

ABSTRACT

The principal target of the Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs) is the membrane-associated enzyme cyclooxygenase (COX). Parallel to COX inhibition, NSAIDs are endowed with activity towards another membrane-associated enzyme, phospholipase A₂ (PLA₂). PLA₂ enzymes hydrolyze the *sn*-2 fatty acyl bond of phospholipids releasing free fatty acids (FFA) and lysophospholipids and are present in many biological fluids, from pancreatic juice to venoms of bees and snakes. Also, PLA₂s are a control point in the regulation of the synthesis of bioactive lipid mediators like the eicosanoids. These lipid mediators are important in the inflammatory processes and they are produced from arachidonic acid (AA) released from the *sn*-2 position of the cell membrane phospholipids hydrolyzed by PLA₂. For participating in the onset of an inflammatory response in the cell, PLA₂ enzymes are medically relevant and the inhibition of lipid mediator's production is visualized as a therapeutic goal that can improve the treatment of chronic inflammatory conditions such as rheumatoid arthritis and Alzheimer's disease.

The work presented in this thesis is based on the use of membrane model systems, liposomes and monolayers of different composition, as nanostructured biomimetic interfaces for the investigation of both inhibition mechanism over two PLA₂ enzymes and the effect caused by NSAIDs over biomembranes. The NSAIDs (piroxicam, meloxicam, tenoxicam, lornoxicam, nimesulide and ibuprofen) were chosen for the experiments according to their established use and efficacy in the treatment of acute and chronic inflammatory conditions. The first step of these studies consisted in the development and optimization of a fluorescence technique capable of monitoring the release of FFA from the membrane model systems as result of the hydrolytic activity of PLA₂. This technique relied on the use of an extrinsic fluorescent probe, AcryloDated Intestinal Fatty Acid Binding protein (ADIFAB), and was then applied for the evaluation of the enzyme's hydrolytic ability in the presence of the drugs. The second experimental approach implied the study of the direct binding between enzymes and drugs with combined physical-chemical and biophysical methodologies. Intrinsic fluorescence measurements and quenching phenomena allowed the determination of binding parameters and consequently the extent of the drugs' binding to their potential target. Circular Dichroism (CD) measurements provided valuable information related to the enzyme's secondary structure in different conditions, such as free in buffer solution, in liposome media and in drug solution media with and without the addition of liposomes. Moreover, they provided information on the interfacial binding and activation of PLA₂ in the presence of NSAIDs,

allowing the establishment of a correlation with the ability of the anti-inflammatory agents in inhibiting the enzymes. The observation of the molecular area of hydrolysable lipid monolayers once in contact with enzyme buffered solutions, with and without the addition of drugs, provided more evidences for the importance of the direct interaction between enzyme and drugs for the inhibition by the NSAIDs. Finally, structural and dynamic techniques were developed to assess the influence of the drugs in the membrane biophysics. The experimental set-up included Langmuir isotherms coupled to Brewster Angle Microscopy (BAM) as well as the use of another extrinsic fluorescent probe, 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH), incorporated in liposomes and studied by time-resolved fluorescence approaches. The BAM experiments revealed a change in the lipid structure promoted by the direct contact with the NSAIDs. These changes, which can synergize with the drugs' direct effect over the enzymes, were then correlated to a possible modulation in PLA₂ activity.

In overall, the developed studies show the inhibition capacity of NSAIDs towards both PLA₂ enzymes and provide a perspective view over the drug-enzyme binding dynamics. Also, they reinforce that for understanding PLA₂ inhibition by NSAIDs it is necessary to account for the direct modulation of enzyme activity by the drugs as well as with the effects caused on the biomembranes.

Key Words: phospholipase A₂, non-steroidal anti-inflammatory drugs, enzymatic inhibition, membrane model systems, membrane biophysics.

RESUMO

O principal alvo terapêutico dos Anti-Inflamatórios Não Esteróides (AINEs) é a enzima membranar ciclooxigenase (COX). Paralelamente à inibição da COX, os AINEs apresentam actividade sobre outras enzimas membranares, nomeadamente a fosfolípase A_2 . Estas enzimas hidrolisam os fosfolípidos na posição *sn*-2 com a consequente formação de ácidos gordos e lisofosfolípidos. Estão também presente em inúmeros fluídos biológicos, como o fluído pancreático, e em venenos de cobra e abelha. As fosfolípases A_2 representam um ponto de controlo na regulação biossintética de mediadores lipídicos bioactivos como no caso da família dos eicosanóides. Estes mediadores, por sua vez, desempenham importantes funções nos processos inflamatórios e são produzidos a partir do ácido araquidónico que é libertado na sequência da actividade hidrolítica das fosfolípases A_2 sobre a posição *sn*-2 dos fosfolípidos constituintes das membranas celulares. Por participarem no desencadear da resposta inflamatória a nível celular, estas enzimas são farmacologicamente relevantes, e a inibição da produção de mediadores lipídicos pode ser encarada como um objectivo terapêutico que pode trazer vantagens no tratamento de processos inflamatórios crónicos como, por exemplo, nos casos da artrite reumatóide e da doença de Alzheimer.

O trabalho apresentado nesta Tese baseia-se na utilização de modelos membranares com diferente composição, lipossomas e monocamadas, como interfaces nanoestruturadas aplicadas na investigação do mecanismo de inibição de duas fosfolípases A_2 por AINEs, e no efeito destes AINEs sobre as propriedades biofísicas das biomembranas. Os AINEs utilizados (piroxicam, meloxicam, tenoxicam, lornoxicam, nimesulide e ibuprofeno) foram escolhidos de acordo com a sua comprovada eficácia no tratamento de processos inflamatórios agudos e crónicos. O primeiro passo destes estudos consistiu no desenvolvimento e optimização de uma técnica de fluorescência capaz de monitorizar a formação de ácidos gordos a partir dos modelos membranares utilizados como consequência da actividade hidrolítica da fosfolípase. Esta técnica contou com o uso de um marcador fluorescente extrínseco, *AcryloDated Intestinal Fatty Acid Binding protein* (ADIFAB), e foi então aplicada para avaliar a capacidade de hidrólise da fosfolípase na presença e ausência de AINEs. A segunda abordagem experimental implicou a monitorização da ligação directa fármaco-enzima com uma combinação de técnicas fisico-químicas e biofísicas. Medições de fluorescência intrínseca e de desactivação de fluorescência permitiram a determinação de parâmetros de ligação fármaco-enzima e consequentemente a extensão dessa ligação. Estudos de dicroísmo

circular (CD) forneceram importantes informações acerca da estrutura secundária da enzima livre em solução tampão, em meio lipossómico e em solução de fármaco adicionada ou não de lipossomas. Esta técnica forneceu também dados sobre a ligação e activação interfacial da fosfolípase na presença de AINEs, permitindo estabelecer uma relação com a capacidade inibitória destes fármacos sobre a actividade enzimática. A observação da área molecular de monocamadas preparadas com lípidos hidrolisáveis quando em contacto com soluções tamponadas de enzima, adicionadas ou não de fármaco, realçou a importância da interacção directa entre enzima e fármacos para a inibição causada pelos AINEs. Finalmente, foram desenvolvidas técnicas para avaliar a influência dos fármacos sobre a biofísica membranar. A montagem experimental incluiu isotérmicas de Langmuir acopladas a microscopia do ângulo de Brewster (BAM), assim como a utilização de um outro marcador fluorescente, 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH), incorporado em lipossomas e estudado por fluorescência resolvida no tempo. Os ensaios efectuados com BAM revelaram alterações na estrutura lipídica promovidas através do contacto directo com os AINEs. Estas alterações, que podem actuar de forma sinérgica com o efeito directo dos fármacos sobre as enzimas, foram relacionadas com a possível modulação da actividade da fosfolípase.

De uma forma geral, os estudos desenvolvidos mostram a capacidade inibitória que os AINEs exercem sobre duas fosfolípases e fornecem uma perspectiva sobre a dinâmica de ligação fármaco-enzima. Estes estudos também reforçam a necessidade de considerar não só os efeitos modulatórios destes fármacos sobre as enzimas, mas também os efeitos causados nas biomembranas para uma completa compreensão do mecanismo de inibição da fosfolípase por AINEs.

Palavras-chave: fosfolípase A_2 , anti-inflamatórios não esteróides, inibição enzimática, modelos membranares, biofísica membranar