U.PORTO
FACULDADE DE FARMÁCIA
UNIVERSIDADE DO PORTO

AVALIAÇÃO DO EFEITO DE ALGUNS FÁRMACOS NA FLUIDEZ DA MEMBRANA CELULAR

CÉLIA TAVARES DE SOUSA

Licenciada em Física e Química (U.P.)

PORTO, 2006

U.PORTO

FACULDADE DE FARMÁCIA
UNIVERSIDADE DO PORTO

AVALIAÇÃO DO EFEITO DE ALGUNS FÁRMACOS NA FLUIDEZ DA MEMBRANA CELULAR

ORIENTAÇÃO:

PROF. DRA. MARIA DE LA SALETTE REIS

PROF. DRA. ANABELA CORDEIRO DA SILVA

FACULDADE DE FARMACIA
U. P.
BIBLIOTECA
Data 07/03/2007
Reg. 4801
Cota

FFM
SOU
4801

CÉLIA TAVARES DE SOUSA

Licenciada em Física e Química (U.P.)

Porto, 2006



Dissertação de candidatura ao grau de
Mestre apresentada à Faculdade de Farmácia
da Universidade do Porto

CÉLIA TAVARES DE SOUSA

Licenciada em Física e Química (U.P.)

Porto, 2006

Trabalho realizado no Serviço de Química-Física
da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto

ÍNDICE

ÍNDICE.....I
AGRADECIMENTOS.....IV
RESUMO.....VI
ABSTRACT.....VII
OBJECTIVOS.....VIII
ORGANIZAÇÃO DA DISSERTAÇÃO.....IX

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO GERAL

1.1. Interacções fármaco/membrana.....1

1.2. Sistemas usados como modelos membranares.....3
1.2.1.Lipossomas.....5
1.2.1.1. Introdução.....5
1.2.1.2. Definição e caracterização.....5
1.2.1.3. Classificação.....9
1.2.1.4. Preparação de lipossomas.....11
1.2.1.5. Preparação de lipossomas com colesterol.....13
1.2.2. Células.....14
1.2.2.1. Introdução.....14
1.2.2.2. Esplenócitos de ratinho.....16
1.2.2.3. Linhas celulares.....17
i. Monócitos humanos.....17
ii. Macrófagos de ratinho.....18
1.2.2.4. Células do sangue.....19
i. Granulócitos.....21
ii. Agranulócitos ou células mononucleares.....22
1.3. Anti-inflamatórios não esteróides.....22
1.3.1. Introdução.....22
1.3.2. Classificação dos AINEs.....23
1.3.3. Descrição dos AINEs estudados.....26
1.3.3.1. Meloxicam.....26
1.3.3.2. Lornoxicam.....27
1.3.3.3. Nimesulide.....27
1.3.4. Acção dos AINEs no processo inflamatório.....28

CAPÍTULO 2

METODOLOGIA ANALÍTICA PARA O ESTUDO DA FLUIDEZ MEMBRANAR

2.1. Fluorimetria: Desactivação da fluorescência.....30
2.1.1. Introdução.....30
2.1.2. Modelo teórico para a desactivação da fluorescência.....32

2.1.3. Sonda de fluorescência: DPH.....36
2.2. Estudos de anisotropia no estado estacionário.....38
2.2.1. Introdução.....38
2.2.2. Princípio da anisotropia.....39

CAPÍTULO 3

PARTE EXPERIMENTAL
3.1. Regentes e equipamento.....45
3.2. Preparação das soluções de AINEs.....46
3.3. Preparação de lipossomas EPC.....47
3.4. Isolamento de esplenócitos de ratinho.....48
3.5 Cultura celular.....48
3.5.1. Cultura e isolamento de macrófagos de ratinho.....48
3.5.2 Cultura e isolamento de monócitos humanos.....49
3.6. Separação de leucócitos.....50
3.6.1. Citologia sanguínea.....51
3.7. Preparação das amostras utilizadas e condições experimentais nos ensaios das interacções fármaco/membrana.....52
3.8. Estudo da fluidez membranar.....53
3.9. Verificação da viabilidade celular.....54

CAPÍTULO 4

RESULTADOS E DISCUSSÃO.....55

CAPÍTULO 5

CONCLUSÕES.....79

BIBLIOGRAFIA.....82

AGRADECIMENTOS

No final da elaboração deste trabalho gostaria de agradecer a todos quantos, directa ou indirectamente, o tornaram possível:

Ao Professor Doutor José Luís Fontes da Costa Lima, de quem considero um privilégio ter sido discente, pela oportunidade que me deu em frequentar o Mestrado Europeu em Química Analítica Ambiental e de realizar investigação nesta área, pela confiança em mim depositada e pelo entusiasmo e estímulos contagiantes sempre demonstrados;

À Professora Doutora Maria de La Salette Hipólito Reis, pela orientação e supervisão em todos os passos deste trabalho, pelo apoio e disponibilidade nunca negados, pela autonomia que me permitiu e na qual confiou, bem como pela simpatia e amizade ao longo de todo o Mestrado;

À Professora Doutora Anabela Cordeiro da Silva, pela valiosa ajuda e orientação disponibilizada ao longo de todo o trabalho, por todo o apoio e simpatia;

Ao Professor Doutor Víctor Cerdà, por me ter dado a possibilidade de frequentar a Universidade das Ilhas Baleares, por todos os conhecimentos transmitidos e pela oportunidade da nova experiência que proporcionada;

Ao Doutor Agostinho Almeida, Doutor Alberto Araújo, Doutora Beatriz Quinaz, Doutor Carlos Afonso, Doutora Lúcia Saraiva e Doutora Paula Pinto pelo tempo dispendido e pelos conhecimentos transmitidos nas aulas do Bloco A deste Mestrado e a todos os restantes professores do Departamento de Química-Física por toda a disponibilidade sempre demonstrada;

À Helena e à Marlene por todo o apoio e disponibilidade;

A todos os meus colegas e amigos dos Departamentos de Química-Física e de Bioquímica, pela ajuda, amizade e apoio e principalmente pelo excelente ambiente de trabalho criado ao longo do meu trabalho;

À Cláudia pela incansável presença e colaboração o meu trabalho, por todos os sorrisos, carinho e amizade;

A todos os meus amigos, que mais uma vez estiveram presentes nesta etapa da minha vida;

Às minhas queridas mãe e irmã, aos meus avós, pelo incondicional apoio, amizade, carinho e confiança sempre demonstrados, tanto nos melhores como nos piores momentos;

E por fim dedico este trabalho em memória do meu pai.

RESUMO

Esta dissertação descreve o estudo dos efeitos de três fármacos anti-inflamatórios não esteróides (AINEs), meloxicam, lornoxicam e nimesulide na microviscosidade interna das membranas celulares.

Os estudos realizaram-se usando como modelos membranares, lipossomas e células. Os ensaios foram realizados em lipossomas unilamelares, alguns contendo 30% de colesterol, preparados a partir de fosfatidilcolina de gema de ovo (EPC) que devido à sua composição e organização mimetizam as membranas celulares. Os lipossomas foram obtidos pelo método de hidratação do filme lípidico e sujeitos a um processo de extrusão. Utilizaram-se como sistemas celulares, esplenócitos de ratinho, obtidos do baço dos mesmos, macrófagos de ratinho e monócitos humanos, obtidos da cultura das linhas celulares J774 e HTP1, respectivamente, granulócitos e células mononucleares obtidas a partir de sangue humano.

O estudo da variação de fluidez nas membranas dos diferentes modelos membranares foi efectuado por anisotropia de fluorescência. Para monitorizar as alterações estruturais dos modelos membranares foi utilizada a sonda de fluorescência DPH. Da análise dos resultados obtidos, foi tida em atenção a correcção dos valores experimentais, para evitar interpretações ambíguas.

Neste trabalho também foram efectuados estudos da desactivação de fluorescência da sonda DPH em presença de concentrações crescentes dos AINEs estudados, nos vários modelos membranares. Estes resultados experimentais conduziram à determinação da constante de Stern-Volmer (K_{SV}^{app}) e da constante bimolecular aparente de desactivação de fluorescência (K_{q}^{app}) que permitem inferir da localização dos fármacos na matriz lípidica.

ABSTRACT

This dissertation describes the study of the effect of three non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), meloxicam, lornoxicam and nimesulide in the internal microviscosity of the cellular membranes.

The studies were carried out in liposomes and cellular systems which were used as membrane models.. The assays were performed in unilamellar liposomes prepared from egg yolk phosphatidylcholine (EPC), some containing 30% of cholesterol, that , were able to mimic the cellular membranes due to a similar composition and organization . The liposomes were obtained by the thin film hydration method and were further submitted to an extrusion process. The cellular systems used were the following: splenocytes extracted from mouse spleen; mouse macrophages and human monocytes, obtained from the culture of cellular lines J774 and HTP1, respectively; and human blood granulocytes and mononuclear cells.

The variation of the fluidity of the different membrane models was evaluated by fluorescence measurements of steady-state anisotropy. The monitoring of the structural alterations of the membrane was achieved using the fluorescent probe DPH. The analysis of the results obtained by this method, was performed taking into account the correction of the experimental values to prevent ambiguous interpretations.

In the current work, fluorescence quenching studies of the probe DPH were also performed in the presence of increasing concentrations of the studied NSAIDs using the same membrane models already described. The experimental data obtained led to the determination of both the Stern-Volmer constant (K_{SV}^{app}) and the apparent bimolecular constant of fluorescence quenching (K_{q}^{app}) from which was possible to infer the location of the drugs in the lípidic matrix.

OBJECTIVOS

O principal objectivo desta dissertação foi estudar os efeitos de fármacos anti-inflamatórios não-esteróides (AINEs), meloxicam, lornoxicam e nimesulide, na microviscosidade interna das membranas celulares. Este estudo permitiu a compreensão da capacidade destes fármacos em induzirem perturbações na estrutura membranar e assim conhecer o seu comportamento quer ao nível farmacológico/biológico, quer ao nível ambiental.

No estudo da fluidez membranar causada por estes AINEs foram utilizados diferentes modelos membranares com o objectivo de verificar a existência de possíveis diferenças nos resultados experimentais, que dependessem do tipo de membrana utilizada.

A metodologia analítica utilizada neste estudo foi a anisotropia de fluorescência que permitiu investigar os efeitos dos AINEs na fluidez da membrana depois de correcções apropriadas dos dados experimentais, para evitar interpretações ambíguas.

ORGANIZAÇÃO DA DISSERTAÇÃO

A presente dissertação encontra-se organizada em cinco capítulos: 1. Introdução geral; 2. Técnica analítica para o estudo da fluidez membranar; 3. Parte experimental; 4. Resultados e discussão e 5. Conclusões.

No capítulo 1 é efectuada uma abordagem geral dos AINEs e dos sistemas membranares estudados, bem como das interacções dos fármacos com as membranas celulares. Em relação aos AINEs, são referidas as suas características gerais, a sua classificação e o seu papel no processo inflamatório. Também é apresentada uma breve caracterização dos AINEs estudados neste trabalho, meloxicam, lornoxicam e nimesulide. Neste capítulo são ainda descritos os dois tipos de modelos utilizados, os lipossomas e células biológicas. Apresenta-se a classificação, a caracterização e a descrição do método de preparação de lipossomas. Para as células são descritas as suas principais características e funções.

No capítulo 2 apresentam-se as metodologias analíticas utilizadas para o estudo da fluidez membranar, que foram a desactivação de fluorescência e anisotropia de estado estacionário. Para a desactivação da fluorescência, é feita uma breve introdução sobre princípios de fluorimetria, seguida da descrição do modelo teórico para a desactivação da fluorescência e de uma breve apresentação da sonda de fluorescência utilizada neste trabalho, a DPH. A anisitropia de estado estacionário inclui uma breve introdução, que descreve a técnica e a sua utilização em modelos membranares, seguida da descrição do princípio da mesma.

No capítulo 3 são descritos os reagentes e equipamentos utilizados ao longo de todo o trabalho, a preparação das soluções dos AINEs e dos lipossomas. São apresentadas as técnicas utilizadas na cultura e isolamento de células bem como a verificação da viabilidade celular. Ainda neste capítulo, são incluídas a preparação da amostras utilizadas nos ensaios das interacções fármaco-membrana e as condições experimentais para o estudo da fluidez membranar.

No capítulo 4 são apresentados o conjunto de resultados obtidos no estudo de anisotropia de estado estacionário e a partir destes, é feita a discussão da influência de cada AINE na fluidez dos diferentes sistemas membranares estudados. Com base

nos resultados experimentais são apresentados os valores de K_{SV}^{app}, de K_{q}^{app} e de IC_{50} para cada um dos fármacos em todos os sistemas membranares utilizados.

Finalmente, o capítulo 5 é destinado à apresentação das principais conclusões do estudo apresentado nesta dissertação e referenciados possíveis estudos que na sua sequência poderão vir a ser realizados.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO GERAL

1.1. Interacção fármaco/membrana e sua importância

Os fármacos são substâncias de origem natural ou sintética que apresentam variadas actividades biológicas. A determinação de parâmetros físico-químicos destas substâncias bioactivas é extremamente importante de forma a conhecer o seu comportamento quer a nível farmacológico/biológico, quer a nível ambiental. Em termos farmacológicos a determinação de parâmetros físico-químicos dos fármacos tem

a maior importância por apresentar variadas actividades biológicas, conduzir à avaliação da biodisponibilidade, estudar a relação estrutura-actividade e assim contribuir para o planeamento racional de novos fármacos ou novas aplicações dos existentes. Em termos ambientais, os fármacos podem ser abordados quanto ao impacto ambiental proveniente da sua utilização, ou ainda quanto à sua interacção com a primeira barreira encontrada por estes nos organismos – a membrana celular.

O impacte ambiental de fármacos tem originado uma crescente preocupação, dado que estas substâncias são introduzidas no meio ambiente aquando da sua excreção pelo organismo ou como resultado de processos de síntese [Daughton e Jones-Lepp, 2001]. Consequentemente, estas substâncias encontram-se com frequência no meio ambiente, em cursos de água e nos solos, de onde são transferidas para as cadeias tróficas e submetidas um processo de bioacumulação. Fármacos antibióticos e estrogénicos são particularmente preocupantes pelos efeitos que podem causar, no entanto, é importante conhecer e prever qual o comportamento ambiental de qualquer substância com actividade farmacológica.

Por outro lado um dos factores mais importantes no estudo do mecanismo de acção de um determinado fármaco é a avaliação da interacção dos fármacos com as membranas biológicas, dado que, durante o trajecto de uma substância activa desde o seu local de absorção até aos locais onde a sua acção é exercida, é inevitável a passagem de várias barreiras lipídicas que constituem as membranas celulares [Ferreira et al., 2005 b)]. As ligações ou interacções dos fármacos com os componentes da membrana celular podem ser responsáveis pela sua acção tóxica ou podem também explicar o seu modo de acção, uma vez que o fármaco pode actuar a nível membranar ou apenas passar através das membranas para atingir o alvo intracelular.

O conhecimento exaustivo da interacção dos fármacos com as membranas lipídicas é fundamental para a compreensão dos parâmetros de distribuição dessas moléculas no organismo, bem como para o estabelecimento das relações entre as suas propriedades físico-químicas e parâmetros farmacológicos. Estas relações são importantes no estudo e desenho de novos compostos com maior eficácia terapêutica e com menos efeitos secundários.

As interacções dos fármacos com as membranas celulares dependem das propriedades das próprias membranas, determinadas pela sua composição, das

propriedades físico-químicas e estrutura química dos fármacos. Assim, a interacção de um fármaco com a membrana depende da sua lipofilia, pois esta condiciona a sua localização. Na figura 1 estão representadas as possíveis localizações de um fármaco na membrana.

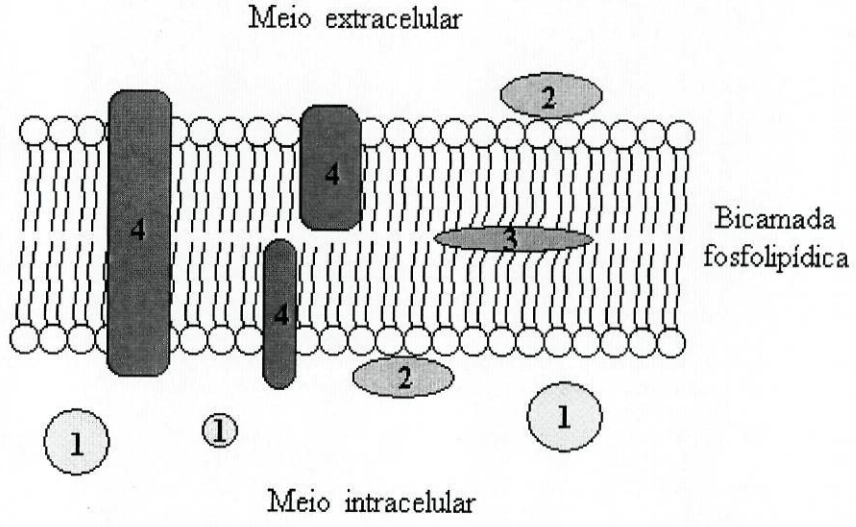


Figura 1. Esquema das possíveis localizações de fármacos ou outros compostos na membrana celular. 1-Compostos hidrossolúveis que não estabelecem ligações com a membrana; 2-Compostos hidrossolúveis com estabelecimento de ligações electrostáticas ou iónicas com a membrana; 3-Compostos com carácter hidrofóbico; 4-Compostos anfipáticos [Matos, 2001].

As metodologias utilizadas na avaliação das interacções dos fármacos com a membrana baseiam-se na avaliação da alteração das propriedades físico-químicas do fármaco, da própria membrana ou de uma sonda exógena. Estas metodologias permitem, entre outros estudos, a localização do fármaco na matriz lípidica, a avaliação do coeficiente de partilha do fármaco, bem como a avaliação do efeito da presença do fármaco na fluidez da membrana.

1.2. Sistemas usados como modelos membranares

Um dos aspectos estruturais mais importantes da organização biológica é a presença de uma membrana delimitadora, de tal modo importante que as próprias

células, unidades básicas da vida são definidas física e funcionalmente por uma membrana celular [Ferreira et al., 2005 b)].

Uma das principais funções das membranas é a formação de uma barreira contínua em torno da célula capaz de delimitar compartimentos intra e extracelulares; criar gradientes químicos e eléctricos e de regular o transporte de solutos, protegendo-a de condições adversas e da instabilidade do ambiente que a rodeia [Houslay e Stanley, 1982]. Assim, durante o trajecto de uma substância activa desde o seu local de absorção até aos locais onde a sua acção é exercida, é inevitável a passagem pelas membranas celulares, estruturalmente constituídas por uma bicamada de fosfolipídos onde se encontram incluídas proteínas, glícidos ligados covalentemente às proteínas (glicoproteínas) e a lipídos (glicolipídos), esteróis e água. Os fármacos ao encontrarem as membranas celulares podem estabelecer com estas interacções ou ligações com os componentes lipídicos da membrana. Estas ligações, ou interacções podem ser responsáveis pela acção tóxica do fármaco ou podem igualmente explicar o seu modo de acção uma vez que os fármacos podem atravessar as membranas para atingir um alvo intracelular ou actuar a nível membranar [Ferreira et al., 2005 b)]. Da interacção do fármaco com a membrana pode ainda resultar uma alteração das propriedades físico-químicas da própria membrana.

A complexidade, a heterogeneidade, o número e a diversidade de factores envolvidos nos fenómenos que ocorrem na membrana celular, faz com que os estudos físico-químicos nem sempre possam ser realizados *in vivo*. Assim, e numa primeira fase, podem ser utilizados sistemas *in vitro*, muito simples, que simulem pequenas partes destes sistemas complexos e que propiciem um maior controlo sobre os componentes que podem influenciar estes sistemas. Numa fase seguinte, e se possível, podem utilizar-se sistemas biológicos para poder estabelecer comparações dos resultados obtidos e avaliar a capacidade do sistema *in vitro* como um sistema capaz de mimetizar as membranas *in vivo*.

1.2.1. Lipossomas

1.2.1.1. Introdução

O conhecimento químico das estruturas das membranas celulares têm permitido de uma forma progressiva desenvolver modelos cada vez mais adequados às funções de mimetização dos processos mediados pelas membranas celulares. Dos diversos modelos de biomembranas desenvolvidos, os lipossomas e as micelas são as estruturas que se mostram ser mais adequadas e que melhor ilustram a interacção dos fármacos com as biomembranas [Ferreira et al., 2005 b)]. Dos diversos modelos de biomembranas existentes, os lipossomas foram os seleccionados para os estudos realizados neste trabalho, dado que, estes micro-agregados apresentam um ambiente químico e anisotrópico semelhante ao observado nas membranas biológicas. Para além disto, são modelos de fácil preparação e manuseamento, que apresentam a possibilidade de caracterização e controlo das suas propriedades físico-químicas.

O primeiro grande avanço na descoberta dos lipossomas deu-se em 1965, com a publicação por Alec Banghami e seus colaboradores, de um dos seus trabalhos de investigação acerca da difusão de iões através de membranas lipídicas artificiais. Nesse trabalho foi feita a caracterização de um sistema de vesículas fosfolipídicas ao qual, três anos mais tarde, seria dado o nome de lipossomas [Santos e Castanho, 2002].

Após a descoberta dos lipossomas por Banghami, estes impuseram-se como o modelo mais simples para o estudo das membranas biológicas, sendo utilizados em várias áreas, tais como: investigação e indústria farmacêutica, aplicações bioquímicas e na área ambiental.

1.2.1.2. Definição e caracterização

Os fosfolipídos são lipídos anfipáticos, também denominados anfifílicos. Estes lipídos são caracterizados por um grupo hidrófilico ligado a duas cadeias hidrofóbicas, apresentando assim uma estrutura com duas cadeias de hidrocarbonetos, a qual se denomina cauda hidrofóbica ou não-polar ligadas ao grupo hidrofílico, também denominado de cabeça polar (Figura 2).

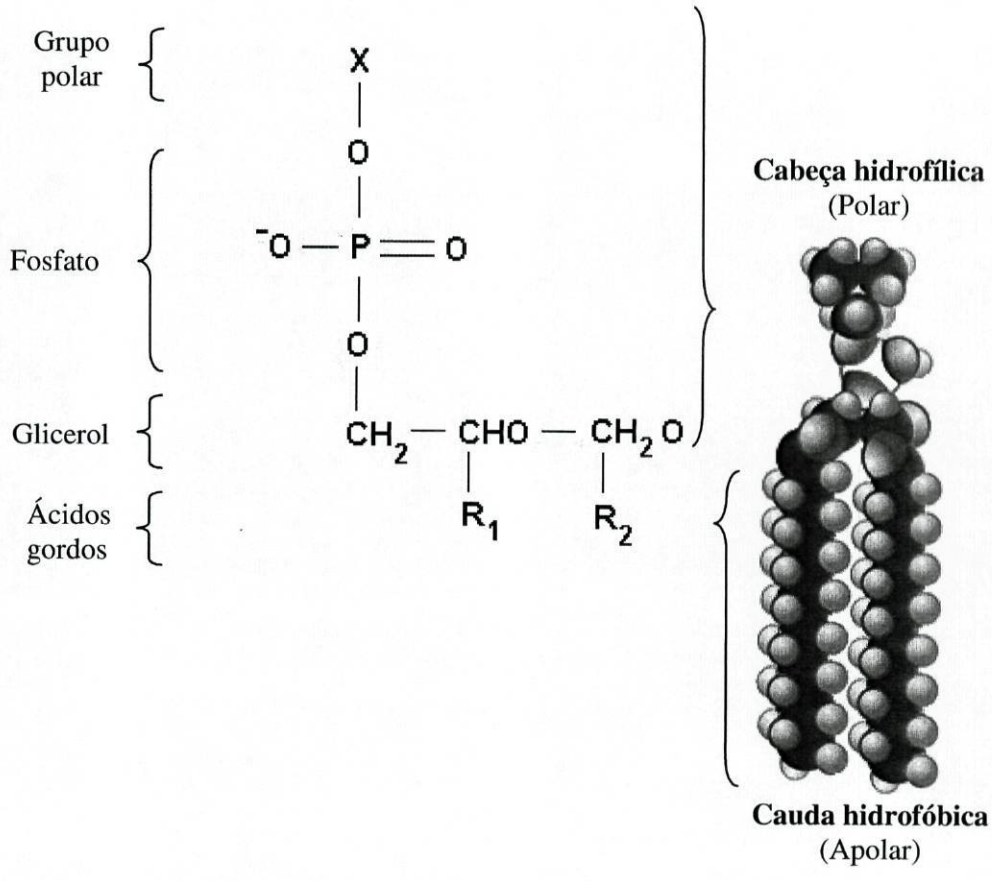


Figura 2. Estrutura química de uma molécula de fosfolipído.

As moléculas de fosfolipídos, apresentam normalmente uma cadeia carbonada mais longa e/ou mais insaturada na posição 2 do esqueleto glicerol (Figura 2), enquanto que a outra ocupa a posição 1 [Lasic, 1993].

Quando colocados em solução aquosa, os fosfolipídos por apresentarem duas cadeias carbonadas não se agregarem em micelas, possuem a capacidade de, espontaneamente, formar agregados em bicamada lipídica (Figura 3). Para reduzir a exposição das faces laterais hidrofóbicas à água, as bicamadas dobram-se sobre si próprias formando estruturas esféricas fechadas designadas de vesículas. Durante a sua formação, as vesículas armazenam no seu interior parte da solução aquosa na qual estão suspensas (Figura 3). Estas vesículas compostas por fosfolipídos são usualmente denominadas de lipossomas [Lasic, 1993].

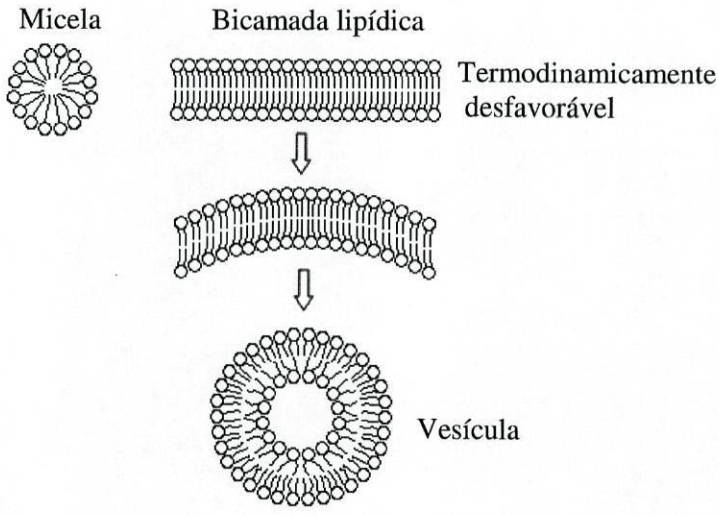


Figura 3. Representação de uma micela e de um lipossoma. Formação de vesículas por auto-agregação de moléculas anfifílicas em água.

Os fosfolipídos são os lípidos mais abundantes na membrana celular e portanto os mais utilizados na preparação de lipossomas para as mais variadas aplicações. Nomeadamente no campo dos modelos membranares é ideal o uso de lipossomas constituídos por lipídos naturais, os quais estão também presentes nas membranas biológicas, são relativamente inertes quimicamente e podem ser obtidos a uma baixo custo [Matos, 2001]. Os fosfolipídos que contêm colina denominam-se de fosfatidilcolinas e geralmente são designados de lecitinas (Figura 4). A lecitina extraída da gema de ovo ou da soja, é uma mistura de vários fosfolipídos, com cadeias carbonadas de diversos comprimentos e diferentes graus de insaturação. O ácido gordo mais abundante na lecitina é o ácido palmítico (35,3%) [New, 1990]. As lecitinas são moléculas zwitteriónicas a pH fisiológico, pois o grupo amónio quaternário apresenta carga positiva e o grupo fosfato está desprotonado a esse valor de pH [Lasic, 1993].

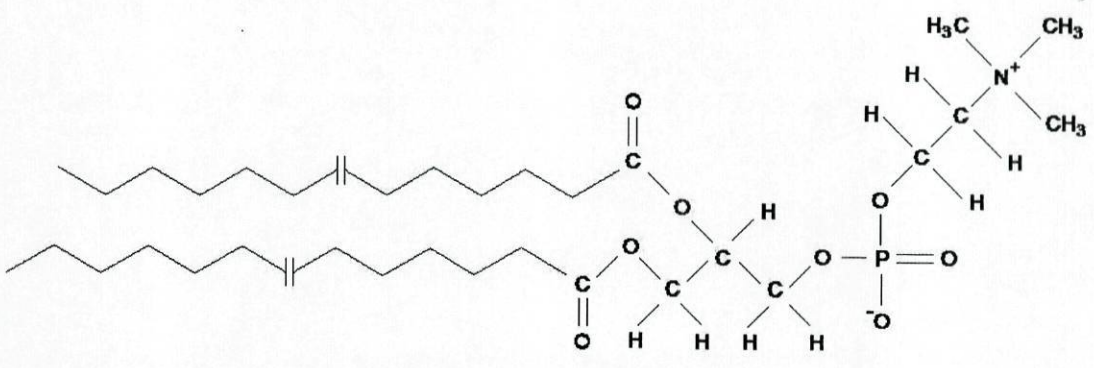


Figura 4. Estrutura química da fosfatidilcolina ou lecitina (EPC).

Os lipossomas apresentam várias propriedades físicas que dependem do grau de saturação dos fosfolipídos que os constituem, tais como a estabilidade, actividade osmótica, fluidez e temperatura de transição de fase [Marcelino, 2005].

A propriedade física mais importante nos lipossomas e implicitamente das bicamadas lipídicas que os formam, é a existência de uma temperatura de transição de fase, T_m, que corresponde à temperatura mínima requerida para que ocorra uma reorganização estrutural nas bicamadas fosfolipídicas, ou seja, que as bicamadas passem do estado de gel-sólido ao estado de cristal-líquido (Figura 5) [Jones e Chapman, 1995]. Após a formação da estrutura, a temperatura pode descer abaixo da T_m sem ocorrer a destruição das vesículas formadas. À lecitina de origem natural não se pode atribuir uma temperatura de transição de fase definida, devido á sua composição heterogénea. Enquanto que certos autores simplesmente não lhe atribuem uma transição de fase [Lasic, 1993] outros indicam uma T_m de -15°C a -7°C [New, 1990].

As bicamadas lipídicas que constituem os lipossomas podem assim apresentar dois estados termodinamicamente diferentes, que dependem de se encontrarem a uma temperatura inferior ou superior à T_m. Deste modo, as bicamadas lipídicas podem apresentar-se numa fase de grande ordenação, quando se encontram a uma temperatura inferior a T_m, designada do estado de gel-sólido e para temperaturas superiores à temperatura de transição de fase, numa fase mais fluida denominada de cristal-líquido (Figura 5) [Lasic, 1993; New, 1990].

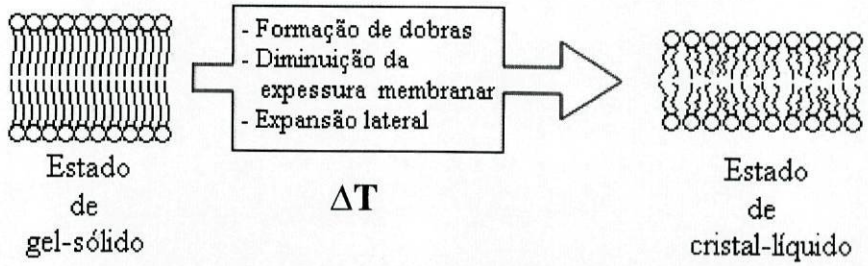


Figura 5. Representação esquemática da organização estrutural apresentada pelas bicamadas fosfolipídicas no estado de gel-sólido e no de cristal-líquido.

Nos dois diferentes estados termodinamicamente possíveis, as bicamadas fosfolipídicas apresentam as seguintes características:

- Estado de gel-sólido: os fosfolipídos constituintes da bicamada apresentam uma estrutura ordenada, em que as cadeias hidrocarbonadas se encontram numa conformação distendida e firmemente empacotadas, o que permite acomodar as "caudas" hidrofóbicas num volume mínimo, tornando a liberdade de movimentos muito restrita [Lasic, 1993; New, 1990].
- Estado de cristal-líquido: a mobilidade dos fosfolipídos na membrana aumenta consideravelmente, o volume ocupado por cada molécula de fosfolipído aumenta, portanto o volume membranar aumenta ainda que a espessura da bicamada diminua [Lasic, 1993; New, 1990].

1.2.1.3. Classificação

Os lipossomas podem ser classificados conforme o tamanho, número de lamelas (e sua posição relativa), constituição lipídica, estabilidade e modo de preparação (Figura 6) [Santos e Castanho, 2002].

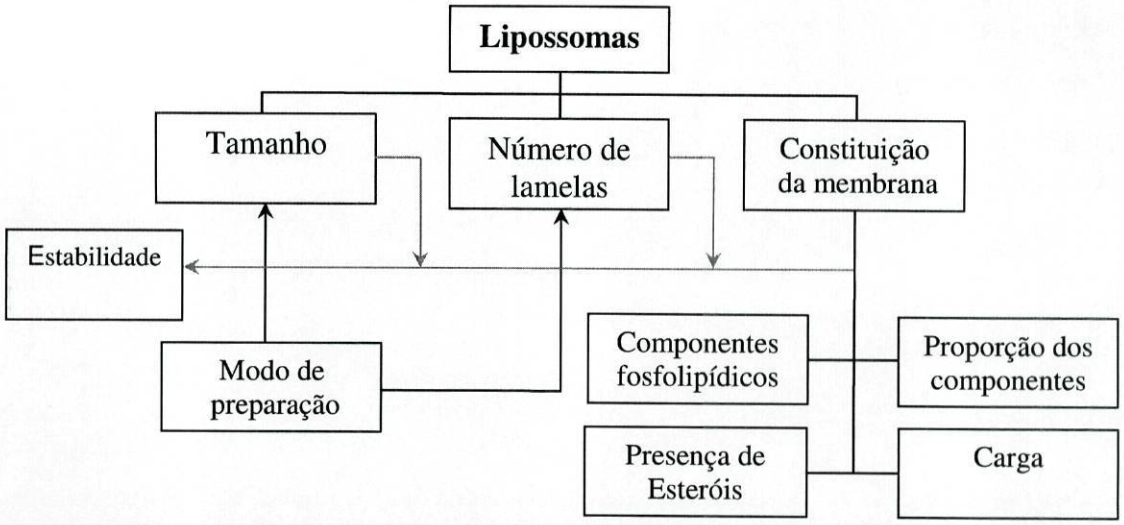


Figura 6. Esquema representativo dos diversos parâmetros que caracterizam os lipossomas [Santos e Castanho, 2002].

Durante muito tempo, a classificação estrutural dos vários tipos de lipossomas esteve rodeada de uma grande falta de uniformização e de coerência. A partir do início da década de 80 é que definitivamente foi adoptada uma nomenclatura para classificar os lipossomas. Assim, sem qualquer processamento adicional, a dispersão dos

fosfolipídos em água origina uma população polidispersa denominada de vesículas multilamelares grandes (MLVs), cujos tamanhos estão geralmente compreendidos entre 0,4 e 3,5μm e que como o nome indica são vesículas constituídas por várias (cerca de cinco ou mais) bicamadas lipídicas, aproximadamente concêntricas e entre as quais se dispõem uma fracção do meio aquoso interno. Os lipossomas formados por uma única bicamada são denominados vesículas unilamelares grandes (LUVs), se o seu tamanho for superior a 100nm. Os LUVs são os usados quando são necessários sistemas de interpretação mais simples e melhor definidos em termos estruturais. Para além dos MLVs e LUVs, há que considerar ainda as restantes vesículas apresentadas na figura 7 [Lasic, 1993].

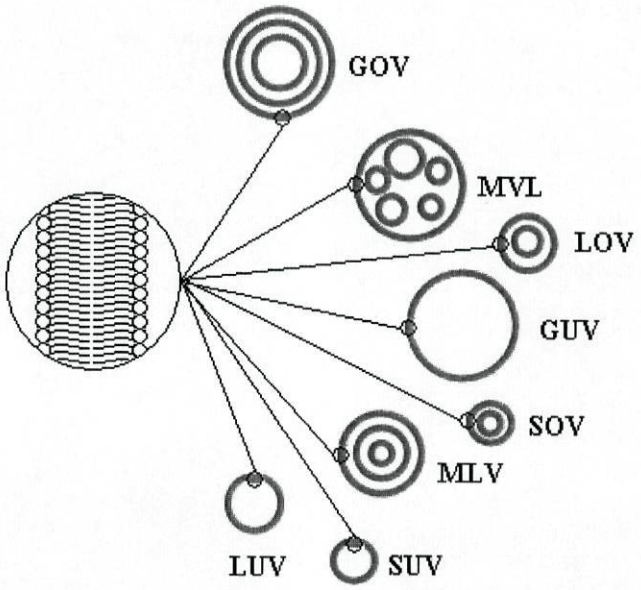


Figura 7. Representação esquemáticas de vesículas multilamelares gigantes (*gigant multilamellar vesicles*), GOVs; vesículas multilamelares grandes (*large multilamellar vesicles*), MLVs; vesículas oligolamelares grandes (*large oligolamellar vesicles*), LOVs; vesículas unilamelares gigantes (*gigant unilamellar vesicles*), GUVs; vesículas oligolamelares pequenas (*small oligolamellar vesicles*), SOVs; lipossomas multivesículares (*multivisicular liposomes*), MVLs; vesículas unilamelares pequenas (*small unilamellar vesicles*), SUVs e vesículas unilamelares grandes (*large unilamellar vesicles*), LUVs. [Gómez-Hens e Fernández-Romero, 2005].

Tal como a escolha de qualquer modelo lipídico requer adequação à aplicação que esse modelo terá, também a selecção do tipo de lipossomas a usar deverá ser criteriosa e dependerá dos objectivos do estudo a efectuar. Caso o objectivo seja o uso de lipossomas como transportadores de fármacos, um dos critérios a considerar na

escolha do tipo de lipossoma é o tipo de fármaco quanto ao meio em que é solúvel, ou seja, se é lipossolúvel, ou hidrossolúvel. No caso do objectivo ser o transporte de fármacos lipossolúveis, a incorporação destes fármacos ocorre essencialmente ao nível das cadeias hidrocarbonadas da bicamada, o que estará relacionado sobretudo com a concentração do lipído, não tanto, com o tamanho dos lipossomas usado. Neste caso os MLVs são perfeitamente adequados. No caso do objectivo ser o transporte de fármacos hidrossolúveis, a incorporação destes fármacos ocorre na superfície membranar, ao nível das "cabeças hidrofílicas" ou ao nível do compartimento aquoso dos lipossomas, pelo que a quantidade incorporada será proporcional ao volume da fase aquosa intra e extravesicular. Os LUVs serão então os mais indicados, pois apresentam uma elevada relação volume/superfície [New, 1990; Perkins et al., 1993].

Para muitas das aplicações dos lipossomas, tais como o seu uso como modelos membranares, torna-se importante a utilização de um sistema de interpretação mais simples e melhor definido em termos estruturais. Deste modo, em grande parte dos estudos, os lipossomas unilamelares são preferidos em favor dos MLVs. Os LUVs, dado que apresentam uma única membrana e um volume de solução aquosa razoavelmente grande no seu interior têm maior interesse prático. Por outro lado, os MLV são ideais por exemplo para o estudo por raios-X e RMN [Hope et al., 1986].

Para além do tamanho e número de lamelas, um outro factor essencial para a caracterização de um lipossoma prende-se com a constituição das bicamadas lipídicas. A composição fosfolipídica, a presença de esteróis, a proporção destes componentes e a inserção de outras moléculas nas bicamadas, como proteínas, vão condicionar vários parâmetros da membrana e do próprio lipossoma, nomeadamente a sua carga, estabilidade e curvatura da bicamada [Santos e Castanho, 2002].

1.2.1.4. Preparação dos lipossomas

Os lipossomas foram produzidos ao longo do tempo de várias maneiras, mas foi com um trabalho de Alec Banghami em 1965 que se puderam observar e reconhecer a importância das suas características e as potenciais aplicações dos lipossomas. O método utilizado por Banghami na produção dos lipossomas denomina-se de hidratação do filme lipídico (Figura 8) [Lasic, 1993].

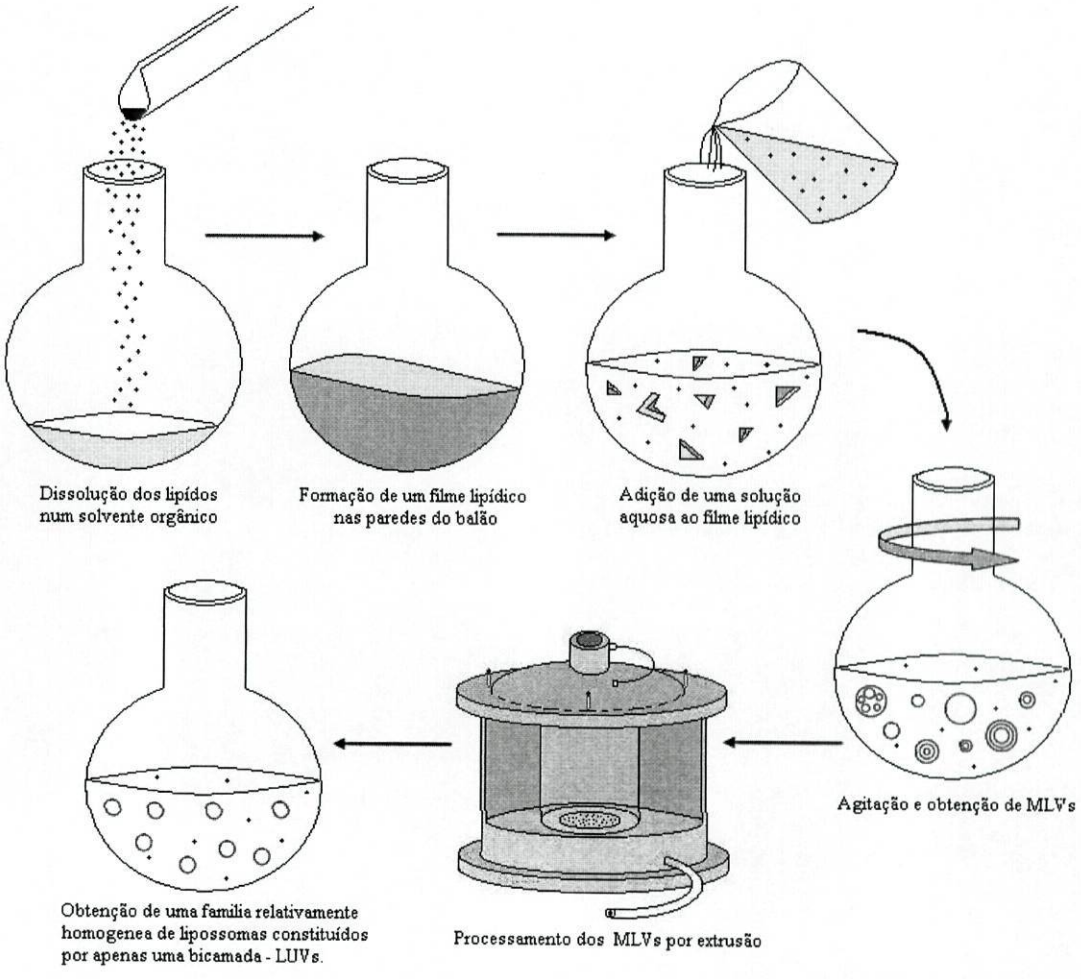


Figura 8. Representação esquemática da preparação de LUVs, por hidratação de um filme lipídico.

Este método pode ser dividido em três fases consecutivas: deposição de uma fina e homogénea camada lipídica nas paredes de um balão de vidro por dissolução do lipído num solvente orgânico e evaporação à secura; hidratação do filme lipídico com uma solução aquosa com formação espontânea de bicamadas e consequentemente vesículas; e finalmente, para a maioria dos sistemas um processamento secundário (por exemplo a extrusão) [Lasic, 1993]. O processo de extrusão é baseado na passagem forçada dos MLVs através de filtros, que apresentam poros de diâmetro definido, sob elevadas pressões de um gás inerte. Estes filtros são feitos de membranas de policarbonato com diâmetros entre 10 e 142 mm e apresentam poros entre os 30 nm e vários μm. A repetição da extrusão tende a diminuir o número de lamelas e após aproximadamente 10 extrusões, os lipossomas apresentam-se predominantemente homogéneos e unilamelares.

O seu diâmetro final vai depender do tamanho do poro utilizado e das características do próprio lipído, mas em geral não se conseguem diâmetros inferiores a 50-60 nm.

O processo de hidratação do filme lipídico pode, no entanto, sofrer algumas variações, nomeadamente quanto ao solvente orgânico utilizado, à forma de secagem do lipído a aos parâmetros de agitação, como o tempo e/ou a intensidade, o modo e a temperatura de agitação [Lasic, 1993]. Contudo, conduzem sempre à formação de vesículas multilamelares muito heterogéneas no que respeita ao tamanho, forma e número de bicamadas lipídicas, com uma pequena percentagem de LUVs e SUVs.

1.2.1.5. Preparação de lipossomas com colesterol

A utilização dos lipossomas visa a simulação dos sistemas naturais portanto as vesículas devem ser, por um lado, o mais semelhantes possível à membrana celular biológica e, por outro, devem possuir características bem definidas com vista à compreensão do impacto de cada factor nas propriedades da membrana. Tendo em conta estes dois requisitos e numa possível forma de aproximar as semelhanças entre lipossomas e membranas biológicas pode ser introduzido nas vesículas, o colesterol, dado que este é um dos seus constituintes.

Nas membranas da maioria das células eucarióticas, o colesterol é, a seguir aos fosfolipídos, a molécula lipídica que se apresenta em maior abundância. Em particular nas membranas de células que estão sujeitas a alterações da sua forma, a presença de moléculas de colesterol é essencial para que não ocorram rupturas na bicamada fosfolipídica. A sua presença reforça a impermeabilidade da bicamada à água, diminui a fluidez da membrana e também a temperatura a que se regista a temperatura de transição de fase [Berg et al., 2002]. No caso das células animais, o colesterol é o principal regulador da fluidez da membrana. A molécula de colesterol (Figura 9) insere-se nas bicamadas fosfolipídicas e o seu grupo hidroxilo forma pontes de hidrogénio com um átomo de oxigénio do grupo carbonilo da "cabeça" do fosfolipído, enquanto que a sua cadeia hidrocarbonada se insere na zona apolar da bicamada [Campos, 2002].

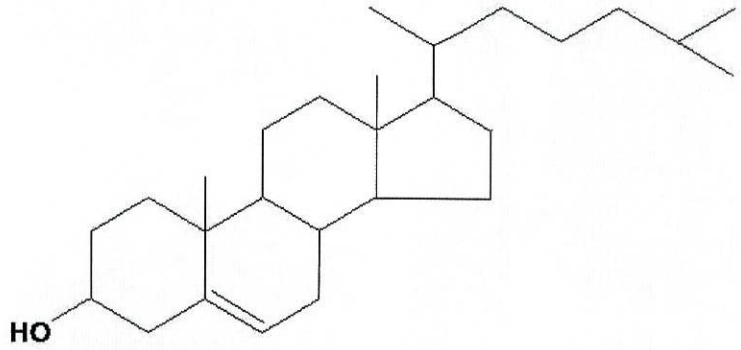


Figura 9. Representação da molécula de colesterol.

1.2.2. Células

1.2.2.1. Introdução

As células representam a unidade estrutural e funcional de todos os seres vivos. Cada célula possui uma organização molecular que lhe permite crescer, reproduzir-se e adaptar-se ao meio exterior. Os organismos crescem e multiplicam-se à custa do crescimento e divisão das células que os constituem. No entanto as células também podem viver e multiplicarem-se isoladas do resto do organismo de onde foram retiradas [Azevedo, 1999].

Em termos de tamanho, as células podem ser pequenas bactérias com cerca de 0,5μm de diâmetro, ou significativamente maiores, com diâmetro de alguns centímetros. Nos organismos multicelulares animais, as células medem cerca de 10 a 30 μm [Azevedo, 1999].

Perante a diversidade de seres vivos existente, as células apresentam formas e tamanhos extremamente variados. No entanto todas as células possuem uma organização interna comum, baseada no princípio da compartimentação funcional, bem como uma membrana celular que as separa do meio exterior (e, nas células eucarióticas, alguns organelos do citoplasma). Em termos evolutivos o aparecimento da membrana foi extremamente importante, para a formação da primeira célula dada a necessidade de isolamento de proteínas e ácidos nucleicos do meio exterior. Com base nas propriedades dinâmicas das proteínas nas membranas celulares, S. Jonathan Singer e Garth Nicolson propuseram o conceito de um "modelo em mosaico fluido" para a organização global

das membranas biológicas, em 1972 (Figura 10) [Berg et al., 2002]. A essência deste modelo é que as membranas são soluções bidimensionais de lipídos orientados e de proteínas globulares, tendo a bicamada lipídica um duplo papel, de barreira e de solvente para proteínas [Singer e Nicloson, 1972]. O modelo do mosaico-fluido é uma simplificação da descrição da membrana celular, que não é completamente correcta, pois apresenta as membranas biológicas como um fluido de fosfolipídos no qual as proteínas flutuam, o que pressupõem a existência de uma membrana integral e permanentemente fluida. Contudo, estudos físico-químicos das membranas biológicas têm apontado para existência de restrições aos movimentos lipídicos e proteicos, as quais se demonstram essenciais para a actividade proteica. Assim sendo a estrutura das biomembranas deverá ser considerada como uma bicamada lipídica organizada de modo termodinamicamente estável devido ao efeito hidrofóbico, com proteínas integrais e periféricas e com zonas de fluidez variável [Houslay e Stanley,1982].

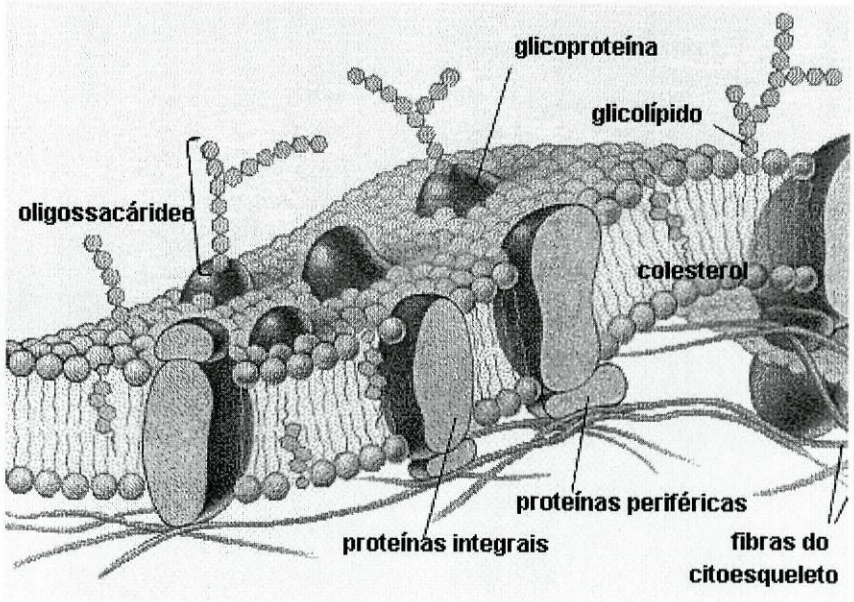


Figura 10. Esquema da membrana celular.

As membranas biológicas nos seres eucarióticos são constituídas, cerca de 90%, por uma parte lipídica, em dupla camada, com as "cabeças" polares dos lipídos em contacto com a solução aquosa, no interior e no exterior da célula e as cadeias não polares (hidrocarbonadas) a formarem o interior da membrana. As proteínas das membranas podem ser periféricas, quando se encontram dispostas à superfície da membrana ou integradas, quando atravessam a dupla camada lipídica. Além de

fosfolipídos e de proteínas, a membrana celular também apresenta esteróis (como por exemplo o colesterol), glicolipídos, glicoproteínas e oligossacarideos. Se existissem apenas as bicamadas de fosfolipídos nas membranas celulares, estas tornar-se-iam muito frágeis e facilmente se romperiam. Por esta razão as células desenvolveram os seus próprios mecanismos de protecção como se verifica com a presença de esteróis (colesterol no caso dos mamíferos).

As membranas das células eucarióticas, para além de isolarem a célula do meio exterior e delimitarem compartimentos intracelulares, desempenham três importantes funções: regulam o transporte de compostos; têm a elas ligadas algumas enzimas, pelo que decorre nelas parte da catálise enzimática; efectuam a comunicação intercelular e sinalização [Campos, 2002].

1.2.2.2. Esplenócitos de ratinho

Os esplenócitos são as células que se encontram no baço. As células que constituem o baço são linfócitos B e T, plasmócitos (células originadas pela diferenciação de linfócitos B), macrófagos, monócitos e outros elementos do sangue (os eritrócitos são eliminados na recolha de esplenócitos como descrito em 3.4.). Assim os esplenócitos podem ser definidos como um conjunto de células constituído por: linfócitos B e T, plasmócitos, macrófagos e células polimorfonucleares (ou granulócitos) [Junqueira e Carneiro, 2004].

Linfócitos B e T – Todos os linfócitos têm origem na medula óssea, no entanto os linfócitos T completam a sua maturação no timo, enquanto que os linfócitos B já saem da medula "maduros". Transportados pelo sangue e pela linfa, os linfócitos migram para os órgãos linfáticos periféricos, um dos quais o baço, onde proliferam e completam a sua diferenciação. Ambos os linfócitos fazem parte do sistema imunitário. Os linfócitos T participam da resposta imunitária celular, são células que reagem e podem matar outras que exibam à sua superfície moléculas estranhas (péptidos bacterianos e cancerígenos) e células infectadas por vírus. Por outro lado, os linfócitos B participam da imunidade humoral, sendo os plasmócitos (células originadas a partir dos linfócitos B) os responsáveis pela produção de anticorpos, que são glicoproteínas que podem neutralizam moléculas estranhas ao organismo [Junqueira e Carneiro, 2004].

Macrófagos e granulócitos – Descritos em 1.2.2.3.i.i. e 1.2.2.4.i. respectivamente.

1.2.2.3. Linhas celulares

Um dos principais métodos para o estudo das células vivas é a utilização de culturas celulares. Podem distinguir-se três tipos fundamentais de culturas: primárias, secundárias e linhas celulares estabelecidas. As culturas primárias são as que se obtêm directamente dos tecidos animais e vegetais. O órgão é removido, cortado em pequenos fragmentos e tratado com tripsina. Esta enzima tem a propriedade de dissociar agregados celulares em suspensões de células isoladas, sem afectar a viabilidade. As células são colocadas a crescer em meio de cultura apropriado. Esta cultura pode ser de novo tripsinizada e transferida para um novo meio, resultando numa cultura secundária [Freshney, 1986].

Outro tipo de cultura utiliza linhas celulares estabelecidas que se adaptaram a um crescimento prolongado *in vitro*, em seguimento de uma "transformação" cancerosa [Robertis e Robertis Jr., 1996]. As células normais de mamíferos não sobrevivem indefinidamente em cultura, e depois de cultivadas durante um tempo viável deixam de se dividir e, eventualmente, morrem. Ocasionalmente algumas células poderão sobreviver e iniciar uma cultura permanente. Estas linhas celulares diferem das células normais sob alguns aspectos: crescem mais intimamente associadas, tem necessidades mais baixas em soro e, de um modo geral, o número de cromossomas varia de célula para célula.

i. Monócitos humanos

Os monócitos têm diâmetro variável entre 9 e 12μm. O núcleo é ovóide, em forma de rim, sendo geralmente excêntrico. Estas células são originadas a partir de células precursoras da medula óssea que se dividem produzindo-os, os quais circulam no sangue. Posteriormente, estas células alojam-se nos tecidos conjuntivos, onde amadurecem e adquirem as características morfológicas de macrófagos [Azevedo, 1999].

Os monócitos humanos podem ser obtidos directamente do sangue ou da cultura de linhas celulares. A Global Bioresource Center (ATCC) comercializa a HTP-1 que corresponde a uma linha celular de monócitos humanos (*homo sapiens*) obtida a partir de células de uma leucemia monócitica aguda. A vantagem da utilização desta linha celular em relação aos monócitos obtidos a partir da recolha de sangue reside na facilidade de obtenção destas células em cultura, dado que cada uma delas tem a capacidade de se duplicar em aproximadamente 26 horas.

ii. Macrófagos de ratinho

Os macrófagos possuem características morfológicas muito variáveis que dependem da sua actividade e do tecido onde se encontram. Apresentam um diâmetro compreendido entre 10 e 30μm e normalmente possuem um núcleo oval posicionado excentricamente [Azevedo, 1999].

Como referido em 1.2.2.3.i. os macrófagos são células originadas a partir dos monócitos que circulam no sangue. Assim, os monócitos e os macrófagos são as mesmas células mas em diferentes estágios de maturação, sendo que as principais diferenças são o aumento do tamanho da célula e da sua capacidade de síntese proteica. Os macrófagos quando alojados nos tecidos dos vários órgãos tem a capacidade de proliferar localmente produzindo novas células.

As principais funções dos macrófagos são a fagocitose de partículas estranhas ao organismo e de células mortas, a apresentação de antigénios e a participação nos processos de defesa imunológica (mediada por células) contra infecções. Os macrófagos também são células secretoras produzindo várias substâncias que participam nos processos inflamatórios e de reparação dos tecidos [Junqueira e Carneiro, 2004].

Quando observados ao microscópio os macrófagos apresentam uma forma arredondada quando se trata de uma preparação a fresco e formas fusiforme e estrelada logo após a sua aderência ao suporte onde são mantidos durante a cultura celular.

Os macrófagos de ratinho podem ser obtidos directamente do animal ou da cultura de linhas celulares. Uma linha celular de macrófagos de ratinho é a J774, comercializada pela ATCC, que é obtida a partir de um sarcoma (cancro do tecido conjuntivo) do músculo de ratinhos Balb/cN.

1.2.2.4. Células do sangue

O sangue é um tecido composto por um conjunto de diferentes células suspensas num meio líquido, o plasma. Os elementos celulares do sangue em suspensão no plasma são: os eritrócitos ou hemácias, as plaquetas e diversos tipos de leucócitos. Estes últimos são classificados em dois grupos: os granulócitos ou células polimorfonucleares e os agranulócitos ou células mononucleares (Figura 11).

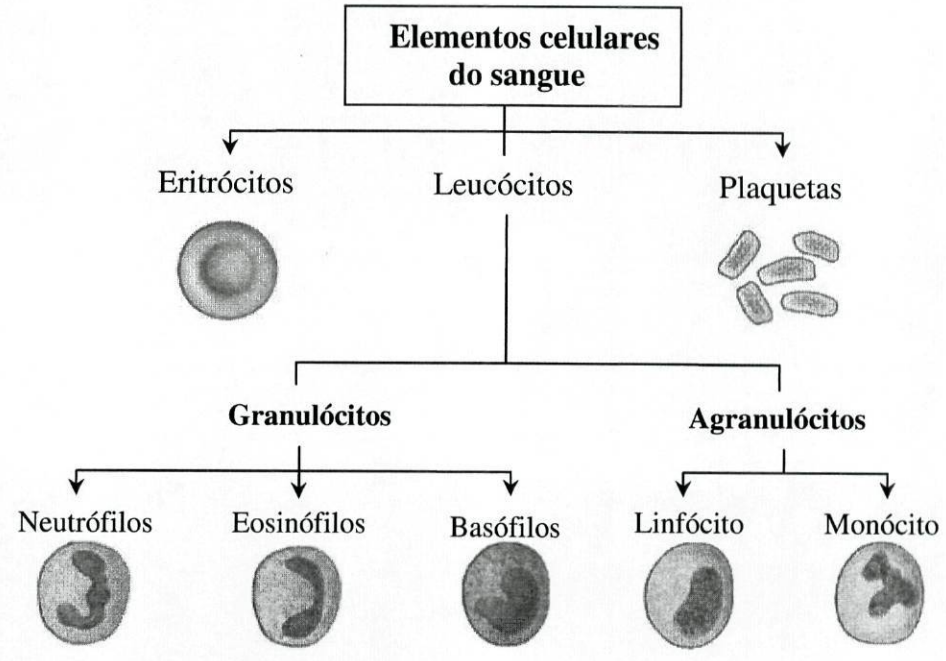


Figura 11. Componentes celulares do sangue.

Os granulócitos têm o núcleo de forma irregular e exibem no citoplasma grânulos. De acordo com o tipo de grânulos citoplasmáticos, distinguem-se três tipos de granulócitos: neutrófilos, eosinófilos e basófilos. O grânulo é específico quando apresenta características próprias (dimensões, forma e constituição) e está presente de modo constante num determinado tipo de leucócitos e nos seus precursores [Junqueira e Carneiro, 2004].

O núcleo dos agranulócitos tem forma mais regular e o citoplasma não possui granulações, podendo, porem apresentar grânulos inespecíficos, que também estão presentes em outros tipos de células. Existem dois tipos de agranulócitos: os linfócitos e os monócitos [Junqueira e Carneiro, 2004].

O sangue aspirado por punção venosa, tornado incoagulável pela adição de anticoagulantes (por exemplo heparina ou EDTA) e em seguida centrifugado num

gradiente de densidade, sedimenta em várias camadas de células que reflectem a sua heterogeneidade (Figura 12). Esta sedimentação ocorre porque as diferentes células têm densidades distintas e quando sujeitas à força da gravidade distribuem-se em diferentes camadas.

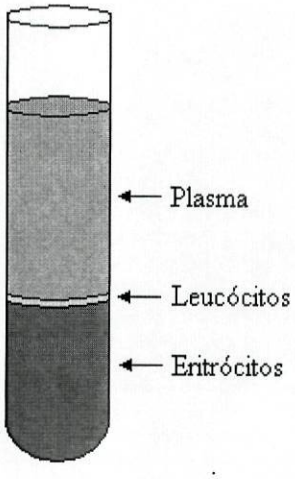


Figura 12. Representação de um tubo com sangue depois de ter sido sujeito à força centrifuga num gradiente de densidade. Os eritrócitos constituem cerca de 43% do volume sanguíneo. Entre os eritrócitos e o plasma existe uma fina camada constituída por leucócitos (cerca de 1% do volume de sangue).

O plasma corresponde ao sobrenadante translúcido, amarelado e viscoso. A camada inferior representa 42 a 47% do volume total de sangue e é formado pelos eritrócitos. A camada imediatamente superior tem cor acinzentada e representa camada de sedimentação dos leucócitos. Sobre os leucócitos ainda se encontra uma fina camada de plaquetas, mas que não é distinguível a olho nu.

O sangue é um meio de transporte. Dispersos no sangue, os leucócitos, dos quais alguns são fagocitários e representam uma das primeiras barreiras contra a infecção, percorrem todo o corpo e podem rapidamente concentrar-se em tecidos atingidos pela infecção. Mesmo em tecidos não infectados, a presença de leucócitos é muito frequente, pois estas células atravessam constantemente as paredes dos capilares (diapedese) e penetram os tecidos conjuntivos [Junqueira e Carneiro, 2004].

i. Granulócitos

Os granulócitos constituem cerca de 63% dos leucócitos humanos. Esta concentração corresponde praticamente à presença de neutrófilos, pois apenas 3% são eosinófilos e basófilos (2 a 3% de eosinófilos e cerca de 0,5% de basófilos).

Neutrófilos – Têm cerca de 12μm de diâmetro, um núcleo pouco volumoso e formado por dois a cinco lóbulos (frequentemente 3 lóbulos) ligados entre si por finas pontes de cromatina. O núcleo dos neutrófilos, bem como os de todos os granulócitos, mostra um padrão cromático semelhante, evidenciando massas densas de cromatina, distribuídas principalmente nas suas periferias, aplicadas contra a membrana nuclear.

Os neutrófilos são a primeira linha de defesa celular contra a invasão de microrganismos, sendo os fagócitos activados com partículas de pequenas dimensões. A partícula a ser fagocitada pelo neutrófilo é rodeada por pseudopodes que se fundem em torno dela. Assim, quando a partícula finalmente ocupa uma vacuolo (fagossoma), grânulos específicos fundem-se com os fagossomas. Neste processo há uma diminuição do número de grânulos no interior da célula e estes quando terminam levam à morte do neutrófilo.

Eosinófilos - Estas células têm cerca de 9μm de diâmetro, sendo portanto um pouco menores que os neutrófilos.

São células dotadas de movimento amebóide e capazes de fagocitar. Os eosinófilos fagocitam de modo mais lento, porém são mais selectivos no seu alvo do que os neutrófilos. Da mesma forma que o neutrófilo, apresenta também o fenómeno de fusão dos fagossomas com os seus grânulos. Um aumento do número absoluto de eosinófilos no sangue está associado a reacções alérgicas do organismo.

Basófilos – Medem cerca de 12μm de diâmetro e têm um núcleo volumoso, com forma retorcida e irregular.

Tal como os outros granulócitos, os basófilos são capazes de movimentação amebóide e de fagocitose, embora não sejam muito activos.

ii. Agranulócitos ou células mononucleares

As células mononucleares ou agranulócitos constituem cerca de 37% dos leucócitos humanos. Esta percentagem deve-se essencialmente à presença de linfócitos, cerca de 25 a 30%, e uma pequena parte de monócitos, de 3 a 10%.

Linfócitos – São células esféricas com diâmetro variável entre 6 e 8μm. Embora morfologicamente semelhantes, os linfócitos constituem uma população celular heterogénea, pois apresentam diferentes tamanhos e valores de densidade. Do ponto de vista funcional também se verificam diferenças nestas células. Alguns linfócitos B, ao encontrarem um antigénio transformam-se em plasmócitos, e sintetizam um anticorpo para aquele antigénio. Enquanto que os linfócitos T, para além de serem muito mais numerosos no sangue, são responsáveis pelas respostas imunológicas celulares. Alguns linfócitos também agem como células da memória imunológica. São linfócitos que entraram em contacto com a antigénio, mas não se difenciaram em plasmócitos e ao encontrarem novamente o mesmo antigénio, dividem-se várias vezes originando plasmócitos, que secretam anticorpos para o antigénio encontrado.

Monócitos – Descritos em 1.2.2.3.i..

1.3. Anti-inflamatórios não esteróides

1.3.1. Introdução

Os medicamentos anti-inflamatórios não esteróides (AINEs) são, actualmente, dos mais utilizados e difundidos na terapêutica, principalmente em doenças reumáticas. As suas principais acções farmacológicas situam-se a nível da atenuação de sintomas associados a reacções defensivas do organismo: dor, febre e inflamação. A sua utilização terá sido iniciada com a introdução dos salicilatos, nomeadamente o salicilato de sódio, em meados do século XIX [Brenol et al., 2000]. A aspirina foi introduzida em 1893, quando o químico alemão Félix Hoffman motivou a Bayer a produzir o ácido acetilsalicílico (patenteado como aspirina) [Carvalho et al., 2004].

Existem diversas classes químicas de anti-inflamatórios, que incluem os fármacos corticosteróides e os denominados anti-inflamatórios não esteróides, em que a principal diferença reside ao nível do modo de actuação no processo inflamatório. Os corticosteroídes reduzem a inflamação através da supressão das respostas imunológicas, ou seja, são agentes imunossupressores que actuam na sua maioria na fase de indução da resposta imunológica, reduzindo a proliferação dos linfócitos [Rang et al., 1999]. Por outro lado, os AINEs modificam a reacção inflamatória essencialmente através do seu mecanismo de acção inibidor da enzima ciclooxigenase (COX), ainda que outros mecanismos de acção, tais como a inibição das enzimas 5-Lipoxigenase (5-LO) e fosfólipase A_2 sejam atribuídos a estes fármacos [Rang et al., 1999].

Os AINEs são dos medicamentos mais utilizados no tratamento da artrite reumatóide, geralmente associados a fármacos corticosteróides e a analgésicos. A artrite reumatóide é uma doença inflamatória crónica que afecta aproximadamente 1% da população mundial, podendo causar incapacidade física e mortalidade precoce [Moreira, 2000]. Os AINEs também são usados para combater muitas outras situações clínicas, tais como: desordens músculo-esqueléticas agudas (tendinite, bursite), traumas e outras artropatias, como espondilose anquilosante, síndrome de Reiter, artrite psoriática e doenças enteropáticas [Esteves et al., 2001].

1.3.2. Classificação dos AINEs

Os AINEs constituem um grupo heterogéneo de compostos com elevada diversidade estrutural, no entanto compartilham as mesmas propriedades farmacológicas (efeitos terapêuticos e colaterais). Apesar da elevada diversidade estrutural, alguns AINEs apresentam semelhanças importantes nas suas estruturas químicas que permitem a sua classificação em famílias (Tabela I).

Tabela I. Classificação química dos anti-inflamatórios não esteróides, AINEs. A *itálico* está representado o AINE inibidor selectivo da enzima COX-1, a *sublinhado* estão representados os AINEs inibidores selectivos da enzima COX-2 e a *negrito* os estudados.

Classe química		**AINEs**
Ácidos carboxílicos	Ácidos salicìlicos e salicilatos	*Ácido acetilsalcílico*
		Salicilato de sódio
		Salicilato de metilo
		Diflunisal
		Flunfenizal
		Sufasalazina
	Ácidos propiónicos	Indoprofeno
		Ibuprofeno
		Naproxeno
		Flurbiprofeno
		Fenoprofeno
		Cetoprofeno
	Ácidos antranílicos	Ácido mefenâmico
		Ácido meclofenâmico
		Ácido flufenâmico
	Ácidos acéticos	Diclofenac
		Etodolac
		Tolmetina
		Indometacina
		Acemetacina
		Sulindac
Diaril substituídos	Furanonas	Rofecoxib
	Pirazóis	Celecoxib
Ácidos enólicos	Oxicamos	Tenoxicam
		Piroxicam
		Meloxicam
		Lornoxicam
	Pirazolonas	Fenilbutazona
		Dipirona
		Antipirina
		Azopropazona
		Sulfimpirazona
Sulfanilamidas		**Nimesulide**
Não ácidos		Nabumetona

Os membros de cada família química apresentam características idênticas (lipofilia e pka) e consequentemente semelhanças na irritação tópica da mucosa gástrica e na sua biodisponibilidade. No entanto também se verifica a existência de AINEs que diferem de membros da sua família química quanto aos aspectos referidos. Assim sendo, também pode ser utilizada uma outra classificação que tem em consideração a potência dos AINEs na inibição da enzima ciclooxigenase (COX).

A COX é uma das enzimas que participa no metabolismo do ácido araquidónico para formar mediadores químicos no processo de inflamação. Depois da descoberta desta enzima, foram ainda identificadas duas isoformas, a ciclooxigenase-1 (COX-1) e a ciclooxigenase-2 (COX-2). A COX-1 é uma enzima que existe no organismo e que tem funções de protecção gastrointestinal e de regulação fisiológica renal. Por outro lado, a COX-2 é uma enzima apenas induzível por estímulos inflamatórios e portanto, geralmente não é detectável nos tecidos saudáveis, estando envolvida apenas na inflamação, na febre e na dor. Assim, com a descoberta destas duas isoformas da enzima ciclooxigenese, uma nova perspectiva terapêutica emergiu com o desenvolvimento de fármacos mais selectivos da COX-2 e portanto detentores de menos efeitos adversos.

A potência de um AINE está relacionada com o seu IC_{50}, que é a concentração para a qual o AINE alcança 50% da máxima inibição da COX. Quanto menor o IC_{50}, mais potente é o fármaco. A selectividade para a COX-2 de determinado AINE pode ser dada por:

$$\frac{IC_{50}(COX \cdot 2)}{IC_{50}(COX \cdot 1)}$$

AINEs com valores muito menores que 1 (um) são considerados inibidores altamente selectivos da COX-2. Por outro lado, AINEs com razão muito maior que 1 (um) podem ser considerados selectivos para COX-1.

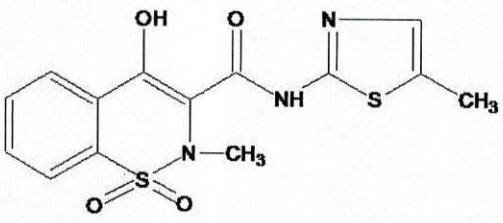
1.3.3. Descrição dos AINEs estudados

1.3.3.1. Meloxicam

O Meloxicam (nome comercial: Movalis®) é um AINE com acções anti-inflamatórias, analgésicas e antipiréticas e está indicado no tratamento da artrite reumatóide, artrite gotosa, osteoartrite, lesões musculares e traumáticas assim como em processos inflamatórios dos tecidos moles, vias aéreas e doenças ginecológicas [Engelhardt et al., 1996].

Este fármaco tem uma margem terapêutica superior à dos outros AINEs estudados nesta dissertação. *In vivo* inibe as prostaglandinas (mediador químico na reacção de inflamação) com uma potência maior no local da inflamação e não na mucosa gástrica, devido à sua maior selectividade para a enzima COX-2. Assim este fármaco tem demonstrado uma menor incidência de efeitos a nível gastrointestinal com a dose recomendada em comparação com as doses habituais de outros AINEs [Engelhardt et al., 1996].

O meloxicam (Figura 13) apresenta-se como um pó amarelo pálido, inodoro e pouco insolúvel em água. É um AINE, do grupo dos ácidos enólicos.



Meloxicam

Formula molecular: $C_{14}H_{13}N_3O_4S_2$

Peso molecular: 351,406

Ponto de fusão: 254°C

Solubilidade em água: Pouco solúvel

pKa: 1,1 e 4,2

Log P*: 2,47

Figura 13. Algumas propriedades físico-químicas e a fórmula química do Meloxicam [Engelhardt et al., 1996].

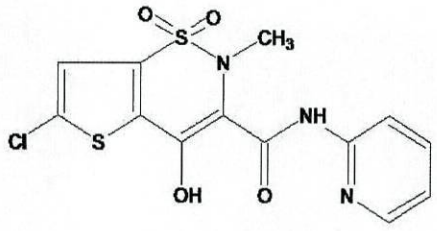
*Log P corresponde à constante de partição do composto em octanol e tampão aquoso (pH=7,4).

1.3.3.2. Lornoxicam

O lornoxicam (nome comercial: Acabel®) está indicado no tratamento de doentes com artrite reumatóide, espondilite anquilosante, osteoartrite, lombalgias crónicas, hérnias discais entre outros problemas ortopédicos [Bernatzky et al., 2005].

Este AINE não é selectivo e portanto provoca lesões ao nível do tracto gastrointestinal [Bernatzky et al., 2005].

O lornoxicam (Figura 14) é um anti-inflamatório não esteróide do grupo dos ácidos enólicos. Trata-se de um pó cristalino amarelo forte, inodoro e muito pouco solúvel em água [Kyrikou et al., 2004].



Lornoxicam

Formula molecular: $C_{13}H_{10}ClN_3O_4S_2$

Peso molecular: 371,824

Solubilidade em água: Pouco solúvel

pKa: 4,7

Log P*: 1,8

Figura 14. Algumas propriedades físico-químicas e a fórmula química do Lornoxicam [Kyrikou et al, 2004].

*Log P corresponde à constante de partição do composto em octanol e tampão aquoso (pH=7,4).

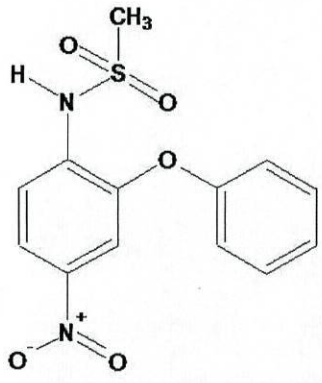
1.3.3.3. Nimesulide

O nimesulide (nomes comerciais: Aulin®, Donulide®, Nimed®, Vitolide® e Sulimed®) está indicado como anti-inflamatório, analgésico e antipirético nos tecidos moles, em lesões do sistema músculo-esquelético, em feridas e estados pós-operatórios e como auxiliar em patologias das vias respiratórias superiores [Tavares et al., 1995].

Este AINE é um potente inibidor da enzima COX, com selectividade para a COX-2 o que lhe confere menor acção lesiva na mucosa gástrica [Ferreira et al., 2003].

O nimesulide (Figura 15) é um anti-inflamatório não esteróide do grupo das sulfanilamidas e ao contrário dos outros dois AINEs aqui estudados não possui grupo

funcional ou hidroxilo. Apresenta-se como um pó amarelo pálido e cristalino e é praticamente insolúvel em água [Singh et al.,1999].



Nimesulide

Formula molecular: $C_{13}H_{12}N_2O_5S$

Peso molecular: 308,313

Solubilidade em água: Pouco solúvel

pKa: 6,56

Log P*: 2,60

Figura 15. Algumas propriedades físico-químicas e a fórmula química do Nimesulide [Singh et al.,1999].

* Log P corresponde à constante de partição do composto em octanol e tampão aquoso (pH=7,4).

1.3.4. Acção dos AINEs no processo inflamatório

A principal acção farmacológica dos AINEs situa-se a nível da atenuação de sintomas associados ao processo inflamatório.

A inflamação é uma resposta dos organismos vivos a uma agressão sofrida, que pode ser desencadeada por vários tipos de agentes agressores, como físicos (traumatismos, radiações ultravioleta), químicos (péptidos hormonais, aminas, lípidos, neurotransmissores), biológicos (microrganismos patogénicos) ou patológicos (hipertermia, reacções imunológicas). Sem a inflamação as infecções desenvolver-se-iam descontroladamente, as feridas não cicatrizariam e o processo destrutivo nos órgãos atacados seria permanente. Assim, a reacção inflamatória tem como objectivo final a reparação do dano tecidual, a eliminação do agente agressor e a destruição ou dispersão dos mediadores químicos produzidos durante o processo de inflamação.

O processo inflamatório é comum a vários tipos de tecidos e consiste num complexo conjunto de alterações celulares que envolve a activação de enzimas e a libertação de diversos mediadores químicos. Neste processo em que ocorre a activação da síntese de mediadores químicos pela enzima fosfolípase A_2, os AINEs podem encontrar duas fases de actuação como se pode observar na Figura 16 [Vane et al., 1996].

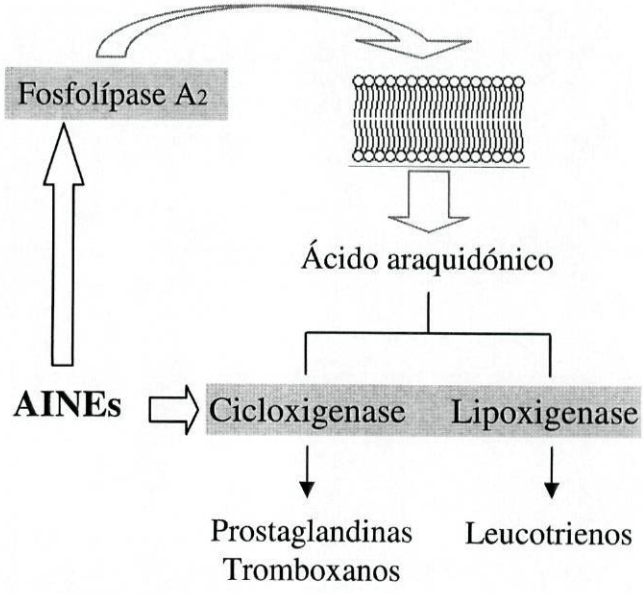


Figura 16. Esquema de activação da síntese de mediadores químicos pela enzima fosfólipase A_2. Duas possíveis fases de actuação dos AINEs.

A síntese de mediadores químicos (prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos) é activada, em resposta ao estímulo inflamatório, pela enzima fosfólipase A_2 que actuando sobre os fosfolipídos membranares, liberta o ácido araquidónico. Depois da sua libertação o ácido araquidónico sofre um complexo metabolismo no qual existem vários locais possíveis para a actuação dos AINEs até serem libertados os mediadores químicos resultantes deste metabolismo. Quando libertados, estes mediadores químicos condicionam o aparecimento das manifestações clínicas características da inflamação: dor, calor, rubor, edema e incapacidade funcional [Kumar et al., 2005].

CAPÍTULO 2

METODOLOGIA ANALÍTICA PARA O ESTUDO DA FLUIDEZ MEMBRANAR

2.1. Fluorimetria: Desactivação da fluorescência

2.1.1. Introdução

Muitos sistemas químicos podem ser excitados pela radiação electromagnética e reemitir ao mesmo ou a outro comprimento de onda. Estes sistemas denominam-se fotoluminescentes e podem ser fluorescentes ou fosforescentes. A fluorescência difere da fosforescência apenas no tipo de transferência de energia electrónica, que no primeiro método não envolve uma variação de spin electrónico, pelo que cessa quase

imediatamente ($t<10^{-5}s$), contrariamente ao que acontece nas emissões por fosforescência, que fazem com que a radiação perdure depois da excitação durante intervalos de tempo da ordem de alguns segundos. A radiação emitida pode situar-se na zona do visível, ultravioleta ou noutras gamas mais energéticas do espectro [Gonçalves, 2001].

Quando um fotão incide sobre uma molécula fluorescente, este é absorvido se a sua radiação corresponder à energia que a molécula absorve. Consequentemente a energia da molécula aumenta e observa-se uma transição electrónica para um nível energético superior. A absorção constitui um fenómeno altamente específico, e a radiação de determinada energia só pode ser absorvida por estruturas bem características [Willard et al., 1965].

A intensidade da radiação fluorescente permite determinar quantidades vestígiais de muitas espécies orgânicas e inorgânicas, tendo o método limites de detecção bastante baixos, na ordem dos ppb. Contudo esta técnica acaba por não ser muito aplicada porque só alguns sistemas emitem radiação fluorescente.

A desactivação dum estado electrónico excitado envolve frequentemente a interacção e transferência de energia entre as moléculas excitadas e as do solvente, ou outros solutos, por colisões ou acções a longa distância, processo a que se chama de desactivação (*quenching*) da fluorescência e que explica o efeito do solvente ou de espécies nele presentes na intensidade de fluorescência [Gonçalves, 2001].

A desactivação da fluorescência é um dos métodos que permite caracterizar a interacção fármaco/membrana. Esta técnica baseia-se nas propriedades fluorescentes de uma terceira molécula, a sonda, que é incorporada no sistema e que funciona como um fluoróforo extrínseco [Lacowicz, 1999].

A utilização de moléculas lipofílicas que apresentam uma elevada intensidade de fluorescência, permite que da interacção entre a sonda fluorescente (fluoróforo) e o soluto a analisar (fármaco) resulte a desactivação da fluorescência do fluoróforo. Por este motivo também se designa o soluto a analisar como desactivador [Lacowicz, 1999].

2.1.2. Modelo teórico para a desactivação da fluorescência

No processo de desactivação da fluorescência, o fluoróforo que se encontra no estado excitado pode ser desactivado devido ao contacto com uma determinada molécula da solução, o desactivador (Q).

A diminuição da intensidade de fluorescência, usualmente denominada de desactivação ou inibição, pode ocorrer por diferentes mecanismos explicados por dois modelos teóricos: desactivação dinâmica ou colisional, e desactivação estática.

Desactivação dinâmica ou colisional – A desactivação de fluorescência pode ocorrer por interacção colisional entre o fluoróforo e um agente de desactivação de fluorescência. Neste caso, a diminuição da fluorescência pode ser relacionada com a concentração do agente de inibição pela equação de Stern-Volmer:

$$\frac{I_0}{I} - 1 = K_D[Q] = \frac{\tau_0}{\tau} - 1 = K_q \tau_0 [Q] \qquad \textbf{Equação 1}$$

em que I_0 e I representam a intensidade de fluorescência do fluoróforo na ausência e na presença de desactivador, respectivamente. O tempo de vida no estado excitado do fluoróforo é representado por τ_0 na ausência do agente de desactivação e por τ na presença do mesmo. K_D é a constante de Stern-Volmer para a desactivação da fluorescência. A constante bimolecular de desactivação de fluorescência, K_q, reflecte quer a eficiência do processo, quer a acessibilidade do desactivador e geralmente, tem um valor aproximado de $1\times10^{10} Ms^{-1}$ para solventes isotrópicos. Valores menores podem ser resultado de uma protecção estérica do fluoróforo, enquanto que valores superiores reflectem a existência de ligações entre o fluoróforo e o desactivador [Santos et al., 1998; Lacowicz, 1999].

Desactivação estática – O mecanismo estático de inibição da fluorescência ocorre quando parte das moléculas de fluoróforo são rapidamente desactivadas por formação de um complexo não fluorescente entre o desactivador e o fluoróforo que se mantém mesmo após o regresso ao estado fundamental.

O processo de desactivação da fluorescência causada pela formação de um complexo não fluorescente, pode ser traduzido por uma equação do mesmo tipo da equação de desactivação dinâmica, sendo K_s a constante de formação do complexo e I e

I_0 a intensidade de fluorescência do fluoróforo na ausência e na presença de desactivador, respectivamente:

$$\frac{I_0}{I} - 1 = K_S[Q] \qquad \textbf{Equação 2}$$

A dependência de I_0/I com [Q] continua a ser linear, tal como o observado para a desactivação dinâmica.

A distinção entre estes dois fenómenos não é obvia, sendo o método mais seguro a determinação de tempos de semi-vida, pois enquanto que para a desactivação dinâmica $I_0/I=\tau_0/\tau$, para a estática $\tau_0/\tau = 1$. Esta distinção também pode ser obtida pela determinação da constante de desactivação (K_D ou K_S) a várias temperaturas. O aumento da temperatura origina uma diminuição da viscosidade do meio, que por sua vez aumenta a difusão das moléculas, aumentando a desactivação dinâmica. Por outro lado o aumento da temperatura diminui a estabilidade dos complexos, diminuindo a desactivação estática. Um outro método de distinção consiste na observação cuidada das bandas dos espectros de emissão e de excitação do fluoróforo com a adição de concentrações crescentes de fármaco. Se não forem verificados desvios das bandas e apenas se verificar redução da intensidade de fluorescência é um indicativo de que se trata de uma desactivação colisional.

Por vezes, a distinção entre os dois mecanismos não é conclusiva nem estritamente necessária, dado que a constante de Stern-Volmer é representada por K_{SV}, referindo-se à desactivação dinâmica (K_D) e estática (K_S).

Os modelos teóricos apresentados são aplicáveis em solventes homogéneos, contudo já existem diversos estudos que usam a técnica de desactivação de fluorescência aplicada a micelas, monocamadas, visiculas lipídicas, membranas naturais, células e proteínas. O fundamento para o método de desactivação da fluorescência em estruturas organizadas envolve um fluoróforo solubilizado no interior da estrutura, ou adsorvido à sua superfície, cuja fluorescência é desactivada na presença de um soluto distribuído entre a fase organizada e solvente. A velocidade e/ou extensão com que o desactivador penetra na estrutura, bem como a velocidade de difusão fluoróforo vão determinar a cinética do processo de desactivação [Lacowicz, 1999].

As relações que se aplicam às soluções homogéneas no modelo teórico de inibição dinâmica necessitam ser aplicadas com cuidado a um meio altamente anisotrópico como é o caso da membrana lipídica. Embora uma molécula relativamente pequena possa ter um comportamento semelhante ao que teria numa solução homogénea, quando inserida na bicamada, uma molécula maior, com uma orientação fixa, deve mover-se apenas transversalmente no plano da membrana.

Nesta técnica também se deve ter em conta que o desactivador pode absorver no comprimento de onda excitação. Assim, quando há um aumento da concentração do desactivador podem-se observar dois fenómenos [Coutinho e Prieto, 1993]:

- Aumento da fracção de luz excitada absorvida pelo desactivador;

- Aumento total da absorvância da sonda na amostra, o que provoca uma menor penetração da radiação de excitação dentro da solução e implica a diminuição da intensidade fluorescente detectada.

Assim, é necessário corrigir os valores da intensidade de fluorescência medida, multiplicando-os por um factor de correcção (C) dado pela seguinte equação:

$$C = \frac{A_t}{A_f}\left(\frac{1-10^{-A_f}}{1-10^{A_t}}\right) \qquad \textbf{Equação 3}$$

em que A_f e A_t representam as absorvâncias no comprimento de onda de excitação para o fluoróforo e para a solução total (contendo fluoróforo e desactivador), respectivamente.

Os processos de desactivação de fluorescência nem sempre são representados por uma relação linear entre (I_0/I) e $[Q]_m$, podendo observar-se desvios [Castanho et al., 1996, Lacowicz, 1999] estes desvios podem originar representações de Stern-Volmer. Dependendo da representação observada, os desvios apresentados podem ser designados de desvios positivos ou desvios negativos.

Desvios positivos – Ocorrem quando a extensão de desactivação da fluorescência é grande e podem ser explicados por problemas de difusão do desactivador e/ou do fluoróforo. Existem dois modelos alternativos ao descrito por Stern-Volmer e que podem ser aplicados quando se verifica este tipo de desvios (Figura 16).

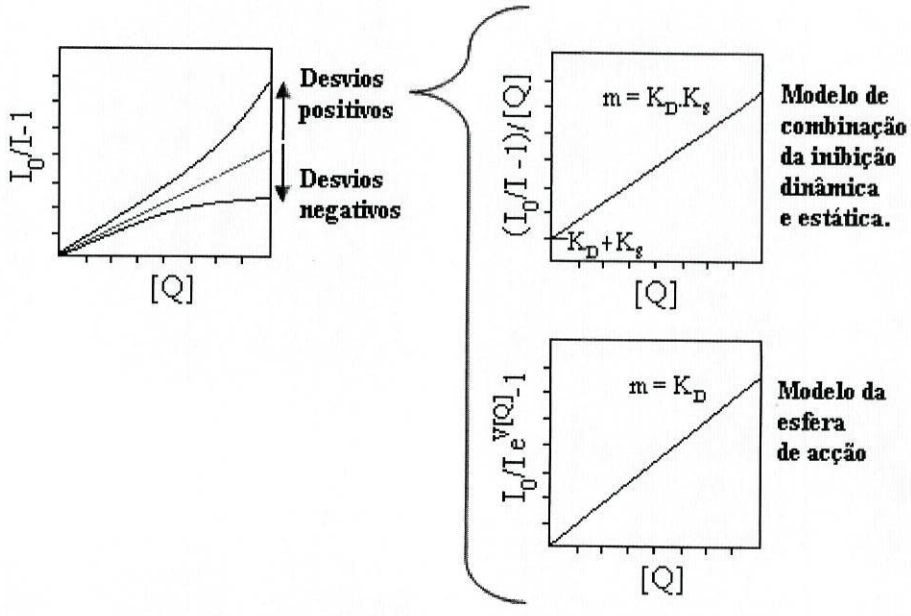


Figura 16. Desvios positivos e negativos à equação de Stern-Volmer e modelos alternativos de linearização. [Lacowicz,1999]

- Modelo de combinação da desactivação dinâmica e estática:

A combinação do modelo dinâmico com o de formação de um complexo resulta na seguinte equação [Lacowicz 1999]:

$$\frac{I_0}{I} - 1 = (K_D + K_S)[Q] + K_D K_S [Q]^2 \qquad \textbf{Equação 4}$$

Onde I_0 e I são, respectivamente, a intensidade de fluorescência corrigida do fluoróforo na ausência e na presença de desactivador, [Q] é a concentração do desactivador e K_D e K_S são as constantes de Stern-Volmer relativas à inibição da fluorescência dinâmica e estática, respectivamente. Assim, a existência conjunta de processos estáticos e dinâmicos pode ser um factor complicativo da análise dos dados de inibição de fluorescência.

- Modelo da esfera de acção:

Quando a extensão da inibição dinâmica é muito elevada, pode-se considerar o volume de uma esfera, V, que rodeia o fluoróforo onde a eficácia de inibição é unitária, e se o inibidor estiver o suficientemente perto do fluoróforo quando ocorre a sua excitação, a inibição é imediata e não ocorrem processos de difusão. A conjugação do modelo dinâmico com o da esfera de acção resulta na equação:

$$\frac{I_0}{I} = (1 + K_D[Q])\ e^{[Q]V_{app}} \qquad \textbf{Equação 5}$$

Onde I_0 e I são, respectivamente, a intensidade de fluorescência corrigida do fluoróforo na ausência e na presença de desactivador, [Q] é a concentração do desactivador, K_D é a constante de Stern-Volmer relativa à inibição da fluorescência dinâmica e V_{app} é o volume aparente que pode ser calculado a partir do volume da esfera, do volume membranar e da coeficiente de partição do desactivador.

Desvios negativos – Desvios negativos na relação de Stern-Volmer podem ser indicativos da presença de múltiplas populações de fluoróforos com diferentes acessibilidades, tal como os fluoróforos presentes nos folhetos internos e externos da bicamada fosfolipídica, ou em diferentes estados de protonação [Lacowicz, 1999]. Outros autores atribuem este efeito a uma saturação dos locais de ligação de agentes desactivadores [Chalpin e Kleinfeld, 1983].

2.1.3. Sonda de fluorescência: DPH

As sondas de fluorescência contêm grupos fluoróforos que permitem obter, entre outras, informações acerca da fluidez membranar e da localização de moléculas na membrana.

Para poder ser utilizada como uma sonda de fluorescência, o composto deve apresentar as seguintes características:

- Um coeficiente de partição membrana/solução aquosa o mais elevado possível ($K_p \approx \infty$), de modo a que a sonda esteja praticamente toda incorporada na bicamada lipídica, ou então, que o rendimento de fluorescência (Φ_f) na fase aquosa seja praticamente nulo;

- Elevado Φ_f na fase membranar, para que a relação sinal ruído seja aceitável;

-Valores elevados do tempo de vida do estado excitado (τ), para que a concentração da sonda possa ser reduzida.

O cumprimento destes três requisitos permitirá o uso de concentrações de sonda muito inferiores às concentrações de lipído e de desactivador de fluorescência (fármaco)

utilizadas, de modo a que as alterações das características físico-químicas dos sistemas sejam desprezáveis [Marcelino, 2005].

Actualmente existe uma vasta gama de compostos que dadas as suas características, permitem a sua utilização como sondas de fluorescência nos mais diversos estudos. Das sondas comercialmente disponíveis foi escolhida para a realização deste trabalho a sonda 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH). Esta escolha baseou-se no facto da molécula DPH permitir avaliar a microviscosidade interna das membranas em quase toda a matriz lipídica [Kaiser e London, 1998], o que tem feito com esta sonda e seus derivados sejam extensamente usados na análise da fluidez membranar de células em condições normais e patológicas [Beccerica et al, 1989]. Para além disto, esta sonda possui outras importantes propriedades, como por exemplo: a sua solubilização em estruturas organizadas é favorecida em relação à sua solubilização em meio aquoso e o valor do tempo de vida do estado excitado é conhecido em diversas estruturas.

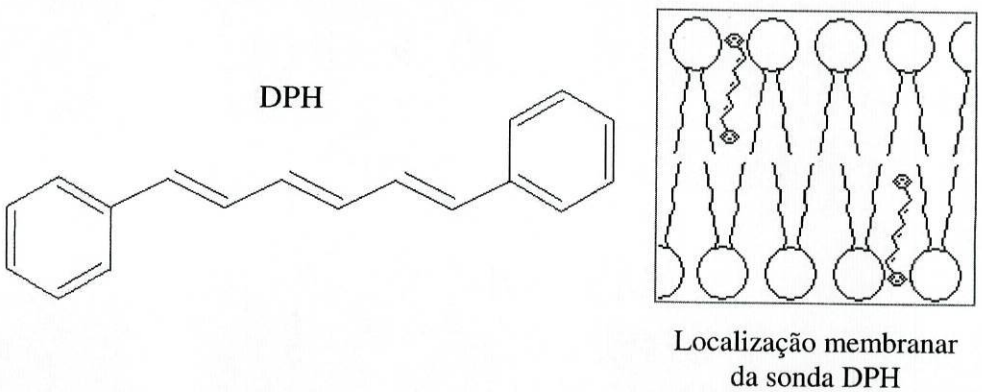


Figura 17. Estrutura química da molécula 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH) e representação da sua localização na bicamada lipídica.

A sonda DPH apresenta uma estrutura constituída por uma cadeia carbonada insaturada com dois anéis benzénicos ligados nas suas posições extremas (Figura 17). Esta sonda está inserida na bicamada lipídica com o seu eixo longitudinal paralelo às cadeias acil dos fosfolipídos (Figura 17) [Kaiser e London, 1998; Ferreira et al, 2005 b)].

2.2. Estudos de anisotropia no estado estacionário

2.2.1. Introdução

A interacção dos fármacos com as membranas celulares ocorre tanto a nível químico como físico. Tal como referido em 1.2.2., as membranas biológicas exibem uma estrutura global comum, altamente dinâmica e fluida, composta essencialmente por uma dupla camada fosfolipídica onde se inserem proteínas. Os fosfolipídos das membranas à temperatura corporal estão na fase de gel-sólido, que é um estado parcialmente ordenado, mas suficientemente flexível para permitir movimentos laterais das moléculas lipídicas. Assim, a estrutura da membrana é importante para definir [Bergethon e Simons, 1989]:

- as suas características de permeabilidade;
- a interacção com moléculas exógenas;
- a acção de moléculas endógenas (proteínas, receptores e canais);
- mecanismos moleculares envolvidos nos efeitos dos fármacos.

O estudo dos efeitos dos fármacos nas propriedades físicas da membrana, nomeadamente na fluidez membranar, torna-se fundamental, já que alterações desta podem causar mudanças nas propriedades catalíticas de enzimas ligadas à membrana [Knazek et al., 1981].

Estudos da alteração da fluidez membranar devida à acção de fármacos também têm sido importantes para o esclarecimento de mecanismos biológicos e de condições patológicas (inflamação crónica, cancro e doenças cardiovasculares) [Beccerica et al., 1989; Knazek et al., 1981]. No caso particular de estudos da interacção dos AINEs com as biomembranas, estes têm fornecido informações valiosas sobre os seus efeitos terapêuticos, bem como compreensão de alguns dos seus efeitos secundários [Knazek et al., 1981; Lichtenberger et al., 1995].

A interacção dos AINEs com as membranas (modelos membranares e membranas biológicas), causando variações na sua fluidez tem sido investigada de forma indirecta através de sondas de fluorescência utilizadas em métodos de anisotropia de fluorescência [Uchida et al., 1981; Santos et al., 1998; Ferreira et al., 2005a)].

2.2.2. Princípio da anisotropia

A anisotropia de fluorescência no estado estacionário (r_{ss}) fundamenta-se na determinação do grau e da extensão da rotação difusional do fluoróforo (sonda) durante o seu tempo de vida do estado excitado. Pequenas alterações na rigidez da matriz envolvente da sonda, produzem alterações no movimento rotacional da sonda e, como tal, provocam alterações na anisotropia [Lacowicz, 1999].

A origem deste fenómeno baseia-se na existência de momentos de transição (rotação da sonda em torno do seu próprio eixo durante o tempo de vida do estado excitado) para absorção e emissão que ocorrem ao longo de direcções específicas dentro da estrutura do fluoróforo. Em soluções homogéneas, os fluoróforos no estado fundamental estão todos orientados de modo aleatório. Quando expostos à luz polarizada, os fluoróforos que têm os seus momentos de transição de absorção orientados ao longo do vector eléctrico da luz incidente (polarizada verticalmente) são preferencialmente excitados. Consequentemente, a população de fluoróforos excitada não está aleatoriamente orientada. Pelo contrário, um grande número de moléculas excitadas apresenta o seu próprio momento de transição orientado ao longo do vector da luz de excitação polarizada [Lacowicz, 1999].

A despolarização, que é uma das fases da anisotropia, é originada por uma série de fenómenos, entre os quais a difusão rotacional. Estes fenómenos estão relacionados com a amostra em análise. Os valores de anisotropia medidos experimentalmente revelam a existência de uma alteração da média angular do fluoróforo e que ocorre entre a absorção e a emissão do fotão. Esta alteração angular depende da proporção e extensão da difusão rotacional durante o tempo de vida do estado excitado. Todos estes movimentos de difusão estão relacionados e dependem da viscosidade do solvente, do tamanho e da forma do fluoróforo.

A medição da anisotropia de fluorescência, quer no estado estacionário, em que as medições são pontuais no tempo, quer a resolvida no tempo, em que as medições são contínuas no tempo, é extremamente importante no estudo da dinâmica rotacional de uma molécula inserida numa membrana. Consequentemente, a alteração da orientação de um fluoróforo vai reflectir as características do meio ambiente onde a molécula fluorescente se encontra, nomeadamente as restrições impostas à livre rotação desta.

Deste modo, as medições de anisotropia podem ser usadas para descrever a fluidez da bicamada lipídica [Loura et al., 2003].

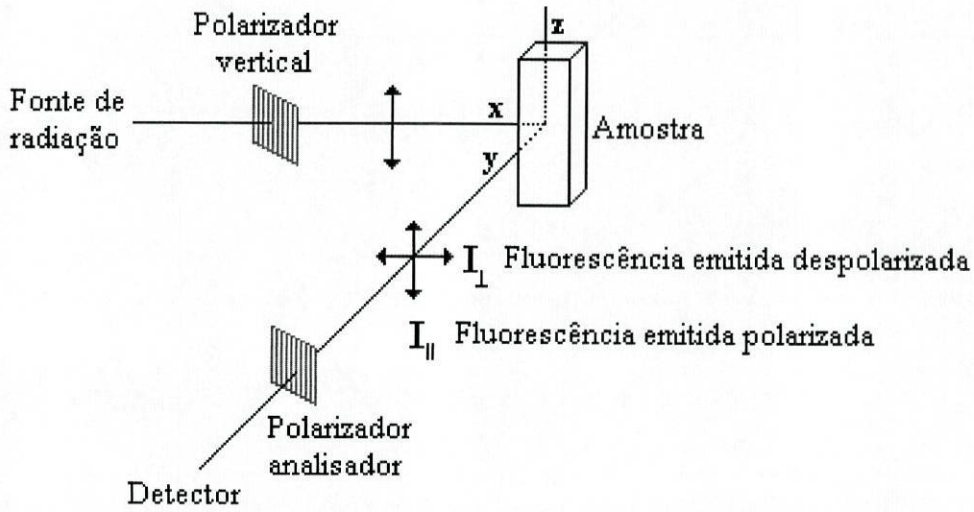


Figura 18. Diagrama esquemático da medição da anisotropia de fluorescência. Fluorescência emitida polarizada: se o fluoróforo presente na amostra se mantiver imóvel durante o tempo de vida do estado excitado; Fluorescência emitida despolarizada: se o fluoróforo presente na amostra rodar durante o tempo de vida do estado excitado.

Para a obtenção da anisotropia de estado estacionário (Figura 18), a amostra é excitada com luz polarizada verticalmente. O vector eléctrico da luz de excitação é orientado paralelamente ao eixo dos zz. Quando o polarizador de emissão se encontra orientado paralelamente com o polarizador de excitação, significa que o fluoróforo se manteve imóvel durante o tempo de vida do estado excitado e portanto a luz manteve-se polarizada e a intensidade observada define-se como $I_{\parallel}$. Da mesma forma, quando o polarizador de emissão se encontra orientado perpendicularmente com o polarizador de excitação, significa que o fluoróforo rodou durante o tempo de vida do estado excitado e portanto a polarização da luz diminuiu e neste caso a intensidade observada define-se como $I_{\perp}$. [Lacowicz, 1999]. A anisotropia do estado estacionário (r_{ss}) é então definida pela seguinte relação:

$$r_{SS} = \frac{I_{\parallel} - GI_{\perp}}{I_{\parallel} + 2G_{\perp}} \qquad \textbf{Equação 6}$$

em que G é um factor de correcção instrumental, dado pela razão das sensibilidades do sistema de detecção para a luz polarizada vertical e horizontalmente [Uchida, et al.,1981; Santos et al., 1998].

A determinação da anisotropia no estado estacionário em membranas celulares, implica o uso de fluoróforos extrínsecos (sondas) inseridos na bicamada lipídica. A utilização destas sondas apresenta algumas vantagens:

- A obtenção de informação sobre a polaridade e microviscosidade da matriz em estudo;

- A possibilidade de monitorizar regiões específicas da membrana, dado que existe uma variedade de sondas diferentes que o permitem;

- A diminuição das perturbações que possam ocorrer na membrana por inclusão da sonda pois as sondas podem ser usadas em baixas concentrações [Lentz et al., 1978].

Efectivamente, as sondas de fluorescência permitem avaliar as alterações da fluidez da bicamada. No entanto, a interpretação dos resultados experimentais não deve ser feita de forma directa, uma vez que alterações na fluidez devidas a agentes que a perturbem não são uniformes em todos os segmentos das cadeias de ácidos gordos e a própria sonda pode ter influência nos resultados obtidos. Assim, para evitar interpretações ambíguas dos valores medidos directamente é necessário considerar correcções apropriadas aos dados experimentais.

Quando um fluoróforo se encontra solubilizado num solvente isotrópico a anisotropia de fluorescência, r, decai exponencialmente para zero, e esta despolarização é descrita pela equação de Perrin [Lúcio et al., 2004; Ferreira et al., 2005 a)]:

$$r = \frac{r_0}{1 + (\tau / \theta)} \qquad \textbf{Equação 7}$$

onde r_0 é a anisotropia fundamental da molécula fluorescente, θ o tempo de relaxamento rotacional do fluoróforo e τ o seu tempo de vida no estado excitado.

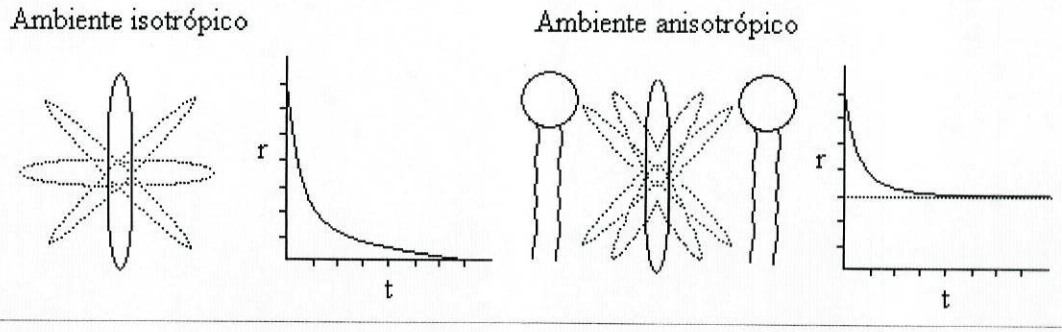


Figura 19. Representação das diferenças na possibilidade de movimentos rotacionais de sondas em ambientes isotrópicos e anisotrópicos.

No entanto, quando o ambiente anisotrópico das membranas impede a livre rotação do fluoróforo, a anisotropia decai para um valor finito, r_∞, (Figura 19) e portanto os resultados não podem ser analisados pela equação de Perrin, mas sim pela equação de Perrin modificada [Lúcio et al., 2004]:

$$r = \frac{(r_0 - r_\infty) \times \theta}{\theta + \tau} + r_\infty \qquad \textbf{Equação 8}$$

em que r_∞ representa a limitação à rotação da sonda pelo meio onde o fluoróforo está inserido, θ depende essencialmente da resistência local à rotação, e tem sido relacionado com a microviscosidade da membrana pela equação de Stokes-Einstein [Lúcio et al., 2004]:

$$\theta = \frac{\bar{\eta} \times V}{RT} \qquad \textbf{Equação 9}$$

em que $\bar{\eta}$ representa a microviscosidade, T a temperatura (K), R a constante dos gases perfeitos e V o volume da unidade rotativa. Deste modo, variações no valor de r podem estar relacionadas com modificações de θ.

Para além da limitação relacionada com a rotação da sonda existente num meio anisotrópico, também tem que ser considerado o facto dos resultados experimentais poderem ser influenciados pela própria sonda. As alterações de anisotropia observadas para concentrações crescentes de fármaco podem ser causadas não só por alterações na microviscosidade da membrana, mas também por variações no tempo de vida do estado excitado do fluoróforo, τ' [Lúcio et al., 2004] .

Os valores de τ', quando a desactivação de fluorescência causada pelos fármacos é do tipo colisional, podem ser determinados pela seguinte expressão:

$$\frac{I_0}{I} = \frac{\tau_0}{\tau'} \qquad \textbf{Equação 10}$$

onde I_0/τ_0 e I/τ' correspondem, respectivamente, à intensidade de fluorescência/tempo de vida do estado excitado do fluoróforo na ausência e presença do fármaco desactivador. A diminuição de τ' ocorre, porque a desactivação de fluorescência é um processo colisional que reduz o número de fluoróforos no estado excitado, e esta redução origina valores de I menores [Ferreira et al., 2005 a)]. O valor do tempo de vida do estado excitado do fluoróforo na ausência de fármaco desactivador, τ_0, é característico de cada sonda [Kaiser e London, 1998] e I_o/I podem ser obtidos por medição da intensidade de fluorescência.

Quanto à limitação relacionada com os impedimentos ao movimento rotacional da sonda de fluorescência, estudos prévios nas membranas revelam que usando sempre o mesmo comprimento de onda de excitação e trabalhando com temperaturas em que a membrana esteja na fase fluida é possível obter uma rotação das sondas totalmente desimpedida, ou seja, é possível que r_∞ seja muito próximo de zero. Assim sendo torna-se possível obter os valores de anisotropia corrigida, r', por:

$$r' = \frac{r_0}{1 + (\tau'/\theta)} \qquad \textbf{Equação 11}$$

A divisão da equação de Perrin pela equação anterior, seguida de rearranjo, origina a seguinte expressão:

$$r' = \frac{\theta + \tau_0}{\theta + \tau'} \times r_{SS} \qquad \textbf{Equação 12}$$

Considerando que na equação anterior, r_{ss} como o valor medido para τ_0 (na ausência de desactivador) e os valores publicados de θ e τ_0 para a sonda DPH [Kaiser e London, 1998], é possível obter os valores de anisotropia corrigida, r'. Estes valores de r' correspondem à alteração de anisotropia devida à variação dos tempos de vida do fluoróforo, proporcionando, assim, uma correcção para a influência da própria sonda na microviscosidade da membrana. Os valores de r' obtidos são comparados com os valores experimentais de anisotropia (r_{ss}). Através da diferença entre r_{ss} e r' é possível

obter a variação real de anisotropia relacionada com a alteração da fluidez da membrana causada pela presença do fármaco e sem o efeito da variação intrínseca devida ao decréscimo do tempo de vida da sonda de fluorescência. Quando os valores referentes a r_{ss} são maiores que os obtidos para r', pode-se concluir que a fluidez da membrana diminuiu. Pelo contrário, o decréscimo da diferença entre r_{ss} e r', na presença de concentrações crescentes de AINEs, está relacionado com a fluidificação da membrana. A diferença entre r_{ss} e r' é, assim, uma medida do efeito de fluidificação.

Uma vez que os fluoróforos extrínsecos são inseridos na matriz lípidica, a desactivação de fluorescência é determinada apenas pela concentração de fármaco que se encontra na fase lípidica (membranar), a qual se designa de concentração efectiva do agente desactivador ($[Q]_m$) [Lúcio et al., 2004]:

$$[Q]_m = \frac{K_P [Q]_T}{K_P \alpha_m + (1 - \alpha_m)} \qquad \textbf{Equação 13}$$

onde $[Q]_T$ é a concentração total de fármaco (na membrana e na solução), α_m é o volume da fracção da fase membranar ($\alpha_m = V_m / V_T$; V_m e V_T representa os volumes das fases membranar e aquosa, respectivamente) e K_p é o coeficiente de partição de fármaco desactivador.

CAPÍTULO 3

PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Reagentes e equipamento

As soluções de meloxicam, lornoxicam e nimesulide foram preparadas usando as respectivas substâncias sólidas produzidas pela Sigma-Aldrich. Estas soluções foram preparadas em solução tampão hepes (10mM; I=0,1M; pH=7,4) utilizadas no máximo durante três dias e protegidas da luz.

A fosfatidilcolina de gema de ovo (EPC) foi adquirida à Sigma-Aldrich e utilizada sem purificação adicional.

O colesterol foi adquirido à Avanti Polar-Lipids Inc..

As linhas celulares utilizadas foram a J774 (Linha celular de macrófagos de ratinho) e a HTP-1 (Linha celular de monócitos humanos) adquiridas à Global Bioresource Center (ATCC).

A solução tampão de hepes (ácido N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-etanossulfónico) foi preparada utilizando a substância sólida da Sigma-Aldrich e para ajustar a força iónica foi utilizada uma solução 1M de cloreto de sódio preparada a partir do respectivo sólido adquirido à Panreac. Esta solução foi filtrada em vácuo utilizando um filtro Millipore 0,22μm.

A sonda de fluorescência 1,6-difenil-1,3,5-hexatriene foi adquirida à Molecular Probes.

Os reagentes metanol, clorofórmio e dimetilsulfóxido (DMSO) foram adquiridos à Panreac, Merck e Sigma-Aldrich, respectivamente.

Nas soluções em que se utilizou água bidesionizada, esta apresentava uma condutividade inferior a $0,1\mu Scm^{-1}$.

As medidas de fluorescência e de anisotropia foram efectuadas num fluorímetro LS50B Luminescence Spectrometer da Perkin Elmer Instruments e as medidas de absorvância num espectofotómetro de UV/Vis Lambda 45UV/Vis Spectrometer, da Perkin Elmer Instruments.

3.2. Preparação das soluções de AINEs

As soluções dos diferentes AINEs foram preparadas por pesagem rigorosa dos sólidos e dissolução em tampão hepes (10mM, I=0,1M, pH=7,4). A solução de meloxicam foi preparada com uma concentração de 1000μM e as de lornoxicam e de nimesulide com uma concentração de 500μM. A diferença das concentrações usadas para os vários AINEs surgiu pelo facto destes terem solubilidades diferentes no solvente utilizado. Por este motivo, foi necessário filtrar por membrana de 0,45μm de diâmetro de poro as soluções de lornoxicam e de nimesulide que apresentavam precipitado. Posteriormente as concentrações de fármaco nas soluções filtradas foram determinadas por diluição, seguida da leitura da absorvância (376 nm para o lornoxicam e a 392 nm

para o nimesulide) e interpolação do valor da absorvância numa curva de calibração construída para o efeito.

Estas curvas de calibração foram construídas utilizando soluções padrão dos fármacos em tampão hepes obtidas a partir de diluições de uma solução-mãe (100μM no caso do lornoxicam e 50μM no caso do nimesulide) preparada por dissolução de uma quantidade rigorosamente pesada de fármaco.

3.3. Preparação de lipossomas de EPC

Os lipossomas foram preparados pelo método clássico de hidratação do filme lipídico [Lasic, 1993]. A quantidade necessária de EPC dissolvida em clorofórmio metanol (9:1) foi evaporada à secura sob corrente de azoto em rotação constante para formar uma camada fina e homogénea aderida às paredes do balão de vidro utilizando um rotavapor Buchi R-200, termostatizado a 35ºC com um banho Buchi B-490. O filme obtido foi deixado numa corrente de azoto durante pelo menos três horas para remover vestígios de solvente orgânico. De seguida o filme lipídico foi hidratado com um volume de solução tampão hepes (10mM, I=0,1M, pH=7,4) de modo a que a concentração final em EPC fosse de 1500μM.

Após a hidratação formam-se lipossomas multilamelares (MLVs) por agitação em vórtice que foram mantidos ao abrigo da luz. Para obtenção de lipossomas unilamelares (LUVs) a solução de MLVs foi sujeita a um processo de extrusão.

A extrusão foi efectuada num extrusor Lipex Biomembranes Inc., à temperatura ambiente, utilizando uma corrente de azoto de 250bar. Utilizaram-se filtros de policarbonato com 100nm de diâmetro e sujeitaram-se os MLVs a 10 passagens consecutivas por estes, para obter LUVs de diâmetro aproximadamente 100nm.

A preparação de lipossomas contendo colesterol na sua constituição apenas se diferenciou do descrito até aqui no que diz respeito à incorporação do colesterol. Neste caso antes de se ter procedido à evaporação dos solventes orgânicos, foi adicionada uma solução de colesterol (30% - m/m) [Wang et al., 2006] dissolvido em clorofórmio e metanol (3:2) e o restante procedimento foi executado como referido anteriormente.

3.4. Isolamento de esplenócitos de ratinho

Os esplenócitos são obtidos dos baços dos ratinhos Balb/c, fornecidos pela Harlen Iberica (Espanha), que foram sacrificados por deslocamento cervical. Numa câmara de fluxo laminar o baço foi-lhes retirado e homogeneizado em meio de cultura RPMI 1640. As células assim obtidas foram colocadas em gelo pelo menos durante cinco minutos, para que agregados maiores, como por exemplo restos de cápsula fibrosa ou tecidos gordos, se depositassem e pudessem ser removidos. O sobrenadante foi submetido à força centrifuga (260*g* a 4ºC durante 10minutos). As células depositadas no fundo do tubo foram ressuspendidas em meio de cultura e antes de ser novamente centrifugada foi efectuada a lise dos eritrócitos com uma solução de cloreto de amónio adicionada à suspensão de células durante três minutos. O sobrenadante foi removido e a concentração de esplenócitos foi ajustada a 1×10^7céls/mL em meio de cultura RPMI 1640 com 2mM de glutamina, 100U/mL de penicilina, 100µM/mL de estreptomicina, 10% de soro de bovino fetal e 2mM de hepes.

Depois deste processo, as células foram utilizadas em ensaios durante as 24horas seguintes e apresentando sempre uma viabilidade superior a 80%.

Antes da incorporação da sonda DPH, as células foram centrifugadas (260*g* a 4ºC durante 10minutos) e ressuspendidas em volume equivalente de tampão hepes (10mM, I=0,1M, pH=7,4). A substituição do meio de cultura pelo tampão hepes permitiu eliminar a fluorescência do meio de cultura.

3.5. Cultura celular

3.5.1. Cultura e isolamento de macrófagos de ratinho

Numa câmara de fluxo laminar foram colocadas cerca de 1×10^6células dentro de um frasco de cultura celular de 250mL, com 10mL de meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 2mM de glutamina, 100U/mL de penicilina, 100µM/mL de estreptomicina, 10% de soro de bovino fetal e 2mM de hepes, para obter 1×10^7células após três dias incubação numa estufa a 37ºC com 5% de dióxido de carbono. Durante

este período de incubação o meio de cultura era trocado sempre que se verificava uma mudança de cor.

Após a incubação as células foram observadas num microscópio invertido, as vivas encontravam-se aderidas á parede inferior do frasco de plástico, enquanto que algumas mortas permaneciam em suspensão no meio de cultura. Quando as células vivas preencheram a totalidade do frasco, o meio de cultura foi-lhes retirado e a camada de células aderidas ao plástico foram sujeitas a duas lavagens com tampão hepes (10mM, I=0,1M, pH=7,4) para retirar as células mortas e vestígios de meio de cultura.

Ao frasco de cultura celular foram adicionados 5mL de solução tampão hepes, as células aderidas à parede do frasco foram raspadas obtendo-se uma suspensão das mesmas no tampão. Os macrófagos assim obtidos foram centrifugados a 260*g* durante 10 minutos a 4ºC e a camada de células foi ressuspendida num volume de tampão hepes de modo a obter uma concentração de 1×10^7céls/mL.

Depois deste processo, as células foram utilizadas em ensaios durante as 12horas seguintes, mas neste caso apresentando apenas uma viabilidade compreendida entre 50 e 70%, o que se justifica dado que o processo de obtenção das células do meio de cultura (por raspagem) é bastante agressivo para estas.

3.5.2. Cultura e isolamento de monócitos humanos

O procedimento experimental para cultura desta linha celular é semelhante ao descrito para a linha celular de macrófagos de ratinho. Dado que estas células permaneceram em suspensão no meio de cultura, quando atingiram uma concentração de cerca de 1×10^7céls/mL foram centrifugadas (260*g* a 4ºC durante 10minutos) para lhes ser retirado o meio de cultura e ressuspendidas em volume equivalente de tampão hepes (10mM, I=0,1M, pH=7,4). Após uma lavagem, os monócitos foram ajustados a uma concentração de 1×10^7céls/mL em tampão hepes.

Depois deste processo, as células foram utilizadas em ensaios durante as 12horas seguintes e apresentando sempre uma viabilidade superior a 95%.

3.6. Separação de leucócitos

Os leucócitos foram obtidos de sangue humano, aspirado por punção venosa e tornado incoagulável pela adição de EDTA (anticoagulante) com constante agitação.

Em cada tubo de centrifuga foi colocado um volume de histopaque-1119, correspondente a metade do volume de sangue a centrifugar. Muito cuidadosamente, para não ocorrer mistura, foi colocada uma camada com o mesmo volume de histopaque-1077 sobre o histopaque-1119. Antes dos tubos serem colocados na centrífuga a 720*g*, durante 30minutos, à temperatura de 21°C, foi colocada cuidadosamente a camada de sangue total sobre o gradiente superior do tubo de centrifugação [Costa et al., 2005].

Os tubos foram retirados da centrífuga e foi possível observar duas camadas opacas distintas (uma de células mononucleares e outra de granulócitos, Figura 20). O fluido até à camada de células mononucleares (plasma) foi aspirado e eliminado. As células desta camada foram transferidas para um tubo de centrifuga. O fluido restante até à camada de granulócitos também foi aspirado e eliminado, os granulócitos foram recolhidos num outro tubo [Costa et al., 2005].

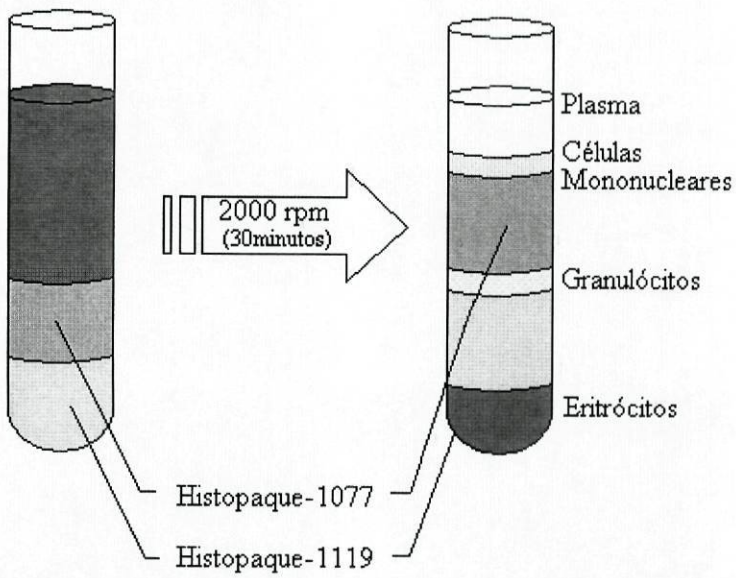


Figura 20. Separação de leucócitos.

Ambos os tipos de leucócitos foram lavados com a adição de um volume equivalente ao inicial de sangue, de solução tampão hepes (10mM, I=0,1M, pH=7,4) e

centrifugados a 260*g*, durante 10minutos a 4°C. A lise de alguns eritrócitos, ainda presentes foi efectuada como descrito em 3.4.. As células foram ressuspensas num volume, ajustado de tal modo a que a concentração de leucócitos fosse 1×10^7cels/mL.

Depois deste processo, as células foram utilizadas em ensaios durante as 12horas seguintes e apresentaram uma viabilidade sempre superior a 80%.

3.6.1. Citologia sanguínea

A citologia sanguínea foi efectuada com esfregaços de sangue total. Numa lâmina de microscopia foi colocada uma gota de sangue, na direcção da gota foi movimentada uma segunda lâmina em ângulo de 45° com a primeira de forma a espalha-la na totalidade. Depois do sangue estar completamente seco, foi corado com 1mL de solução de Wright (mistura de corantes do tipo Romanowsky, contendo azul-de-metileno, eosina e azures-de-metileno). Após uma incubação de 4minutos, a lâmina foi coberta com 1mL de solução tampão fosfato (pH=7,0) e ficou a incubar durante 12minutos. Finalmente a lâmina foi lavada com água corrente. Já seco, o esfregaço pode ser observado ao microscópio óptico e os diferentes leucócitos foram distinguidos tal como indicado na Tabela II e com base nas suas diferentes morfologias (Figura 11 do Capítulo 1).

Tabela II. Cor apresentada pelos diferentes leucócitos num esfregaço corado com corante Wright. [Junqueira e Carneiro, 2004]

	Tipo de Leucócito	**Cor**
Granulócitos	Neutrófilos	Salmão
	Eosinófilos	Rosa-amarelado
	Basófilos	Azul
Células mononucleares	Linfócitos	Púrpura
	Monócitos	

FACULDADE DE FARMÁCIA DO PORTO BIBLIOTECA

3.7. Preparação das amostras utilizadas e condições experimentais nos ensaios das interacções fármaco/membrana

A preparação das amostras para ensaios de fluorimetria, o que inclui a medição da anisotropia e da desactivação da fluorescência, foi realizada de duas formas diferentes conforme a utilização de células ou de lipossomas.

Nos ensaios em que foram utilizados lipossomas de EPC como modelos membranares, foram preparadas suspensões em que a concentração de lípido foi mantida constante (500μM) e crescentes concentrações de AINEs em tampão hepes (10mM, I=0,1M, pH=7,4), 0 a 600μM para o meloxicam, 0 a 400 μM para o lornoxicam e 0 a 100μM para o nimesulide. As soluções resultantes foram colocadas a incubar durante duas horas [Lúcio at al., 2004].

Para este tipo de ensaios a sonda DPH de fluorescência foi incorporada nos lipossomas antes da evaporação dos solventes orgânicos. A sonda foi dissolvida em etanol e clorofórmio (2:3) e foi adicionada ao lípido de forma a obter uma proporção final de lípido/sonda de 300:1 e uma concentração máxima de etanol inferior a 2%, sendo que para esta mesma percentagem não estão descritas quaisquer alterações na estrutura da membrana [Coutinho et al. 1990; Moreno e Prieto 1993]. Depois da adição da sonda ao EPC dissolvido nos solventes orgânicos seguiu-se uma incubação de 30 minutos, à temperatura ambiente para promover a incorporação total da sonda na bicamada lipídica [Chalpin e Kleinfeld, 1983].

Nos ensaios em que foram utilizados esplenócitos , macrófagos, monócitos e leucócitos, também foi utilizada a sonda DPH para monitorizar a fluidez das membranas celulares. Para incorporação desta sonda nas células, a solução de DPH em solvente dimetilsulfóxido (DMSO) foi diluída 100 vezes em tampão hepes de modo a obter uma solução de concentração 1×10^{-5}M. Uma aliquota de 1mL desta solução foi adicionada a um igual volume de suspensão celular (1×10^{7}céls/mL) em solução tampão hepes. A suspensão resultante foi colocada a incubar em gelo, na ausência de luz durante uma hora, para incorporação total da sonda nas membranas. Após o período de incubação foram preparadas suspensões em que a concentração de células foi mantida constante (1×10^{6}céls/mL) com concentrações crescentes de AINEs em tampão hepes. O intervalo final de concentrações dos fármacos foi de 0 a 600μM para o meloxicam, 0 a 400 μM

para o lornoxicam e 0 a 100μM para o nimesulide. As soluções resultantes foram colocadas a incubar durante uma hora à temperatura ambiente.

3.8. Estudo da fluidez membranar

As determinações da intensidade de fluorescência e da anisotropia de estado estacionário foram feitas no espectrofluorímetro equipado com células de 1 centímetro de percurso óptico. A sonda utilizada para monitorizar estes estudos foi a DPH, pois é uma molécula que permite avaliar a microviscosidade interna das membranas em quase toda a matriz lipídica. O comprimento de onda de excitação aplicado foi de 361nm e o comprimento de onda de emissão de 432nm, com um tempo de integração de 10 segundos, após a colocação automática dos polarizadores.

Os ensaios realizados em lipossomas foram termostatizados a 25±0,1°C e realizados com a largura das fendas compreendida entre 3,6 e 4,5nm. No caso dos ensaios realizados em células, estes foram termostatizados a 37±0,1°C com a largura das fendas compreendida entre 4 e 8nm. A escolha das temperaturas suporta-se em duas razões essenciais: no caso dos ensaios com células a temperatura teria que corresponder à temperatura corporal, ideal ao desempenho das funções celulares; em todos os ensaios a temperatura teria que ser escolhida de tal forma que as membranas se encontrassem na fase fluida, pois estudos prévios em membranas [Ferreira et al., 2005 a)] mostraram que, sob estas condições, o movimento da sonda DPH está totalmente desimpedido, ou seja, r_∞ é igual a zero nas membranas se estas se encontrarem na fase fluida.

As medidas de anisotropia referidas foram obtidas conforme o descrito em 2.2.2.. Deste modo, a amostra foi excitada com luz polarizada verticalmente e as intensidades de fluorescência foram medidas com o polarizador de emissão orientado paralelamente ($I_{\parallel}$) e perpendicularmente ($I_{\perp}$) ao polarizador de excitação.

No entanto, com este tipo de metodologia, a distinção entre os dois mecanismos de desactivação da fluorescência não era conclusiva. Assim foram traçados espectros de absorção e de excitação do fluoróforo em amostras contendo concentrações crescentes de AINEs para verificar a possível existência de desvios nas bandas.

3.9. Verificação da viabilidade celular

Para verificar uma possível toxicidade dos fármacos usados nos ensaios em que foram utilizadas células, foi realizado o ensaio de exclusão do azul Trypan. As células na presença de azul Trypan (1:1) foram contadas com a ajuda de um hemocitómetro e a citotoxicidade foi avaliada em percentagem de células vivas na presença das diferentes concentrações de fármaco utilizadas.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A avaliação da alteração da fluidez membranar resultante da interacção entre os AINEs meloxicam, lornoxicam e nimesulide com as membranas celulares foi efectuada utilizando a técnica de anisotropia de fluorescência. Para monitorizar as alterações estruturais da bicamada lípidica foi utilizada a sonda DPH incorporada em diferentes modelos membranares: lipossomas; lipossomas com colesterol incorporado (30%) e membranas biológicas de esplenócitos de ratinho, de leucócitos humanos e das linhas celulares HTP1 e J774. A sonda DPH, cuja localização é conhecida e caracterizada (2.1.3.), apresenta uma intensidade de fluorescência de emissão máxima a um comprimento de onda bem definido (432nm) para um comprimento de onda de excitação de 361nm [Ferreira et al., 2005 a)].

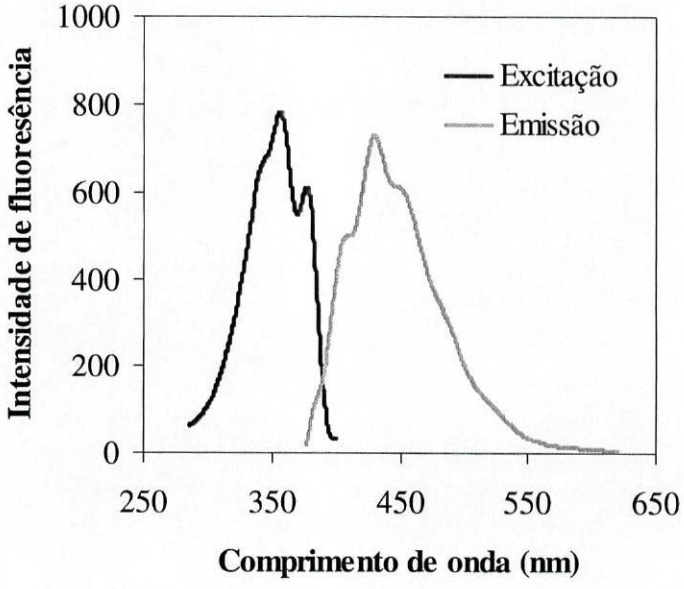


Figura 21. Espectros de excitação e de emissão da sonda DPH (1:100) em lipossomas de EPC (500μM, pH=7,4, 25°C).

Experimentalmente, verificou-se que em todos os modelos membranares estudados a intensidade máxima de fluorescência de excitação da sonda DPH se localizava a um comprimento de onda de 361nm. Então traçou-se o espectro de emissão da sonda para o comprimento de onda de excitação referido, tendo-se verificado que o valor máximo de intensidade de fluorescência emitida se localizava num comprimento de onda de 432nm.

As medições de intensidade de fluorescência foram efectuadas em sistemas membranares com o fluoróforo incorporado, aos quais foram adicionadas crescentes concentrações de fármacos. Para garantir que a intensidade de fluorescência emitida foi apenas devida ao fluoróforo, nem os AINEs, nem os modelos membranares podem apresentar uma intensidade de emissão significativa a 432nm. Para tal, foram traçados os espectros de emissão dos AINEs e dos modelos membranares estudados num intervalo que incluía o comprimento de onda onde se verificou o valor máximo de intensidade de fluorescência emitida pela sonda DPH e verificou-se que nenhum deles emitia significativamente nesse comprimento de onda.

A presença de determinados fármacos partilhados entre a fase membranar e a fase aquosa pode perturbar o microambiente em que a sonda está inserida (fase

membranar) provocando uma desactivação de fluorescência emitida pelo fluoróforo. Neste trabalho a eficácia da desactivação da fluorescência pelos AINEs estudados foi avaliada pela adição de quantidades crescentes destes fármacos às suspensões dos diferentes modelos membranares, com a sonda DPH incorporada. Com estas adições de AINEs verificou-se um decréscimo da intensidade de fluorescência sem alterações significativas das bandas dos espectros de excitação e de emissão da sonda para todos os AINEs, em qualquer dos modelos membranares estudados (Figura 22). Esta evidência experimental indicou que para os fármacos estudados ocorre uma desactivação da fluorescência dinâmica ou colisional.

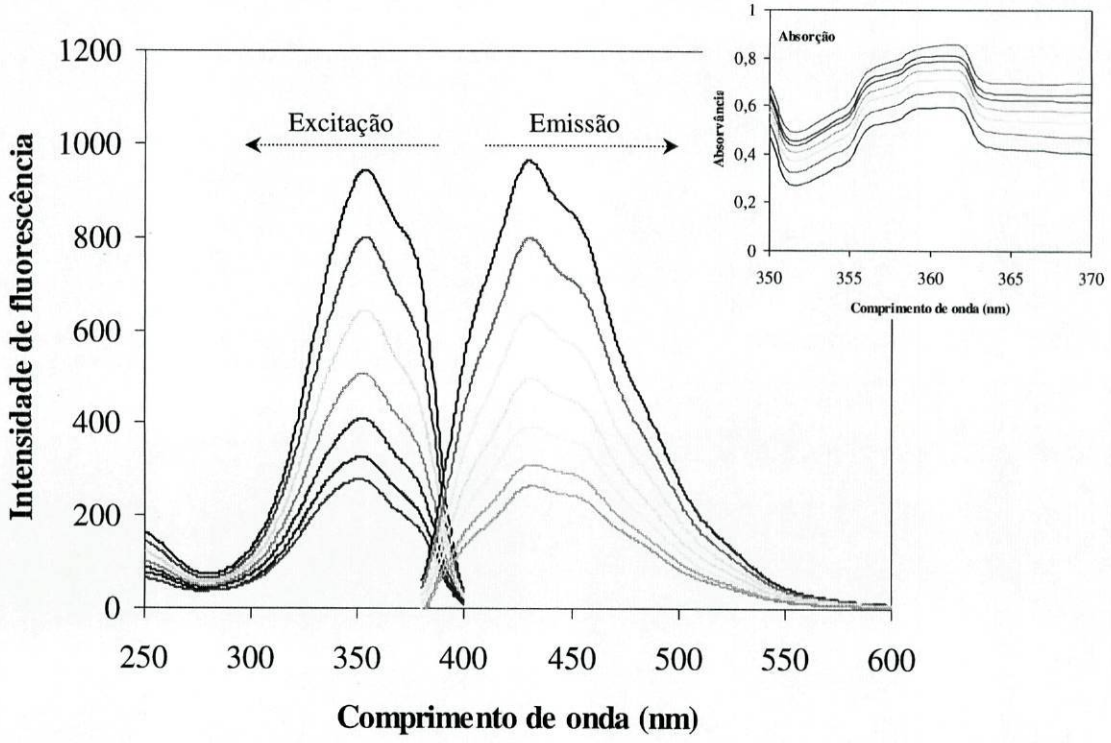


Figura 22. Espectros de excitação e emissão da sonda DPH incorporada em lipossomas de EPC (500μM) a 25°C com concentrações crescentes de um dos AINEs (nimesulide) e respectivo espectro de absorção no UV/Vis.

A Figura 22 apenas representa os espectros de excitação e de emissão da sonda DPH incorporada em lipossomas de EPC (500μM) com concentrações crescentes de nimesulide e respectivos espectros de absorção, no entanto o mesmo padrão de espectros pode ser observado para os três AINEs em todos os modelos membranares estudados.

Tendo em conta que os fármacos desactivadores de fluorescência também podem absorver no comprimento de onda de excitação foi necessário corrigir os valores da intensidade de fluorescência medida, multiplicando-os por um factor de correcção (C) dado pela seguinte equação 3.

Depois da correcção na intensidade de fluorescência obtiveram-se relações lineares com ordenada na origem igual a zero, de acordo com a equação de Stern-Volmer:

$$\frac{I_0}{I} - 1 = K_{SV}^{app}[Q]$$

em que K_{SV}^{app} corresponde à constante aparente de Stern-Volmer, [Q] à concentração total de fármaco, I_0 e I representam a intensidade de fluorescência do fluoróforo na ausência e na presença de desactivador, respectivamente. Esta relação pode ser representada graficamente com I_0/I-1 em função de [Q], onde se obtiveram relações lineares cujo declive corresponde ao valor de K_{SV}^{app} (Figura 23 e 24). Os valores de K_{SV}^{app} reflectem a eficácia de desactivação de fluorescência da sonda por cada um dos AINEs, o que poderá constituir uma indicação da proximidade dos AINEs estudados ao fluoróforo inserido nas membranas, uma vez que quanto maior o valor de K_{SV}^{app}, maior a interacção do fármaco com a sonda.

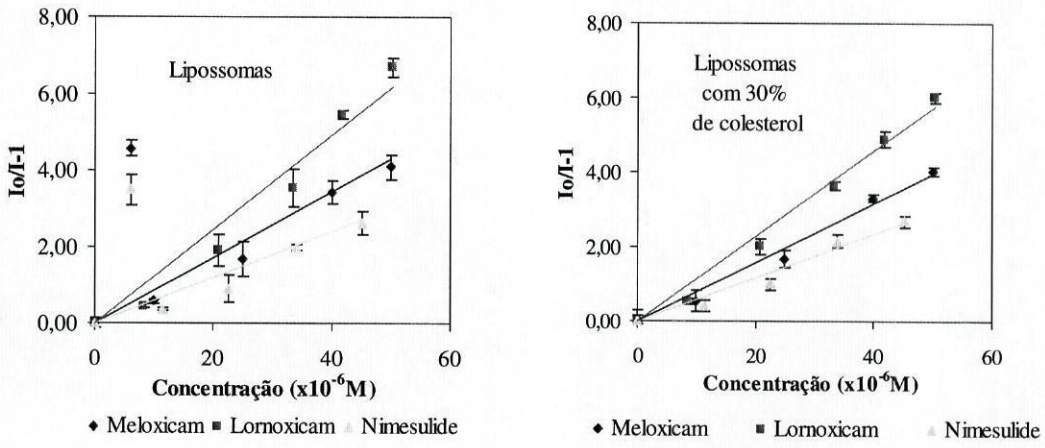


Figura 23. Relações de Stern-Volmer obtidas para a desactivação da fluorescência da sonda DPH inserida em lipossomas e em lipossomas contendo 30% de colesterol, com concentrações de 1500µM em função das concentrações de meloxicam, lornoxicam e nimesulide (soluções em tampão hepes 10mM, pH=7,4 e I=0,1M) a 25,0°C. Os resultados correspondem à média e desvio padrão de pelo menos 3 ensaios independentes.

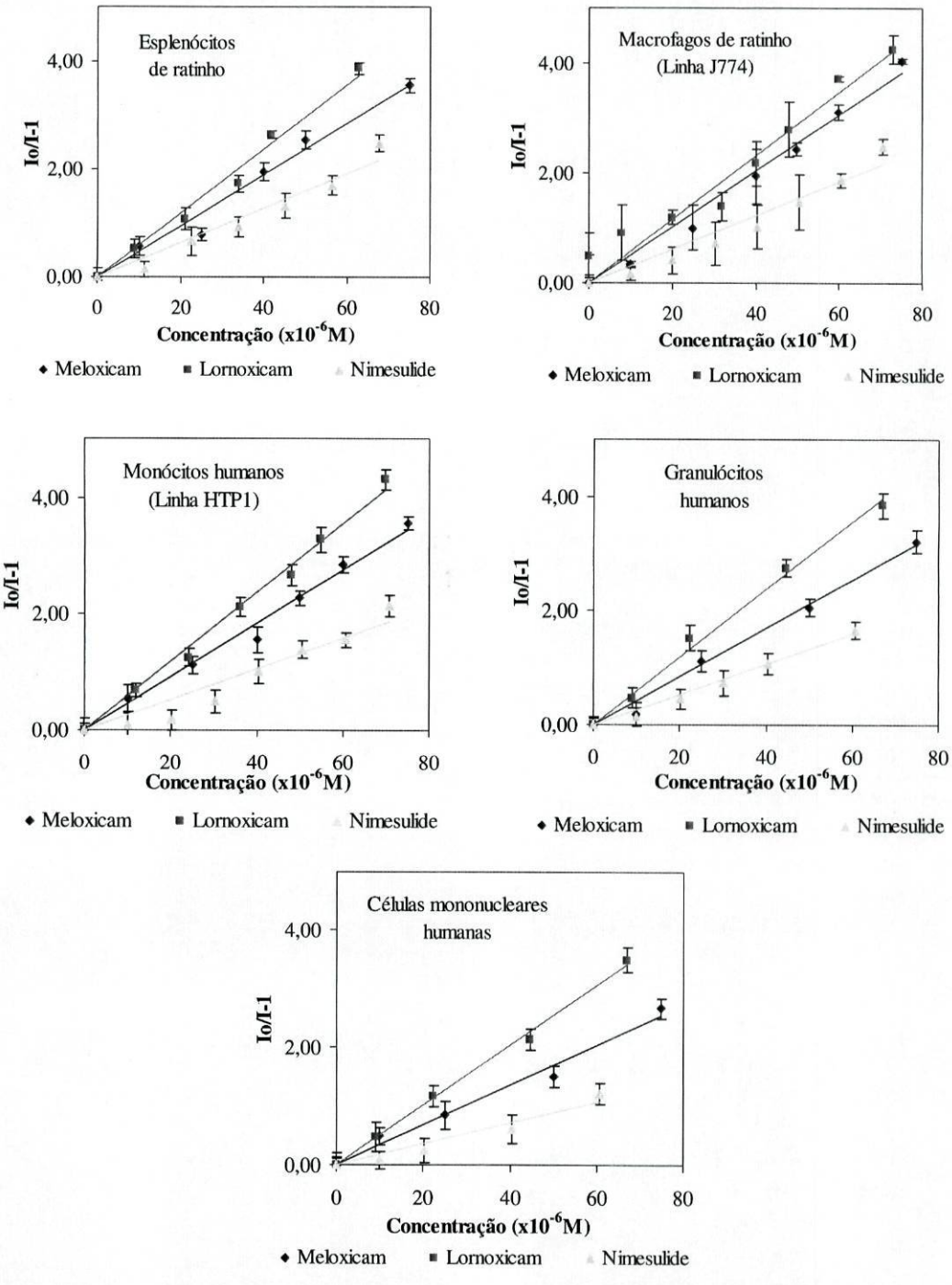


Figura 24. Relações de Stern-Volmer obtidas para a desactivação da fluorescência a 37,0°C da sonda DPH inserida nas membranas biológicas de diferentes tipos de células, com concentrações de 1×10^{6}céls/mL em função de concentrações crescentes de meloxicam, lornoxicam e nimesulide (soluções em tampão hepes 10mM, pH=7,4 e I=0,1M). Os resultados correspondem à média e desvio padrão de pelo menos 3 ensaios independentes.

Como se pode observar nas figuras 23 e 24, a sonda DPH sofreu uma desactivação de fluorescência pelos três AINEs estudados em todos os sistemas membranares e a eficiência relativa de desactivação da sonda sugere a ordem: lornoxicam > meloxicam > nimesulide.

No entanto, os valores de K_{SV}^{app} dependem das diferenças intrínsecas do microambiente observado para cada sonda, reflectidas nas diferenças nos valores do tempo de vida no estado excitado (τ_0), portanto basta dividir os valores de K_{SV}^{app} pelo valor de τ_0 da sonda DPH para obter a designada constante bimolecular aparente de desactivação de fluorescência, K_q^{app}:

$$K_q^{app} = \frac{K_{KV}^{app}}{\tau_0}$$

que tem um valor independente das diferenças intrínsecas de microambientes para cada sonda. Assim as diferenças dos valores de K_q^{app} para os fármacos estudados reflectem apenas variações na frequência colisional dependentes da proximidade relativa do AINE à sonda.

Tabela III. Constante de Stern-Volmer (K_{SV}^{app}) e constante bimolecular aparente de desactivação de fluorescência (K_q^{app}) determinadas pela desactivação da fluorescência com a sonda de fluorescência DPH inserida em diferentes modelos de membranas celulares.

		K_{SV}^{app} ($\times 10^3$)M^{-1}	K_q^{app} ($\times 10^{11}$)$M^{-1}s^{-1}$
Lipossomas	Meloxicam	79,00	10,00
	Lornoxicam	123,50	15,63
	Nimesulide	58,40	7,39
Lipossomas	Meloxicam	76,50	9,68
com 30% de colesterol	Lornoxicam	114,70	14,52
	Nimesulide	61,10	7,73
Esplenócitos de rato	Meloxicam	47,60	6,03
	Lornoxicam	59,70	7,56
	Nimesulide	32,00	4,05
Monócitos humanos	Meloxicam	51,20	6,48
(linha celular HTP1)	Lornoxicam	58,00	7,34
	Nimesulide	30,70	3,89
Macrófagos de rato	Meloxicam	46,00	5,82
(linha celular J774)	Lornoxicam	59,00	7,47
	Nimesulide	26,30	3,33
Granulócitos humanos	Meloxicam	42,20	5,34
	Lornoxicam	59,30	7,51
	Nimesulide	26,30	3,33
Células mononucleares	Meloxicam	34,10	4,32
humanas	Lornoxicam	50,90	6,44
	Nimesulide	17,90	2,27

Pela análise dos valores de K_{SV}^{app} e de K_q^{app} pode concluir-se que todos os AINEs perturbaram a sonda DPH (Tabela III). Dado que quanto maior o valor de K_{SV}^{app} (e consequentemente o valor de K_q^{app}), maior a interacção do fármaco com o fluoróforo, então os valores obtidos em todos os sistemas membranares sugerem que a interacção

do fármaco com a sonda toma a seguinte ordem relativa: lornoxicam > meloxicam > nimesulide, o que poderia ser uma indicação da localização destes fármacos na bicamada fosfolipídica. No entanto, o facto da sonda se localizar ao longo de quase toda a matriz lipídica, permite afirmar que os três AINEs se localizam na bicamada, mas não permite inferir da localização exacta em que o fármaco preferencialmente se encontra. Contudo existem na bibliografia estudos feitos em lipossomas de EPC com sondas da série do ácido n-antroiloxiesteárico (n-AS) que inferem da localização destes três AINEs na membrana celular [Ferreira et al., 2003; Lúcio et al., 2006]. Encontra-se descrito no referido estudo que o nimesulide se localiza preferencialmente numa zona mais profunda da membrana (parte hidrofóbica) enquanto que o meloxicam e lornoxicam se localizam preferencialmente na zona mais externa da membrana (parte hidrofílica).

Da comparação dos valores de K_{SV}^{app} (e de K_{q}^{app}) ainda se pode verificar que a eficácia de desactivação de fluorescência foi mais evidente nos lipossomas e nos lipossomas contendo colesterol do que nas membranas celulares biológicas. Tal constatação pode estar relacionada com as diferenças estruturais dos dois tipos de sistemas membranares. O elevado grau de complexidade das membranas biológicas relativamente aos lipossomas pode fazer diminuir o espaço disponível na zona mais interna da membrana, dificultando o acesso do fármaco.

Para poder prever o efeito dos AINEs meloxicam, lornoxicam e nimesulide na fluidez das membranas celulares *in vivo* foi quantificado o efeito destes fármacos na fluidez de vários modelos membranares por anisotropia de estado estacionário usando a equação de Perrin (Equação 11). Os valores de anisotropia de estado estacionário obtidos por leitura directa das amostras (r_{ss}) podem reflectir uma alteração no tempo de vida do estado excitado do fluoróforo (τ') bem como uma alteração na microviscosidade da membrana com consequente alteração no tempo de correlação rotacional (θ) [Lúcio et al, 2004]. Desta forma, as medidas de anisotropia foram corrigidas para as variações dos τ', os quais, por sua vez, foram determinados através do estudo de desactivação de fluorescência colisional entre o fluoróforo e os AINEs desactivadores, visto que a desactivação de fluorescência colisional foi acompanhada de um decréscimo de intensidade de fluorescência e dos tempos de vida do estado excitado do fluoróforo

[Lacowicz, 1999]. Os valores de I_0/I obtidos experimentalmente e o prévio conhecimento do valor do tempo de vida característico de cada sonda descrito na literatura [Kaiser e London, 1998] permitiram efectuar o cálculo de τ'.

Depois de conhecidas as dificuldades apresentadas na determinação da fluidez por anisotropia de estado estacionário que obrigam à definição de condições para o seu estudo e considerando que as determinações experimentais foram efectuadas a temperaturas em que a membrana estivesse na fase fluida (≥25 °C). Deste modo consegue-se uma rotação praticamente desimpedida da sonda ($r_\infty = 0$) e qualquer variação de θ (tempo de relaxamento rotacional da sonda) será reflexo de uma real modificação da viscosidade membranar e não apenas consequência da limitação à rotação da sonda imposta pelo meio anisotrópico membranar [Lúcio et al., 2004], podem ser calculados os valores da anisotropia corrigida, r', pela equação 12. Estes valores de r', traduzem a variação da anisotropia obtida devida à variação dos tempos de vida da sonda (com correcção da influência da própria sonda na microviscosidade da membrana) e podem ser comparados com os valores experimentais de anisotropia (r_{ss}).

Para todos os sistemas membranares foram efectuados pelo menos três ensaios independentes com concentrações de 0 a 350μM para o meloxicam, de 0 a 300μM para o lornoxicam e de 0 a 120μM para o nimesulide. Nos ensaios realizados em membranas biológicas foram efectuados testes de viabilidade celular (3.9) antes da incorporação da sonda e após a realização dos ensaios, não se tendo verificado uma diminuição significativa da viabilidade após a realização dos ensaios.

Os valores dos tempos de vida no estado excitado do fluoróforo (τ') são calculados a partir da equação de Stern-Volmer para a desactivação da fluorescência colisional:

$$\frac{I_0}{I} = \frac{\tau_0}{\tau'}$$

e esta relação só é válida enquanto se verifica a linearidade da equação 2. Assim, os estudos de fluidez membranar foram efectuados apenas nos intervalos de concentração de fármaco em que se verificou aplicável a equação de Stern-Volmer. Estes intervalos de concentração dos três AINEs nos diferentes sistemas membranares correspondem aos intervalos de concentração ([Q]) apresentados nas tabelas IV a X, onde também se

encontram os valores da anisotropia no estado estacionário obtidos experimentalmente, r_{ss}, e os respectivos valores corrigidos, r', para a variação no tempo de vida do estado excitado do fluoróforo, τ'.

Tabela IV. Variação dos valores da anisotropia de estado estacionário (r_{ss}); anisotropia corrigida (r') e tempo de vida do estado excitado (τ') para a sonda DPH com concentrações crescentes (Q) de AINE em lipossomas de EPC (500μM; pH=7,4).

Meloxicam				Lornoxicam				Nimesulide			
Q (μM)	r_{ss}	r'	τ'	Q(μM)	r_{ss}	r'	τ'	Q (μM)	r_{ss}	r'	τ'
0,00	0,142	0,141	7,90	0,00	0,139	0,139	7,90	0,00	0,134	0,139	8,31
10,00	0,155	0,173	6,14	8,00	0,158	0,188	5,38	11,00	0,142	0,180	6,01
25,00	0,176	0,233	3,26	21,00	0,179	0,274	3,13	23,00	0,162	0,312	4,33
40,00	0,181	0,312	1,78	33,00	0,220	0,384	1,73	34,00	0,200	0,367	3,09
50,00	0,207	0,369	1,40	42,00	0,253	0,451	1,22	45,00	0,205	0,489	2,28
-	-	-	-	50,00	0,305	0,547	0,90	-	-	-	-

Tabela V. Variação dos valores da anisotropia de estado estacionário (r_{ss}); anisotropia corrigida (r') e tempo de vida do estado excitado (τ') para a sonda DPH com concentrações crescentes (Q) de AINE em lipossomas de EPC (500μM) com 30% de colesterol incorporado (pH=7,4).

Meloxicam				Lornoxicam				Nimesulide			
Q (μM)	r_{ss}	r'	τ'	Q(μM)	r_{ss}	r'	τ'	Q (μM)	r_{ss}	r'	τ'
0,00	0,309	0,309	7,90	0,00	0,340	0,309	7,90	0,00	0,233	0,233	7,90
10,00	0,329	0,387	5,95	8,00	0,340	0,387	6,62	11,00	0,240	0,304	5,87
25,00	0,351	0,547	3,70	21,00	0,340	0,547	4,56	23,00	0,253	0,402	4,32
40,00	0,372	0,708	2,46	33,00	0,384	0,708	3,25	34,00	0,273	0,529	3,24
50,00	0,385	0,823	1,87	42,00	0,363	0,823	2,54	45,00	0,275	0,646	2,35
-	-	-	-	50,00	0,363	0,912	1,80	-	-	-	-

Tabela VI. Variação dos valores da anisotropia de estado estacionário (r_{ss}); anisotropia corrigida (r') e tempo de vida do estado excitado (τ') para a sonda DPH com concentrações crescentes (Q) de AINE em esplenócitos de rato (1×10^6cels/mL; pH=7,4).

Meloxicam				Lornoxicam				Nimesulide			
Q (μM)	r_{ss}	r'	τ'	Q (μM)	r_{ss}	r'	τ'	Q (μM)	r_{ss}	r'	τ'
0,00	0,190	0,190	7,90	0,000	0,191	0,192	7,90	0,00	0,175	0,189	7,90
10,00	0,188	0,270	5,155	9,00	0,192	0,257	5,474	11,00	0,179	0,195	6,90
25,00	0,193	0,335	3,89	21,00	0,195	0,334	3,80	23,00	0,186	0,277	4,73
40,00	0,196	0,366	3,152	34,00	0,198	0,413	2,735	34,00	0,189	0,314	4,12
50,00	0,195	0,505	1,84	42,00	0,201	0,473	2,17	45,00	0,191	0,336	3,40
75,00	0,204	0,680	1,14	63,00	0,211	0,612	1,28	57,00	0,194	0,409	2,93
-	-	-	-	-	-	-	-	68,00	0,198	0,467	2,27

Tabela VII. Variação dos valores da anisotropia de estado estacionário (r_{ss}); anisotropia corrigida (r') e tempo de vida do estado excitado (τ') para a sonda DPH com concentrações crescentes (Q) de AINE em macrófagos de rato (linha celular J774) (1×10^6cels/mL; pH=7,4).

Meloxicam				Lornoxicam				Nimesulide			
Q (μM)	r_{ss}	r'	τ'	Q (μM)	r_{ss}	r'	τ'	Q (μM)	r_{ss}	r'	τ'
0,00	0,183	0,188	8,083	0,00	0,183	0,183	7,900	0,00	0,173	0,182	7,900
10,00	0,184	0,204	6,471	8,00	0,194	0,210	6,662	10,00	0,183	0,198	7,123
25,00	0,188	0,289	4,225	20,00	0,189	0,293	4,289	20,00	0,182	0,229	5,930
40,00	0,195	0,349	3,135	32,00	0,188	0,357	3,206	30,00	0,187	0,259	5,034
50,00	0,193	0,426	2,753	40,00	0,207	0,405	2,617	40,00	0,186	0,309	3,932
60,00	0,195	0,479	1,978	48,00	0,204	0,476	1,968	51,00	0,190	0,330	3,571
75,00	0,203	0,579	1,383	60,00	0,197	0,569	1,359	61,00	0,191	0,362	3,107
-	-	-	-	73,00	0,227	0,672	0,886	71,00	0,203	0,415	2,484

Tabela VIII. Variação dos valores da anisotropia de estado estacionário (r_{ss}); anisotropia corrigida (r') e tempo de vida do estado excitado (τ') para a sonda DPH com concentrações crescentes (Q) de AINE em monócitos humanos (linha celular HTP1) (1×10^6cels/mL; pH=7,4).

Meloxicam				Lornoxicam				Nimesulide			
Q (μM)	r_{ss}	r'	τ'	Q (μM)	r_{ss}	r'	τ'	Q (μM)	r_{ss}	r'	τ'
0,00	0,140	1,423	7,879	0,00	0,169	0,169	7,900	0,00	0,142	0,140	7,900
10,00	0,143	1,751	6,077	12,00	0,168	0,220	5,684	10,00	0,140	0,150	7,268
25,00	0,142	2,281	4,257	24,00	0,173	0,281	4,075	20,00	0,147	0,160	6,704
40,00	0,145	3,317	2,382	36,00	0,180	0,344	3,002	30,00	0,148	0,193	5,271
50,00	0,149	3,540	2,121	48,00	0,193	0,403	2,302	40,00	0,153	0,239	3,919
60,00	0,150	3,923	1,743	60,00	0,213	0,454	1,850	51,00	0,150	0,267	3,321
75,00	0,155	4,848	1,077	75,00	0,221	0,505	1,490	61,00	0,157	0,272	3,240
-	-	-	-	-	-	-	-	71,00	0,163	0,318	2,516

Tabela IX. Variação dos valores da anisotropia de estado estacionário (r_{ss}); anisotropia corrigida (r') e tempo de vida do estado excitado (τ') para a sonda DPH com concentrações crescentes (Q) de AINE em células mononucleares do sangue humano (1×10^6cels/mL; pH=7,4).

Meloxicam				Lornoxicam				Nimesulide			
Q (μM)	r_{ss}	r'	τ'	Q (μM)	r_{ss}	r'	τ'	Q (μM)	r_{ss}	r'	τ'
0,00	0,178	0,178	7,900	0,00	0,176	0,176	7,900	0,00	0,143	0,188	7,900
10,00	0,179	0,236	5,502	9,00	0,198	0,205	6,515	10,00	0,143	0,211	6,837
25,00	0,187	0,344	3,240	22,00	0,200	0,284	4,219	20,00	0,146	0,247	5,569
50,00	0,213	0,505	1,643	45,00	0,201	0,437	2,125	30,00	0,162	0,321	3,882
75,00	0,216	0,596	1,125	67,00	0,202	0,563	1,260	40,00	0,169	0,350	3,423
-	-	-	-	-	-	-	-	61,00	0,188	0,378	3,037

Tabela X. Variação dos valores da anisotropia de estado estacionário (r_{ss}); anisotropia corrigida (r') e tempo de vida do estado excitado (τ') para a sonda DPH com concentrações crescentes (Q) de AINE em granulócitos do sangue humano (1×10^6cels/mL; pH=7,4).

Meloxicam				Lornoxicam				Nimesulide			
Q (μM)	r_{ss}	r'	τ'	Q (μM)	r_{ss}	r'	τ'	Q (μM)	r_{ss}	r'	τ'
0,00	0,151	0,199	7,900	0,00	0,192	0,192	7,715	0,00	0,195	0,197	7,900
10,00	0,182	0,269	5,386	9,00	0,204	0,203	6,492	10,00	0,197	0,218	6,975
25,00	0,199	0,360	3,596	22,00	0,213	0,339	6,920	20,00	0,199	0,265	5,414
50,00	0,219	0,552	1,734	45,00	0,220	0,577	8,658	30,00	0,195	0,302	4,534
75,00	0,247	0,700	0,995	67,00	0,245	0,680	7,567	40,00	0,202	0,342	3,806
-	-	-	-	-	-	-	-	61,00	0,208	0,402	2,970

Tal como pode ser observado (Tabelas IV a X) os ensaios em membranas biológicas são feitos numa gama de concentrações mais elevada do que os ensaios em lipossomas e em lipossomas com colesterol, o que reflecte os intervalos de concentração onde a linearidade da equação de Stern-Volmer se verifica. Esta diferença mostra que a mesma quantidade de fármaco provoca uma maior alteração das propriedades físico-químicas das membranas que constituem os LUVs de EPC, mesmo contendo colesterol na sua constituição (um dos componentes que confere rigidez à membrana), do que nas membranas biológicas.

O efeito dos AINEs nos valores da anisotropia do estado estacionário e nos da anisotropia corrigida foi ilustrado graficamente com os exemplos das figuras 25 e 26, bem como as respectivas diferenças de r_{ss} e r'. A figura 26, apresenta apenas um exemplo, o do meloxicam em lipossomas (LUVs) de EPC, no entanto foram obtidos perfis semelhantes para os restantes fármacos tanto em LUVs de EPC como nestes com 30% de colesterol incorporado. A Figura 26 apresenta ainda o exemplo do meloxicam para células (linha celular J774), mas também neste caso se obtiveram perfis semelhantes para os tipos de células.

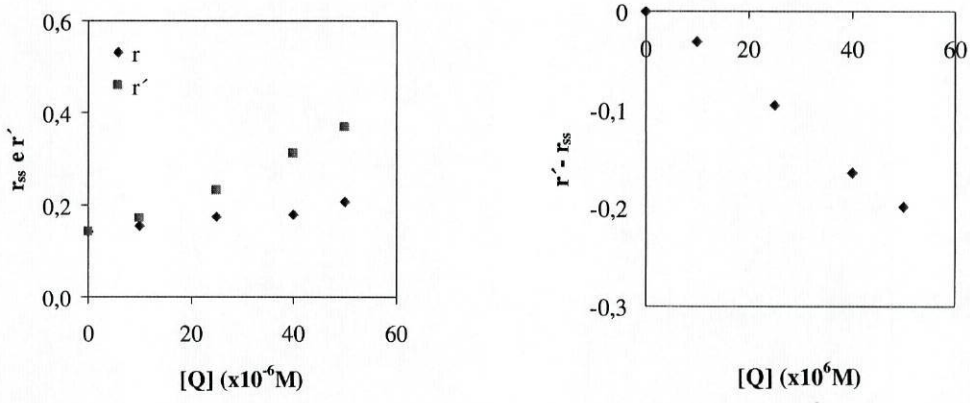


Figura 25. Efeito do meloxicam nos valores da anisotropia corrigida (r') e da anisotropia no estado estacionário experimental (r_{ss}) para a sonda DPH incorporada em lipossomas de EPC (500μM, pH=7,4), a 25°C.

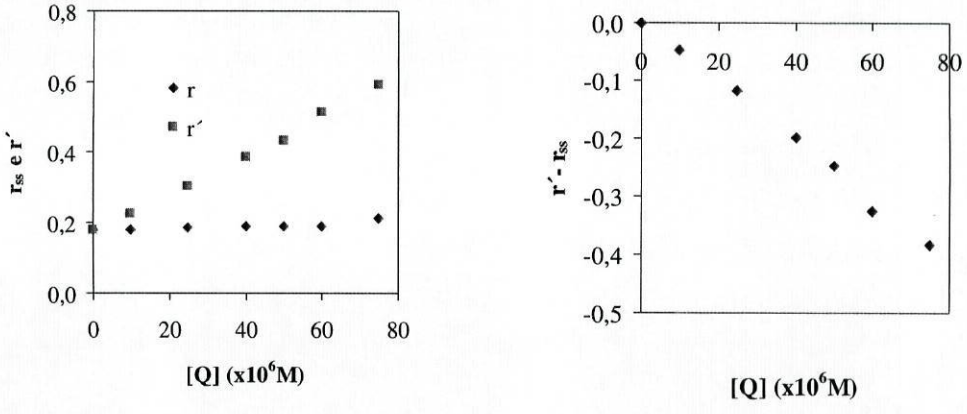


Figura 26. Efeito do meloxicam nos valores da anisotropia corrigida (r') e da anisotropia no estado estacionário experimental (r_{ss}) para a sonda DPH incorporada nas membranas dos macrófagos de ratinho da linha celular J774.

Da diferença de r_{ss} e r' obtém-se a variação real da anisotropia causada pelo fármaco sem a variação intrínseca devida ao decréscimo do tempo de vida da sonda de fluorescência. Em todos os sistemas membranares a diferença entre r_{ss} e r' (r_{ss}-r') decresce com concentrações crescentes de AINEs evidenciando a ocorrência de fluidificação da membrana pela presença de todos os fármacos estudados. Este efeito pode diferir, dependendo do AINE estudado ou do sistema onde se efectuou o estudo como evidenciam as Figuras 27, 28 e 29. A fluidificação causada nas membranas pelos AINEs é aqui representada como a percentagem do efeito de fluidificação:

$$\%Efeito\ de\ fluidificação = \frac{(r'-r_{ss})}{r_0'} \times 100$$

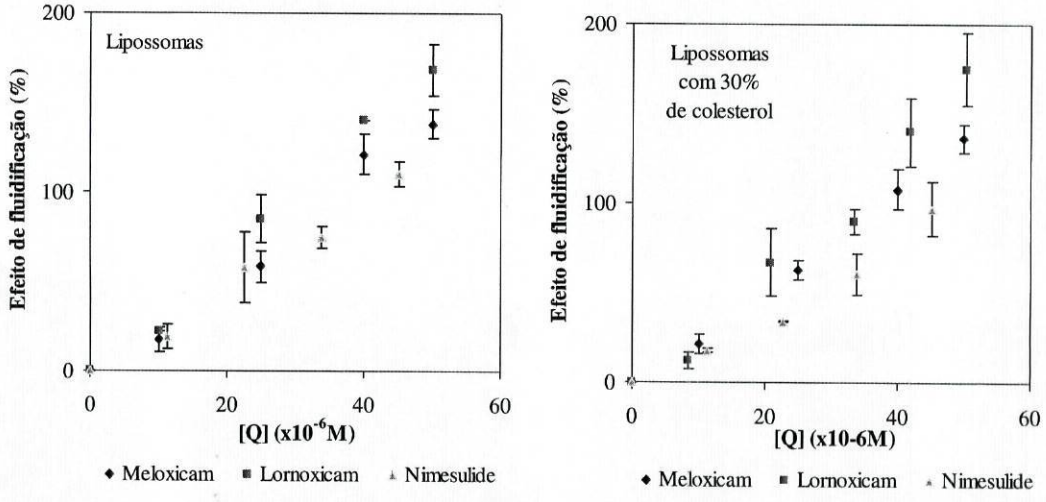


Figura 27. Efeito de fluidificação (%) obtido para a sonda DPH incorporada em lipossomas e em lipossomas com 30% de colesterol, com concentrações de 500μM em função das concentrações crescentes de meloxicam, lornoxicam e nimesulide (soluções em tampão hepes 10mM, pH=7,4 e I=0,1M). Os resultados correspondem à média e desvio padrão de pelo menos 3 ensaios independentes.

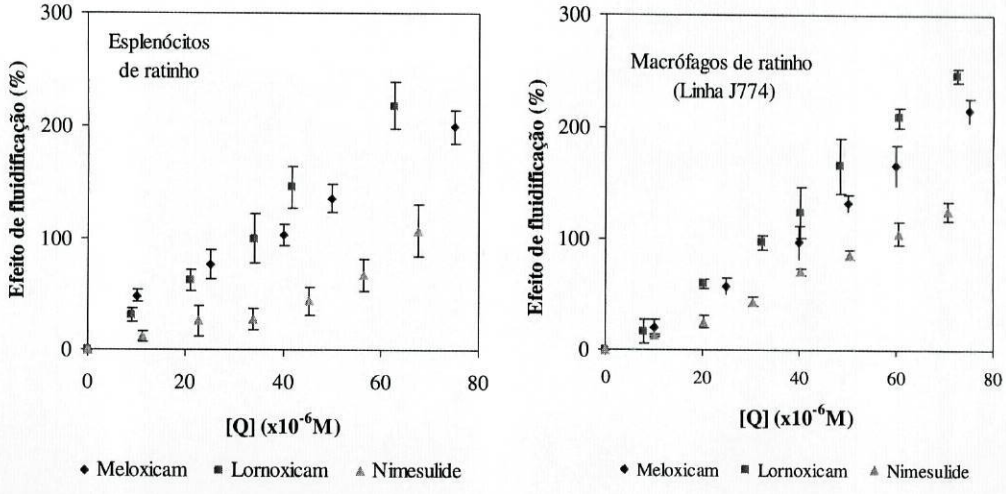


Figura 28. Relações de Stern-Volmer obtidas para a desactivação da fluorescência a 37,0°C da sonda DPH inserida nas membranas biológicas de esplenócitos e macrofagos de ratinho (linha celular J774), com concentrações de 1×10^{6}céls/mL em função das concentrações de meloxicam, lornoxicam e nimesulide (soluções em tampão hepes 10mM, pH=7,4 e I=0,1M). Os resultados correspondem à média e desvio padrão de pelo menos 3 ensaios independentes.

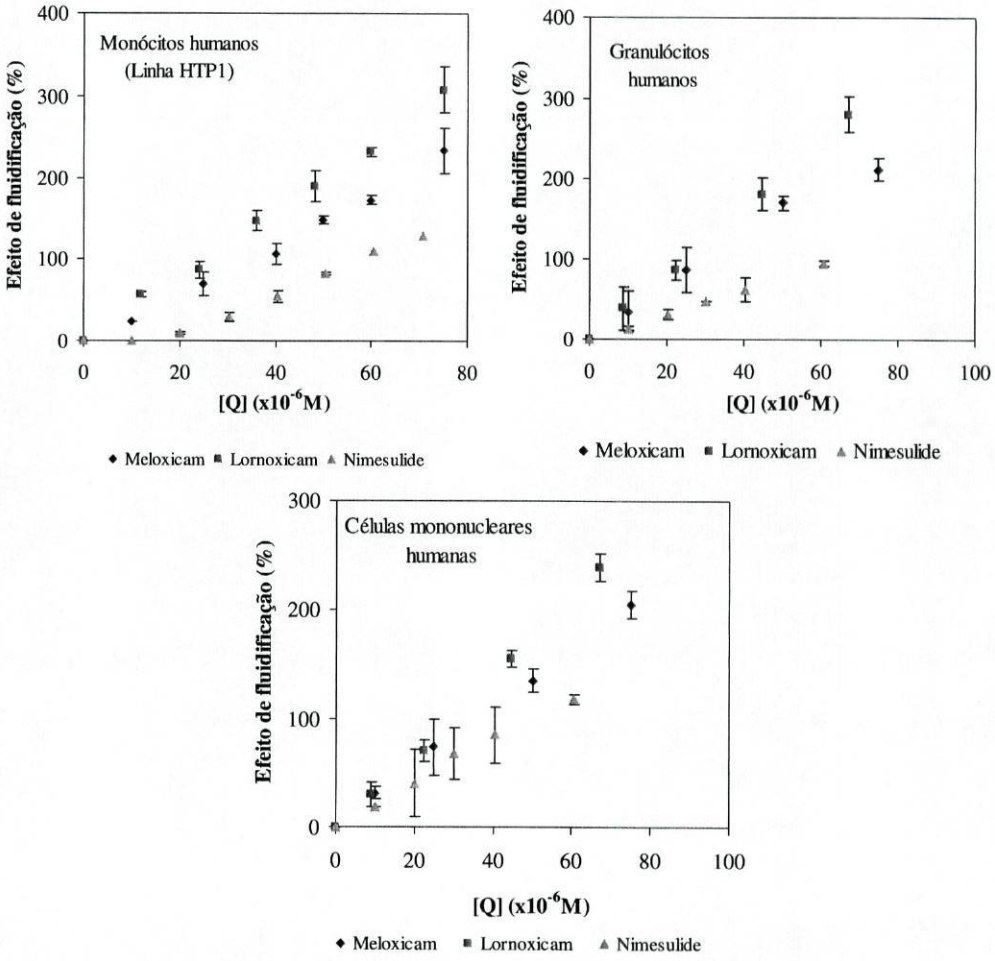


Figura 29. Relações de Stern-Volmer obtidas para a desactivação da fluorescência a 37,0°C da sonda DPH inserida nas membranas biológicas de monócitos humanos (linha celular HTP1), granulócitos e células monucleares humanas, com concentrações de 1×10^6céls/mL em função das concentrações de meloxicam, lornoxicam e nimesulide (soluções em tampão hepes 10mM, pH=7,4 e I=0,1M). Os resultados correspondem à média e desvio padrão de pelo menos 3 ensaios independentes.

Nos lipossomas de EPC com ou sem colesterol incorporado, os três AINEs estudados apresentam efeitos de fluidificação muito semelhantes, ainda que sugiram a ordem: lornoxicam > meloxicam > nimesulide. Contudo em todos as membranas biológicos estudados, o lornoxicam apresentou um efeito de fluidificação ligeiramente superior ao do meloxicam mas significativamente mais elevado que o efeito causado pelo nimesulide.

Estes resultados experimentais encontram-se em conformidade com resultados encontrados na literatura para estudos de efeito de fluidificação com os mesmos AINEs

em LUVs de EPC (500μM) com a sonda 12-AS incorporada, onde se refere que os AINEs apresentam a seguinte ordem de efeito de fluidificação: lornoxicam > meloxicam > nimesulide, sendo que para a mesma concentração de fármaco o efeito de fluidificação causado pelo nimesulide é significativamente inferior à dos dois outros AINEs [Ferreira et al., 2003; Lúcio et al., 2006].

De facto, verificou-se que a eficácia no aumento de fluidificação membranar apresenta uma ordem relativa: lornoxicam > meloxicam > nimesulide, sequência esta que também se verificou para os valores de K_{SV}^{app} determinados anteriormente. Este paralelismo entre as capacidades de aumentar a fluidificação membranar e de desactivar a sonda de fluorescência reflecte a capacidade do fármaco em induzir perturbações no microambiente que rodeia os locais onde se insere [Lacowicz, 1999].

A diferença de efeito de fluidificação verificada entre os três AINEs poderia ser justificada com base em diferenças como: constante de partição; pKa; a classe química das moléculas; bem como a sua localização na matriz lipídica. A classe química destes AINEs pode justificar a grande diferença de fluidificação verificada para o meloxicam e o lornoxicam em relação ao nimesulide, pois o meloxicam e o lornoxicam são ácidos enólicos (oxicamos) enquanto que o nimesulide é uma sulfanamida. Uma outra justificação para as diferenças verificadas no efeito de fluidificação pode ser a localização de cada AINE na bicamada lipídica. Como referido anteriormente o nimesulide localiza-se mais profundamente na membrana do que o meloxicam ou o lornoxicam o que também poderá ser uma justificação para a sua menor capacidade em aumentar a fluidez membranar [Ferreira et al., 2003; Lúcio et al., 2006]. Os logaritmos das constantes de partição (logP) octanol/solução aquosa (pH=7,4) e LUVs (de EPC)/ solução aquosa (pH=7,4) são apresentadas na tabela XI.

Tabela XI. Coeficientes de partição (log) dos AINES lornoxicam, meloxicam e nimesulide em octanol/solução aquosa (pH=7,4) e LUVs (de EPC)/solução aquosa (pH=7,4) obtidos por estudos de desactivação de fluorescência [Ferreira et al., 2003; Lúcio et al., 2006].

	Log (P)	
	Octanol/solução aquosa (pH=7,4)	LUVs (de EPC)/solução aquosa (pH=7,4)
Lornoxicam	1,8	2,65
Meloxicam	2,47	2,76
Nimesulide	2,6	2,58

A análise destes valores permite verificar que em octanol/solução aquosa (pH=7,4) logP (nimesulide) > logP(meloxicam) > logP(lornoxicam), enquanto que em LUVs (de EPC)/solução aquosa (pH=7,4), logP (meloxicam) > logP(lornoxicam) > logP(nimesulide), ainda que os três fármacos apresentem valores de K_p muito semelhantes. De facto, em LUVs (de EPC)/solução aquosa o nimesulide apresenta uma menor afinidade pela fase orgânica, o que também pode justificar a sua menor capacidade de fluidificar a membrana. Por outro lado, tanto em octanol/solução aquosa como em LUVs (de EPC)/solução aquosa, logP (meloxicam) > logP(lornoxicam) enquanto que o lornoxicam manifesta uma maior capacidade de fluidificação que o meloxicam. Este facto sugere que a constante de partição destes dois fármacos, por si só, pode não ser a justificação para o aumento da capacidade de fluidificação verificada.

O facto das moléculas que constituiem os fármacos se encontrarem na forma neutra, ou na forma ionizada, também podem influenciar a interacção destes com a membrana celular. Neste caso, dado que os ensaios foram realizados a pH=7,4, todos os AINEs estudados encontravam na forma aniónica. No entanto, o nimesulide a pH=7,4 está menos ionizado (pKa=6,56) do que os oxicamos (pKa_1(meloxicam)=1,1; pKa_2(meloxicam)=4,2 e pKa(lornoxicam)=4,7), o que mais uma vez corrobora o facto do nimesulide penetrar numa zona mais profunda da membrana, uma vez que, a forma neutra do fármaco penetra com mais facilidade na região hidrofóbica da bicamada [Lúcio et al., 2006]. Assim sendo, e como referido anteriormente, a diferença na localização destes fármacos na membrana poderá ser uma justificação para as suas diferentes capacidades em aumentar a fluidez membranar.

O facto das diferenças verificadas no efeito de fluidificação dos três AINEs ser mais evidente nas membranas biológicas do que nos lipossomas (com e sem colesterol) pode mais uma vez estar associado à diferente composição dos dois sistemas.

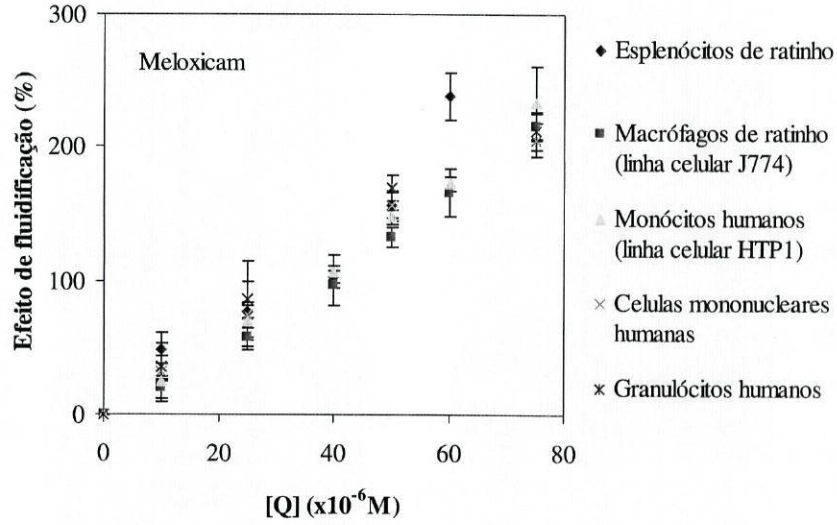


Figura 30. Efeito de fluidificação (%) obtido para a sonda DPH na presença de concentrações crescentes de meloxicam nas membranas de diferentes células, com concentrações de 1×10^{6}céls/mL em função da concentração de meloxicam (solução em tampão hepes 10mM, pH=7,4 e I=0,1M). Os resultados correspondem à média e desvio padrão de pelo menos 3 ensaios independentes.

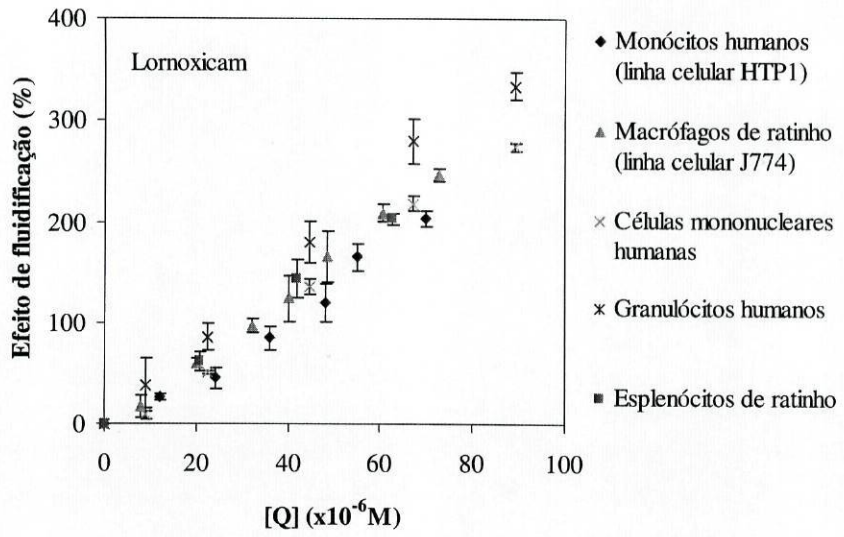


Figura 31. Efeito de fluidificação (%) obtido para a sonda DPH na presença de concentrações crescentes de lornoxicam nas membranas de diferentes células, com concentrações de 1×10^{6}céls/mL em função da concentração de lornoxicam (solução em tampão hepes 10mM, pH=7,4 e I=0,1M). Os resultados correspondem à média e desvio padrão de pelo menos 3 ensaios independentes.

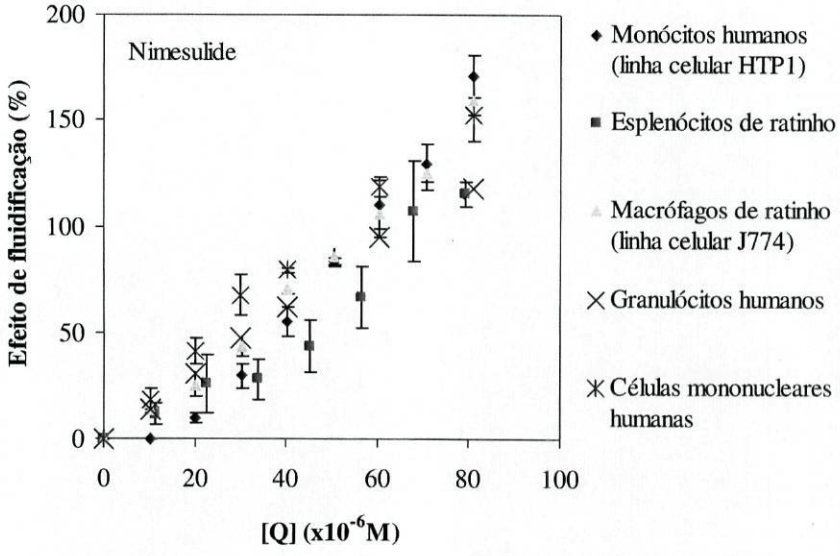


Figura 32. Efeito de fluidificação (%) obtido para a sonda DPH na presença de concentrações crescentes de nimesulide nas membranas de diferentes células, com concentrações de 1×10^{6}céls/mL em função da concentração de nimesulide (solução em tampão hepes 10mM, pH=7,4 e I=0,1M). Os resultados correspondem à média e desvio padrão de pelo menos 3 ensaios independentes.

O efeito de fluidificação (em percentagem) obtido para a sonda DPH na presença de concentrações crescentes dos AINEs estudados incorporados nas membranas de cinco diferentes tipos de células foi aproximadamente o mesmo (Figura 30, 31 e 32). Estes resultados experimentais mostram que para efeitos de estudo da fluidez membranar causada por crescentes concentrações de AINEs e monitorizada com a sonda DPH, foi indiferente a utilização de células de ratinho ou humanas, de células obtidas directamente de tecidos vivos (baço e sangue) ou de culturas de linhas celulares, o que se justifica dado que a constituição das membranas celulares é aproximadamente a mesma.

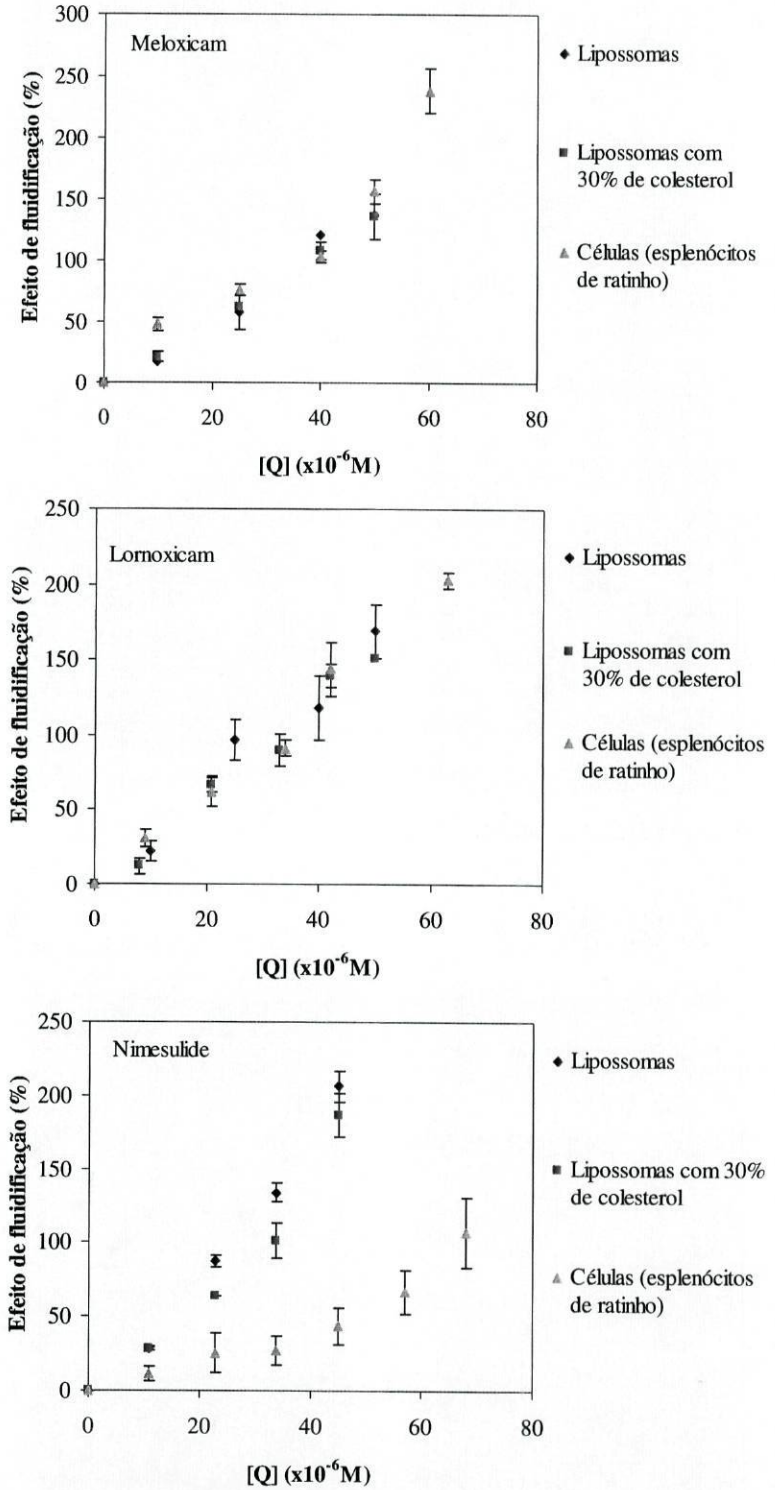


Figura 33. Efeito de fluidificação (%) obtido para a sonda DPH na presença de concentrações crescentes dos três AINEs estudados em modelos membranares de lipossomas de EPC e os mesmos com 30% de colesterol incorporado e em membranas biológicas de esplenócitos de ratinho. Os resultados correspondem à média e desvio padrão de pelo menos 3 ensaios independentes.

Tal como evidenciam os resultados experimentais representados na figura 33, para o estudo do efeito da fluidificação utilizando a sonda DPH na presença de concentrações crescentes de AINEs, a presença de colesterol nos lipossomas não altera significativamente os resultados experimentais.

O efeito de fluidificação causado pelo meloxicam e pelo lornoxicam foi muito semelhante para os lipossomas e para as células, no entanto o mesmo não se verifica no caso do nimesulide. Efectivamente, o efeito de fluidificação causado pelo nimesulide é superior nos lipossomas e nos lipossomas contendo colesterol em relação às membranas biológicas. Tal constatação pode estar relacionada com as diferenças estruturais entre os dois tipos de modelos membranares, bem como com a localização destes fármacos na membrana.

Para estabelecer comparações entre os AINEs estudados em termos de eficácia de fluidificação membranar foram determinados os respectivos valores de IC_{50}, os quais são definidos como a concentração de cada composto requerida para aumentar o efeito de fluidificação em 50% (Tabela XII) [Lúcio et al., 2004]. A determinação de IC_{50} de cada um dos fármacos estudados em cada sistema membranar foi feita através da representação gráfica da percentagem do efeito de fluidificação em função da concentração de fármaco [Q], para as quais foram obtidos ajustes lineares do tipo %Fluidificação = m × IC_n, em que o valor de m corresponde ao declive da recta. A partir da equação da recta, para EF=50% é possível determinar IC_{50}:

$$IC_{50} = \frac{50}{m}$$

Tabela XII. Valores de IC_{50} determinados para as relações lineares obtidas entre os efeitos de fluidificação detectados pela sonda DPH nos diferentes sistemas membranares estudados. Os resultados correspondem à média e desvio padrão de pelo menos 3 ensaios independentes.

	IC_{50} ($M \times 10^{-6}$)		
AINE	**Meloxicam**	**Lornoxicam**	**Nimesulide**
Lipossomas de EPC	14,8±0,8	14,8±0,1	21,2±0,7
Lipossomas de EPC (30% de colesterol)	15,4±0,5	15,4±0,5	25,8±0,8
Esplenócitos de ratinho	14,8±0,9	14,8±0,8	39,5±0,2
Macrófagos de ratinho (linha J774)	15,0±0,3	15,0±0,3	29,3±0,5
Monócitos humanos (linha HTP1)	14,5±0,2	14,5±0,5	30,5±0,3
Células mononucleares (sangue humano)	14,2±0,4	14,2±0,8	28,4±0,2
Granulócitos (sangue humano)	14,1±0,5	14,1±0,9	33,2±0,6

Quanto menor o valor de IC_{50}, menor a concentração de fármaco necessária para fluidificar a membrana e portanto maior é a eficácia do fármaco a induzir a fluidez membranar [Lúcio et al., 2004]. Assim pela análise dos IC_{50} determinados (Tabela XII) foi possível estabelecer a ordem de eficácia de fluidificação da membrana para os AINEs estudados: lornoxicam > meloxicam > nimesulide. Ainda que seja evidente que nos sistemas membranares biológicos o efeito de fluidificação do nimesulide é significativamente inferior ao do meloxicam e principalmente ao do lornoxicam.

O meloxicam e o nimesulide são AINEs selectivos da COX-2 enquanto que o lornoxicam é uma AINE que não apresenta selectividade. Por outro lado o meloxicam e lornoxicam pertencem ao grupo químico dos ácidos enólicos (oxicamos) enquanto que o nimesulide pertence ao grupo das sulfanamidas. Estas diferentes relações levam a crer que não são apenas as diferenças no grupo químico que determinam a selectividade dos AINEs e que outras propriedades físico-químicas, como por exemplo a capacidade de fluidificação da membrana celular, também podem influenciar a selectividade destes fármacos.

CAPÍTULO 5

CONCLUSÕES

Neste capítulo são apresentadas as conclusões referentes à análise da interacção dos AINEs meloxicam, lornoxicam e nimesulide com lipossomas (com e sem colesterol incorporado) e com membranas celulares de esplenócitos de ratinho, monócitos humanos, macrófagos de ratinho (linhas celulares HTP-1 e J774, respectivamente), granulócitos e células mononucleares humanas.

Dos valores de intensidade de fluorescência da sonda DPH obtidos com a adição de crescentes concentrações de fármaco, pode-se concluir que quanto maior a concentração de fármaco, maior a desactivação de fluorescência e portanto maior a interacção do fármaco com a sonda. Quanto maior o valor de K_{SV}^{app} (e

consequentemente maior o valor de K_q^{app}), maior a interacção do fármaco com a sonda, o que evidenciou que os três fármacos estudados, meloxicam, lornoxicam e nimesulide penetram a membrana fosfolipídica, ainda que a interacção do lornoxicam com a sonda seja superior à do meloxicam que por sua vez é superior à do nimesulide.

Os dados experimentais obtidos por anisotropia de estado estacionário, depois de corrigidos, permitiram determinar a variação real de anisotropia (r_{ss}-r') dos diferentes modelos membranares estudados marcados com a sonda de fluorescência DPH para crescentes concentrações de fármaco. Os AINEs meloxicam, lornoxicam e nimesulide causaram um decréscimo da anisotropia (r_{ss}-r') com concentrações crescentes de fármaco. Portanto todos os AINEs estudados provocam um aumento da fluidez membranar (diminuição da microviscosidade) de uma forma dependente da concentração. No entanto se apenas fossem tidos em conta os valores de anisotropia experimental (r_{ss}), sem qualquer correcção adicional, ter-se-ia verificado um ligeiro aumento destes valores para todos os fármacos em todos os sistemas membranares. Tal observação conduziria a uma conclusão oposta à real, que seria a de que um aumento de anisotropia implica um aumento da microviscosidade, ou seja, uma diminuição da fluidez membranar. Assim, estudos da fluidez membranar realizados com AINEs têm apresentado resultados díspares quanto à capacidade destes fármacos de aumentarem ou diminuírem a fluidez membranar e isto acontece porque em alguns casos a variação da anisotropia experimental de estado estacionário é interpretada sem qualquer correcção adicional [Lúcio et al., 2004].

Depois de concluir que os três fármacos estudados fluidificavam a membrana celular de uma forma dependente da concentração, estabeleceu-se um índice que permitisse comparar a eficácia de fluidificação membranar (IC_{50}). Quanto menor o valor de IC_{50}, menor a concentração de fármaco necessária para fluidificar a membrana e portanto maior é a eficácia do fármaco a induzir a fluidez membranar [Lúcio et al., 2004]. Pela observação dos valores de IC_{50} determinados é possível estabelecer a ordem de eficácia de fluidificação da membrana para os AINEs estudados: lornoxicam > meloxicam > nimesulide. Ainda que seja evidente que nas membranas biológicas o efeito de fluidificação do nimesulide é significativamente inferior ao do meloxicam e principalmente ao do lornoxicam.

Os resultados obtidos neste trabalho proporcionam a possibilidade de propor estudos que na sua sequência poderão vir a ser realizados: estudo de propriedades físico-químicas destes AINEs (e de outros fármacos) em lipossomas de diferentes composições, onde poderiam ser utilizados outros fosfolípidos, bem como a incorporação nas membranas de proteínas e enzimas membranares, de forma a aproximar cada vez mais estes sistemas das membranas biológicas; realização de estudos de fluidez membranar por anisotropia de estado estacionário em células com condições verificadas nas situações de inflamação (como por exemplo o pH), ou mesmo em células envolvidas num processo inflamatório; alargamento dos estudos realizados a outros AINEs e mesmo a outros fármacos, como por exemplo anti-tumorais onde alguns estudos apontam para uma relação entre a eficácia destes fármacos e a sua capacidade de fluidificação das membranas celulares; estudos da actuação destes AINEs no processo inflamatório, tanto ao nível das enzimas que participam neste processo (por exemplo as COX-1 e COX-2) como por exemplo ao nível do factor NF-kβ.

BIBLIOGRAFIA

Azevedo, C. (1999). *Biologia Celular e Molecular*. LIDEL-Edições Técnicas. Lisboa.

Beccerica, E., Piergiacomi, G., Curatola, G., Ferretti, G. (1989). Effect of antirheumatic drugs on lymphocyte membrane fluidity in rheumatoid arthritis: a fluorescence polarization study. *Pharmacology*, **38**: 16-22.

Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Stryer, L.(2002). *Biochemistry,* 26: 747-752. 5ª Edition, W.H. Freeman and Company. New York and Basingstore.

Bergethon, P.R., Simons, E.R. (1989). *Biophysical Chemistry – Molecules to Membranes*. Berlin: Springer-Verlag.

Bernatzky, G., Beubler, E., Dunky, A., Erlacher, I., Hermann, J., Herold, M., Hoerauf, K., Holzer, G., Kotz, R., Kress, H., Lampl, C., Leeb, B., Likar, R., Noe, C.R.,

Rainer, F., Sandkühler, J., Singer, F., Windhager, R. (2005). Lornoxicam. *Clinicum, Edição especial de Fevereiro de* 2005, 1-8.

Brenol, J.C.T., Xavier, R.M., Marasca, J. (2000). Anti-inflamatórios não hormonais (AINHs) convencionais. *Revista Brasileira de Medicina*, **57**.

Campos, L.S. (2002). *Entender a Bioquimica,* 5: 391-394, 6: 423-430. 4ªEdição, Escolar Editora. Lisboa.

Carvalho, W. A., Carvalho, R. D. S., Rios-Santos, F. (2004). Analgésicos inibidores específicos da ciclooxigenase-2: avanços terapêuticos. *Revista Brasileira de Anestesiologia*, **54**: 448-464.

Castanho, M., Prieto, M., Acuña, A. U. (1996). The transverse location of the fluorescent probe trans-parinaric acid in lipid bilayers. *Biochimica et biophysica acta,* **1279**: 164-168.

Chalpin, D., B., Kleinfeld, A. M. (1983). Interaction of fluorescence quenchers with the n-(9-anthroloxy) fatty acid membrane probes. *Biochimica et biophysica acta*, **731**: 465-474.

Costa, D., Marques, A. P., Reis, R. L., Lima, J. L. F. C., Fernandes, E. (2005). Inhibition of human neutrophil oxidative burst by pyrazolone derivatives. Free Radical *Biology & Medicine,* **40**: 632-640.

Coutinho, A., Costa, J., Faria, J. L., Berberan-Santos, M. N., Prieto, M. J. E. (1990). Dibucaine interaction with phospholipid vesicles. A ressonance energy-transfer study. *European Journal of Biochemistry, FEBS,* **189**, 387-393.

Coutinho, A., Prieto, M. (1993). Ribonuclease T_1 and alcohol dehydrogenase fluorescence quenching by acrylamide. *Journal of Chemistry Education*, **70**: 425-428.

Daughton, C.G.; Jones-Lepp, T.L. (2001). Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Environment: Scientific and Regulatory Issues, *Symposium Series: 791*. American Chemical Society: Washington, D.C..

Engelhardt, G., Homma, D., Schlegel, K., Schnitzler, C., Utzmann, R. (1996). General Pharmacology of Meloxicam-Part I: Effects on CNS, Gastric Emptying, Intestinal Transport, Water, Electrolyte and Creatinine Excretion. *General Pharmacology*, **27**(4): 673-677.

Esteves, A., Mota, A., Matias, A., Sebastião, A., Teixeira, A. A., Gouveia, A. M., Sarmento, A., Lima, B. S., Carvalho, B. M., Ribeiro, C. F., Moura, D., Araújo, D., Pereira, E. R., Brandão, F., Vale, F. M. d., Almeida, F., Teixeira, F., Rodrigues, H. L., Azevedo, I., Ribeiro, J. A., Tavares, J. C., Gonçalves, J., Polónia, J., Almeida, J. A. F. d., Garrett, J., Monteiro, J. G., Rico, J. M. G. T., Nunes, J. P., Matos, M. B., Silva, M. V. d., Pestana, M., Garrett, M. C., Caramona, M. M., Castro, M., Silva, P. S. d., Begonha, R., Ivo, R. d. S., Guimarães, S., Magina, S., Macedo, T. R. A., Durão, V., Osswald, W. (2001). *Terapêutica medicamentosa e suas bases farmacológicas*. 4ª edição, Porto Editora, Lda.. Porto.

Ferreira, H., Lúcio, M., Castro, B., Gameiro, P., Lima, J. L. F. C., Reis, S. (2003). Partition and location of nimesulide in EPC lipossomes: a spectrophotometric and fluorescence study. *Analytica and Bioanalytical Chemistry*, **377**: 293-298.

Ferreira, H., Lucio, M., Lima, J. L. F. C., Cordeiro-da-Silva, A., Tavares, J., Reis, S. (2005). Effect of anti-inflammatory drugs on splenocyte membrane fluidity. *Analytical Biochemistry*, **339**: 144-149. **a)**

Ferreira, H., Lucio, M., Siquet, C., Reis, S. (2005). Utilização de modelos membranares na avaliação da actividade de fármacos. *QUÍMICA*, **099**: 39-51. **b)**

Freshney, R. I. (1986). *Animal Cell Culture – A Pratical Approach. Second Edition*, Irlpress, Oxford University.

Gómez-Hens, A., Fernández-Romero, J- M. (2005). The role of liposomes in analytical processes. *Analytical Chemistry*, **24**: 9-19.

Gonçalves, M. L. S. S., (2001). *Metodos instrumentais para análise de soluções – Analise Quantitativa*. 4ªEdição, Fundação Calouste Gulbenkian. Lisboa.

Hope, M. J., Bally, M. B., Webb, G., Cullis, P. R. (1986). Production of large unilamellar vesicles by a rapid extrusion procedure. Characterization of size distribution, trapped volume and ability to maintain a membrane potential. *Biochimica et Biophysica acta*: **812**: 55-65.

Houslay, M.D., Stanley, K. K. (1982). Dynamics *of Biological membranes - influence on synthesis, structure and function.* London: John Wiley & Sons.

Jones, M. N.,Chapman, D. (1995). *Micelles, monolayers and biomembranes.* New York: Wiley-Liss Inc.

Junqueira, L.C., Carneiro, J. (2004). *Histologia Básica.* 10ªEdição, Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, 12: 222-226.

Kaiser, R. D., London, E. (1998). Location of diphenylhexatriene (DPH) and its derivatives within membranes: comparison of different fluorescence quenching analysis of membrane depth. *Biochemistry*, **37**: 8180-8190.

Knazek, R. A., Liu, S. C., Dave, J. R., Christy, R. J., Keller, J. A. (1981). Indomethacin causes a simultaneous decrease of both prolactin binding and fluidity of mouse liver membranes. *Prostaglandins and Medicine*, **6**: 403-411.

Kumar, V., Abbas, A., Fausto, N. (2005). *Robbins & Cotran pathologic basics of disease.* Elsevier.

Kyrikou, I., Hadjikakou, S.K., Kovala-Demertzi, D., Viras, K., Mavromoustakos, T. (2004). Effects of non steroid anti-inflammatory drugs in membrane bilayers. *Chemistry and Physics of Lipids*, **132**: 157-169.

Lacowicz, J.R. (1999). *Principles of Fluorescence Spectroscopy.* Second edition, Kluwer Academic/Plenum Press, New York.

Lasic, D. D. (1993). *Liposomes - from Physics to Applications.* Elsevier. New York.

Lentz, B., Freire, E., Biltonen, R.L. (1978). *Biochemistry*, **17**: 4475-4480.

Lichtenberger, L. M., Wang, Z. M., Romero, J. J., Ulloa, C., Perez, J. C., Giraud, M. N., Barreto, J. C. (1995). Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) associated with zwitterionic phospholipids: insight into the mechanism and reversal of NSAID- induced gastrointestinal injury. *Nature Medicine*, **1**: 154-158.

Loura, L. M. S., de Almeida, R. F. M., Coutinho, A., Prieto, M. (2003). Interaction of peptides with binary phospholipid membranes: application of fluorescence methodologies. *Chemistry and Physics of Lipids*, **122**: 77-96.

Lúcio, M., Ferreira, H., Lima, J. L. F. C., Matos, C., Castro, B., Reis, S. (2004). Influence of some anti-inflammatory drugs in membrane fluidity studied by fluorescence anisotropy measurements. *Physical Chemistry, Chemical Physics*, **6**(7): 1493-1498.

Lúcio, M., Ferreira, H., Lima, J. L. F. C., Reis, S. (2006). Interactions between oxicams and membrane bilayers: na explanation for their different COX selectivity. *Medicinal Chemistry*, **2** (5): 447-456.

Marcelino, J. M. V. (2005). *Avaliação do Efeito de Poluentes Organicos na Membrana Celular. Dissertação de Mestrado*. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.

Matos, C. M. S. (2001). *Interacção de Fármacos com Lipossomas. Efeito nas propriedades físico-químicas*. Dissertação de Doutoramento, Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.

Moreira, C.(2000). Os AINEs na artrite reumatóide. *Revista Brasileira de Medicina*, **57**.

Moreno, M. J., Prieto, M. (1993). Interaction of the peptide hormone adrenocorticotropin ACTH (1-24), with a membrane model system: a fluorescence study. *Photochemistry and Photobiology*, **57**: 431-437.

New, R. R. C. (1990). *Liposomes - a practical approach*. Oxford University Press. New York.

Perkins, W. R., Minchey, S. R., Ahl, P. L., Janoff, A. S. (1993). The determination of liposome captured volume. *Chemistry and Physics of Lipids*, **64**: 197-217.

Rang, H.P., Dale, M.M., Ritter, J.M. (1999). *Pharmacology*. Fourth Edition, Churchill Livingstone.

Robertis, E., Robertis, E. M. Jr. (1996). *Biologia Celular e Molecular*. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa.

Santos, N. C., Castanho, M. A. R. B. (2002). Lipossomas: a bala mágica acertou? *Química Nova*, **25** (6B).

Santos, N. C., Prieto, M., Castanho, M. A. R. B. (1998). Interaction of the major epitope region of HIV protein gp41 with membrane model systems. A fluorescence spectrodcopy study. *Biochemistry*, **37**: 8674-8682.

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

Singh, S., Sharda, N., Mahajan, L. (1999). Spectrophotometric determination of pka ok nimesulide. *International Journal of Pharmaceutics*, **176**: 261-264.

Tavares, I.A., Bishai, P.M., Bennett, A. (1995). Activity of nimesulide on constitutive and inducible cyclooxygenase. *Arzncimittelforschung*, **45**: 1093-1095.

Uchida, T., Nagai, Y., Kawasaki, Y., Wakayama, N. (1981). Fluuorospectroscopic Studies of various Ganglioside and Ganglioside-Lecithin dispersions. Steady-state and time-resolved fluorescence measurements with 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene. *Biochemistry*, **20**: 162-169.

Vane J R, Botting J, Botting R M. (1996). *Improved Nonsteroidal Anti Inflammatory Drugs-COX-2 Enzyme Inhibitors.* London: Kluwer Academic Publishers.

Wang, R., Hosaka, M., Han, L., Yokota-Hashmoto, H., Suda, M., Mitsushima, D., Torii, S., Takeuchi, T. (2006). Molecular probes for sensing the cholesterol composition of subcellular organelle membranes. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1761**: 1169-1181.

Willard, H. H., Merritt, L. L., Dean, J. A. (1965). *Instrumental Methods of Analisys.* 4ªEdition, Nostrand Company, Inc., New York.

FACULDADE DE FARMÁCIA DO PORTO BIBLIOTECA