ácido esteárico diretamente no tecido intacto do EC (ALONSO et al. 1995, 1996). A quantidade de lipídios presentes no EC é cerca de 17% e a composição lipídica do EC é constituída basicamente de ceramidas (50%), colesterol (25%), ácidos graxos (20%) e sulfato de colesterol (5%). Pelo alto grau de afinidade as moléculas marcadoras se inserem nas membranas lipídicas do EC e funcionam como um grupo repórter dando informações, através do sinal de RPE, sobre a dinâmica e polaridade do meio onde se encontram.

Na Figura 3 estão apresentados espectros de RPE do marcador 5-DSA inserido nas membranas do EC. Estes espectros são de amostras tratadas com diferentes concentrações de miltefosina e sem o tratamento (controle). O parâmetro de RPE desdobramento hiperfino máximo, $2T_{//}$, é sensível à dinâmica do marcador na membrana, sendo menor para maior dinâmica molecular. Observa-se nestes espectros que este parâmetro sofre uma redução gradativa com o aumento da concentração de miltefosina.

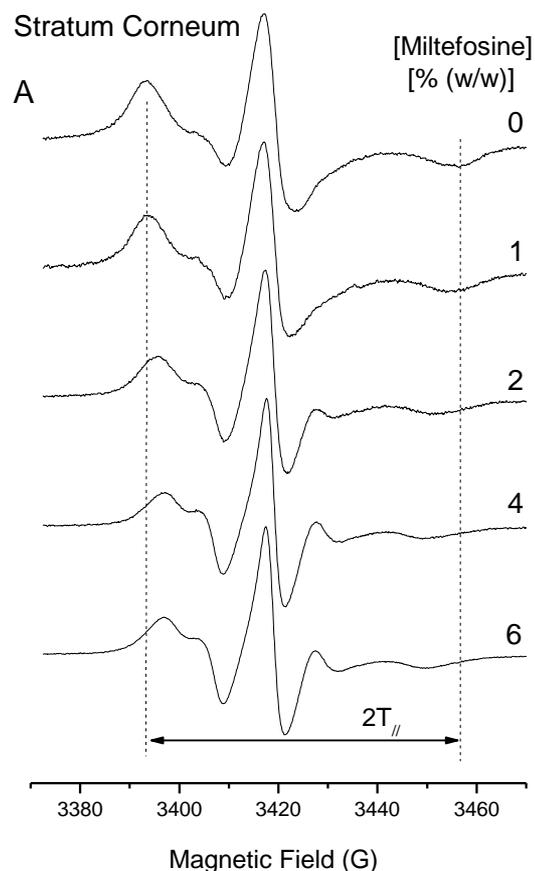


Figura 3: Espectros de RPE do marcador de spin 5-doxil estearato (5-DSA) incorporado em membranas de Estrato Córneo (EC), em tampão acetato pH 5,5 a 25°C, para diversas concentrações de miltefosina (MT). As percentagens de MT indicadas estão dadas na relação p/p (peso de MT/peso do EC seco). O parâmetro de RPE

$2T_{//}$, indicado na figura, é o desdobramento hiperfino máximo medido em unidades de Campo Magnético (G), indo do primeiro pico do espectro até a última depressão. Este parâmetro diminui em presença da MT indicando aumento na dinâmica dos lipídios da membrana.

As percentagens de MT indicadas estão dadas em peso de MT/peso do EC seco. O parâmetro de RPE $2T_{//}$, indicado na figura, é o desdobramento hiperfino máximo medido em unidades de Campo Magnético (G), indo do primeiro pico do espectro até a última depressão. Este parâmetro diminui em presença da MT indicando aumento da dinâmica da membrana. A dependência deste parâmetro com a concentração de miltefosina está apresentada no gráfico da Figura 4. O erro experimental do parâmetro $2T_{//}$ é 0,5 G e a diferença causada para 4% de miltefosina foi de aproximadamente 10 G, sendo considerada muito grande. Nos próximos experimentos será necessário testar o marcador de spin em suspensão de micelas de miltefosina para obtenção do espectro de RPE das micelas e assim verificar a possibilidade de parte dos marcadores estar nas micelas de miltefosina.

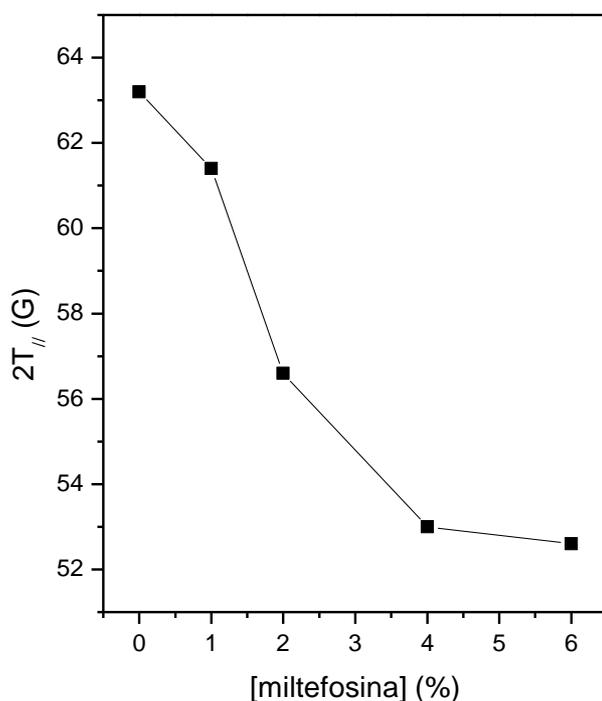


Figura 4: Parâmetro de RPE $2T_{//}$, desdobramento hiperfino máximo (Fig. 4), medido no espectro de RPE do marcador de spin 5-doxil estearato incorporado em membranas de Estrato Córneo, em tampão acetato pH 5,5 a 25°C, em função da concentração de miltefosina.

Temos na Figura 5 a dependência do mesmo parâmetro de RPE $2T_{//}$ com a temperatura, tanto para a amostra de controle (EC não tratado) como para o EC tratado com miltefosina a 4% (p/p). Observa-se que para temperaturas abaixo de 55°C há um aumento significativo de dinâmica molecular das amostras tratadas com a miltefosina (menores valores do $2T_{//}$). Para temperaturas maiores ocorre até mesmo a inversão do efeito.

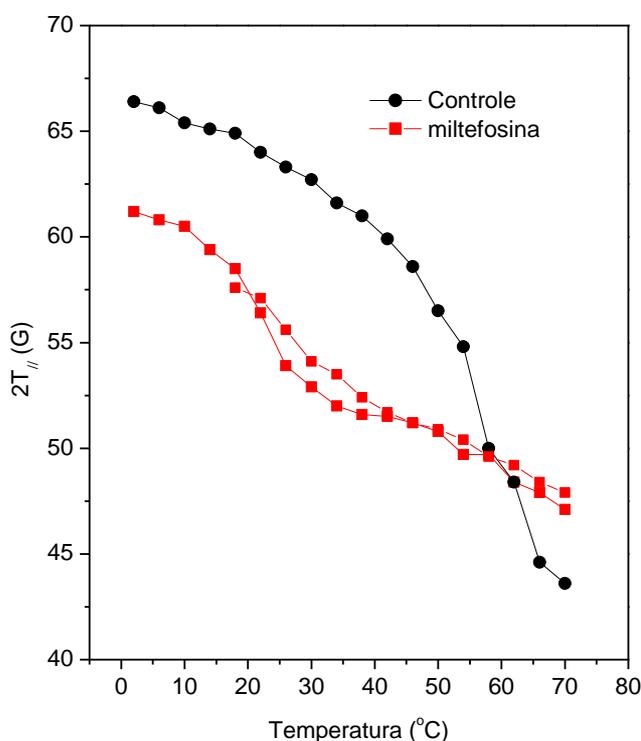


Figura 5: Parâmetro de RPE $2T_{//}$ do marcador de spin 5-doxil estearato incorporado em membranas de Estrato Córneo, em tampão acetato pH 5,5 como função da temperatura para uma amostra de controle e duas tratadas com 4% de miltefosina (p/p).

O parâmetro $2T_{//}$ é prático e fácil de medir diretamente no espectro de RPE. É muito utilizado e mesmo que em princípio é um parâmetro estático, reflete a dinâmica molecular, como pode ser visto na Figura 4. O $2T_{//}$ decresce com o aumento da temperatura, ou seja, com o aumento de mobilidade ou de fluidez da membrana. Entretanto, uma análise mais acurada pode ser feita através da simulação dos espectros que leva em conta o espectro como um todo e gera como parâmetro de movimento o tempo de correlação rotacional, τ_C . Neste trabalho foi utilizado o programa de ajuste NLLS e adotado um modelo de simulação com uma ou duas componentes espectrais. É que muitas vezes o programa de ajuste pode identificar duas classes de marcadores de spin de sinais distintos que aparecem resolvidos nos

espectros de RPE. Estas duas populações de marcadores possuem distintos estados de mobilidade e polaridade no interior da membrana. O entendimento da formação destas duas componentes espectrais é pobre, mas tem sido abordado em trabalhos anteriores de nosso grupo de pesquisa (ANJOS et al., 2007). Na interpretação apresentada, a componente de menor mobilidade e maior polaridade foi associada aos marcadores de spin cujos grupos polares estão formando ligação de hidrogênio com a interface polar da membrana, enquanto a outra componente foi associada aos marcadores que, estando no interior da membrana, não estão formando ligações de hidrogênio com os grupos polares.

Na Figura 6 estão apresentados os dados obtidos a simulação dos espectros para os marcadores de spin 5-DSA (painéis A e B) e 16-DMS. No caso do marcador 5-DSA, espectros de apenas uma componente foram observados no intervalo de temperatura 6 a 38°C, onde as amostras tratadas com miltefosina apresentaram maior fluidez (Figura 6 A). A partir de 42°C os espectros se abriram em duas componentes, onde a componente 2 (mais fluida) do EC tratado com miltefosina foi semelhante à do EC controle, em mobilidade, entretanto, a componente 1 (de menor fluidez) mostrou maior dinâmica para o EC tratado com miltefosina. No painel B da Figura 6 estão as populações em porcentagem de componente 1, N_1 , para as duas amostras. Pode ser observado neste gráfico que a presença da miltefosina leva a um aumento da população da componente mais fluida. No caso do marcador de spin 16- DMS, os espectros apresentaram duas componentes no intervalo de temperatura de 2 a 50°C para a amostra tratada com miltefosina a 4% (p/p) e de 2 a 58°C para o controle (Figura 6 C). Acima destes intervalos de temperatura os espectros foram simulados apenas com a componente 2. Nota-se aqui que o efeito da miltefosina foi de aumentar a fluidez da componente 1 (de menor mobilidade) e no caso da componente 2 não houve efeito significativo até aproximadamente 50°C e acima desta temperatura a miltefosina apresentou um pequeno efeito ao contrário, ou seja, de reduzir a fluidez. Para este marcador a miltefosina também aumentou a fração da componente mais fluida nos espectros para todo o intervalo de temperatura medido (Figura 6 D).

É importante ressaltar que o aumento de fluidez que a miltefosina causa no EC chega a ser drástico para concentrações de 5 e 6%, causando uma mudança no $2T//$ de 10 G (Figura 3). Isto sugere que ela pode ser utilizada como um facilitador da permeação na pele para viabilizar tratamentos transdermais. Além disso, é muito importante conhecer esta atividade nas membranas do EC tendo em vista o tratamento da Leishmaniose cutânea com miltefosina.

Como é conhecido que a membrana plasmática da *Leishmania* é rica em fosfolípidios, torna-se também importante estudar os efeitos da miltefosina em membranas modelo de DPPC.

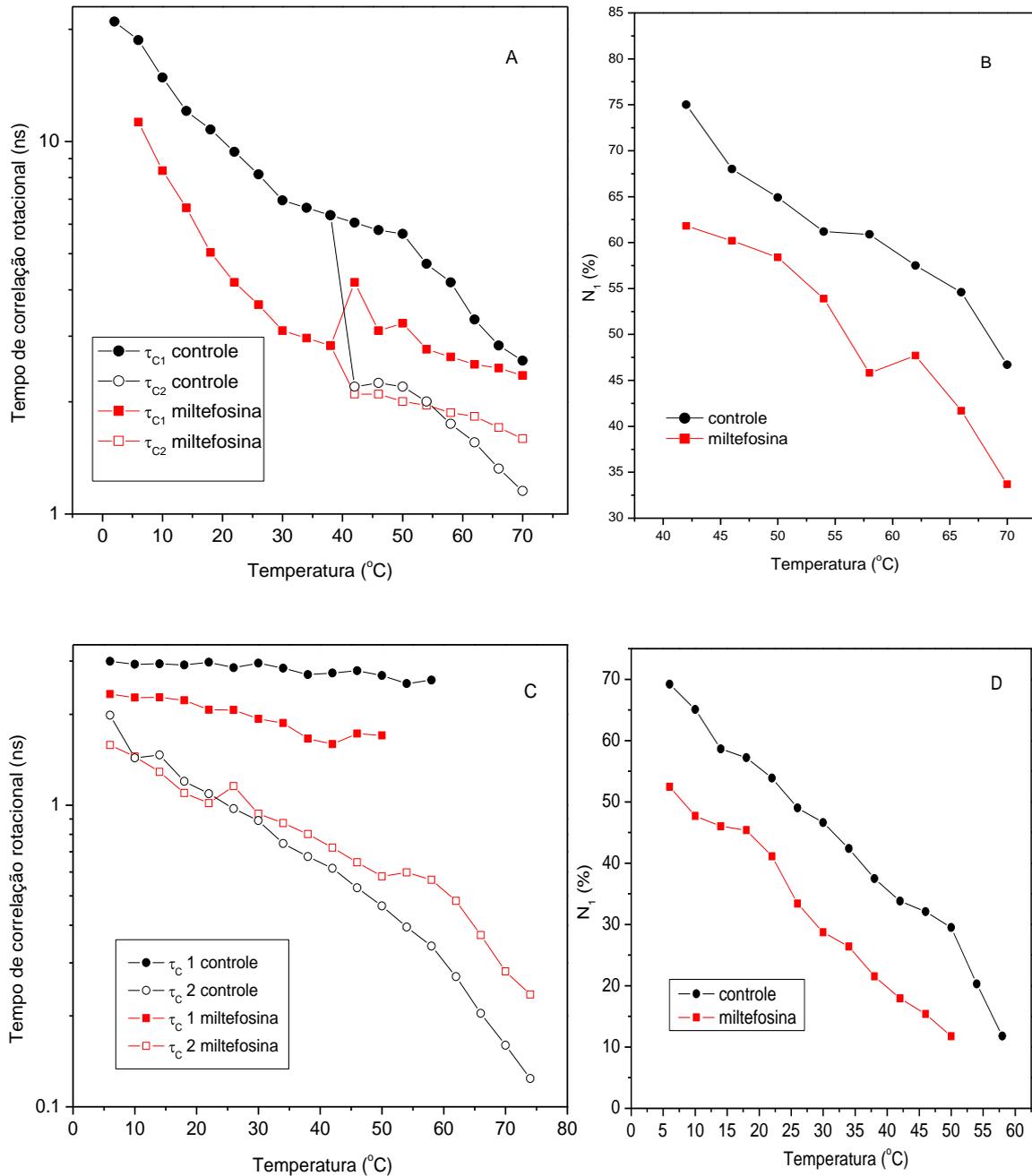


Figura 6: Dependência da temperatura dos parâmetros de RPE tempo de correlação rotacional, τ_c , e percentagem de população de marcadores de spin na componente espectral 1, N_1 , para os marcadores 5-DSA (painéis A e B) e 16-DMS (painéis C e D) em Estrato Córneo tratado e não tratado com miltefosina (4% p/p). Os espectros de RPE foram simulados com o programa NLLS com um modelo de uma ou duas componentes.

Interações da miltefosina com DPPC

Em membranas modelos de DPPC é possível controlar melhor a relação molar entre lipídios e a miltefosina. Neste caso a miltefosina é dissolvida junto com o fosfolipídio em uma mistura de solventes orgânicos de clorofórmio e metanol, como descrito na seção de Materiais e Métodos. Assim a miltefosina fica bem distribuída com o lipídio da membrana modelo, sendo remota a probabilidade de formação de micelas de miltefosina, especialmente em baixa proporção molar de miltefosina-DPPC.

Os espectros de RPE de três marcadores de spin em DPPC estão apresentados na Figura 7 para várias temperaturas. Também foi preparada uma amostra de DPPC contendo 35 mol % de colesterol e medida com o marcador 5-DMS (espectros da quarta coluna). Os espectros apresentados em linha preta são os de controle e o tratamento com miltefosina foi feito na razão molar de 25% (espectros em vermelho sobrepostos aos de controle) e para o caso do marcador 5-DSA também foi medido na razão de 35% (espectros em azul). Os espectros estão sobrepostos para mostrar que não há diferenças significativas entre eles com exceção das amostras de DPPC contendo colesterol para as temperaturas acima da principal transição de fase da bicamada (41°C). Com 35% de colesterol a DPPC assume a fase líquida ordenada e assim não sofre a transição da fase gel para a líquida cristalina (IPSEN et al. 1990). Esta fase é caracterizada por várias mudanças: melhor empacotamento dos lipídios, aumento de espessura da camada hidrofóbica e diminuição da área por molécula (IPSEN et al. 1990). Abaixo de 41°C, os espectros do 5-DMS na DPPC contendo colesterol não foram significativamente diferentes daqueles na DPPC pura, no entanto, acima de 41°C há diferenças importantes e o efeito da miltefosina foi no sentido de atenuar esta diferença.

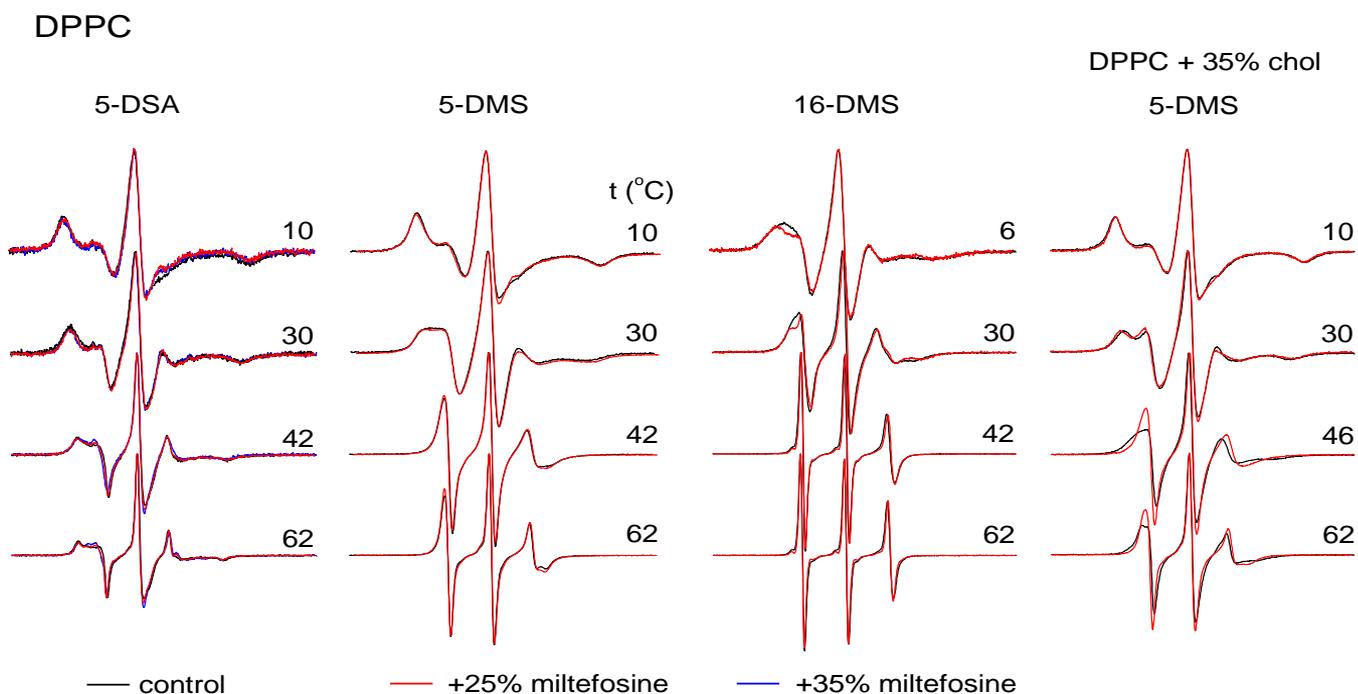


Figura 7: Espectros de RPE dos marcadores de spin 5-DSA, 5-DMS e 16-DMS incorporados em vesículas de DPPC (PBS pH 7,4) para diversas temperaturas. Os espectros em linha preta se referem às amostras de controle (não tratadas com miltefosina); em vermelho: DPPC tratada com 25 mol % de miltefosina; em azul: 35 mol % de miltefosina (somente para 5-DAS). Na quarta coluna estão espectros sobrepostos para o caso da DPPC contendo 35 mol % de colesterol. Com exceção dos espectros da quarta coluna a 46 e 62°C, os espectros são muito semelhantes. A varredura de campo magnético de cada espectro foi de 100 G.

5 CONCLUSÕES

Conclui-se que a miltefosina não altera a fluidez da membrana de DPPC quando adicionada na razão molar de 25%. Mas causa um aumento de fluidez nas membranas de estrato córneo, especialmente em temperaturas abaixo de 50 °C. Nota-se também que as alterações causadas pela miltefosina foram mais discretas na região central da membrana, ou seja, o marcador de spin contendo o radical nítróximo (fragmento paramagnético) posicionado no final da cadeia metilênica (16-DMS) apresentou efeitos menos pronunciados do que o marcador com o nítróximo anexado ao quinto carbono da cadeia graxa. Como os mecanismos de ação da miltefosina no tratamento da Leishmaniose não são conhecidos, nós entendemos

que este trabalho contribui para estas investigações. Este trabalho também sugere que a miltefosina pode ser utilizada com um facilitador da permeação de fármacos na pele.

6 REFERÊNCIAS

ALONSO, A., MEIRELLES, N.C., TABAK, M. *Effect of hydration upon the fluidity of intercellular membranes of stratum corneum: an EPR study. Biochim Biophys Acta 1237:6-15, 1995.*

ALONSO, A., MEIRELLES, N.C., TABAK, M. *Lipid chain dynamics in stratum corneum studied by spin label electron paramagnetic resonance. Chem Phys Lipids 104:101-111, 2000.*

ALONSO, A., MEIRELLES, N.C., YUSHMANOV, V.E., TABAK, M. *Water increases the fluidity of intercellular membranes of stratum corneum: correlation with water permeability, elastic, and electrical properties. J Invest Dermatol 106:1058-1063, 1996.*

ALVAR, J., CROFT, S., OLLIARO, P.. *Advan. Parasitol., 61, 223-274, 2006.*

ANJOS, J.L.V.d., AILONSO, A. *Terpenes increase the partitioning and molecular dynamics of an amphipathic spin label in stratum corneum membranes. Int J Pharm 350:103-112, 2008.*

ANJOS, J.L.V.d., NETO, D.d.S., ALONSO, A. *Effects of 1,8-cineole on the dynamics of lipids and proteins of stratum corneum. Int J Pharm 345:81-87, 2007.*

ANJOS, J.L.V.D., NETO, D.de S., AILONSO, A. *Effects of ethanol/L-menthol on the dynamics and partitioning of spin-labeled lipids in the stratum corneum. European J. Pharm. Biopharm. 67, 406–412, 2007.*

BUDIL, D.E., LEE, S., SAXENA, S., FREED, J.H. *Nonlinear-leastsquares analysis of slow-motional EPR spectra in one and two dimensions using a modified Levenberg–Marquardt algorithm. J. Magn. Reson. A 120, 155– 189, 1996.*

DESIEUX, P. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis., 27, 305-318,2004.*

KUHLENCORD, A., MANIERA, T., EIBL, H., UNGER, C. *Antimicrob. Agents Chemother., 36, 1630-1634, 1992.*

IPSEN, J.H., MOURITSEN, O. G., BLOOM, M. *Relationships between lipid membrane area, hydrophobic thickness, and acyl-chain orientational order. The effects of cholesterol. Biophysical J 57:405-412, 1990.*

QUEIRÓS, W.P.d., SOUSA NETO, D.d., ALONSO, A. *Dynamics and partitioning of spin-labeled stearates into the lipid domain of stratum corneum. J Control Release 106:374-385, 2005.*

SCHNEIDER, D.J., FREED, J.H. *Spin labeling: theory and application. In: Berliner, L.J., Reuben, J. (Eds.), Biological Magnetic Resonance, vol. 8. Plenum Press, New York, pp. 1–76, 1989.*