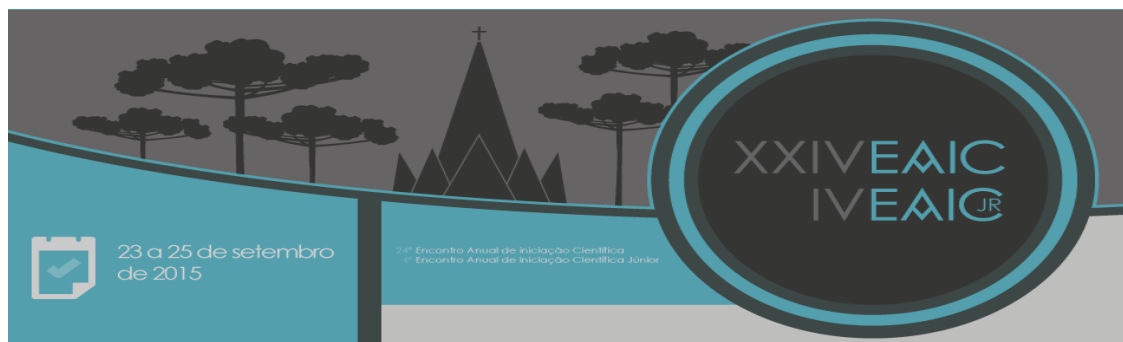




USO DE XANTENOS NO ESTUDO DO TRANSPORTE DE ÁCIDOS GRAXOS ATRAVÉS DA BICAMADA LIPÍDICA

Marcos Felipe Moura do Amaral (PIBIC/CNPq/Uem), Flávia Amanda Pedroso de Moraes (Mestranda/IQ/UEM), Camila Fabiano de Freitas (Doutoranda/IQ/UEM), Kellen Brunaldi (Orientadora) e-mail: kbrunaldi@gmail.com

Universidade Estadual de Maringá / Departamento de Ciências Fisiológicas, Maringá, PR.

Área CNPq: Ciências Biológicas, Fisiologia, Biofísica

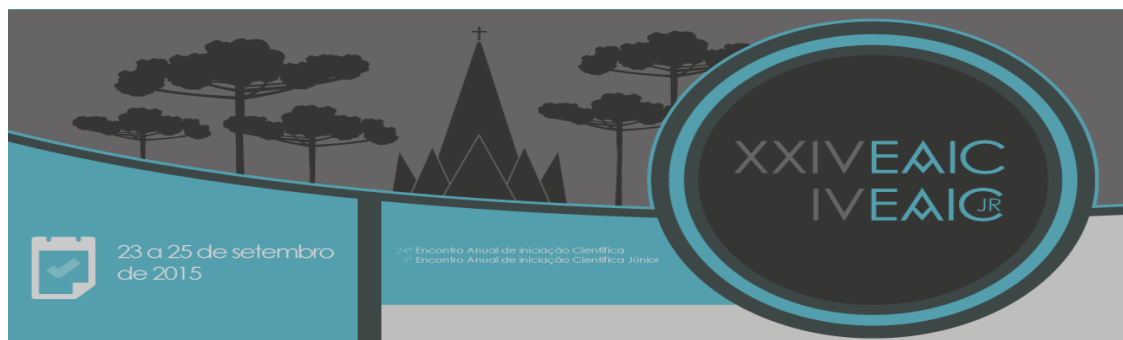
Palavras-chave: ácidos graxos, xantenos, membrana.

Resumo

O objetivo deste trabalho foi avaliar a aplicabilidade do xanteno halogenado hidrossolúvel eritrosina (ERI) e o seu derivado éster, lipossolúvel ERIDEC como sondas fluorescentes para o estudo do transporte de ácidos graxos de cadeia longa (AG) através de membranas. Lipossomas (large unilamellar vesicles – LUVs) de fosfatidilcolina de ovo (egg-PC) contendo ERI encapsulada ou ERIDEC inserida na bicamada lipídica foram formados por extrusão. A adição de ácido oléico (AO) nas concentrações de 5, 10, 15 e 20 μM a LUVs encapsuladas com ERI causou uma redução, dose dependente, da intensidade de fluorescência de emissão, correspondente a uma redução do pH no interior das LUVs de 0.23, 0.51, 0.73 e 1.24 unidades de pH, respectivamente. Entretanto, a adição das mesmas concentrações de AO à LUVs com ERIDEC não produziu mudanças significativas no espectro de emissão, ou seja, a ERIDEC não respondeu à inserção de cargas negativas dada pela ligação da forma ionizada do AO à bicamada lipídica. Conclui-se que ERI pode ser utilizada como uma sonda de pH para o estudo do transporte de AG através da bicamada lipídica enquanto que o mesmo não se aplica à ERIDEC.

Introdução

Compreender o mecanismo de entrada e saída de ácidos graxos de cadeia longa (AG) através da membrana celular é importante para o desenvolvimento de estratégias farmacológicas para o tratamento da obesidade, resistência à insulina e diabetes mellitus do tipo 2.



AG atravessam membranas por difusão simples (flip-flop) da forma protonada do AG, o qual libera H^+ para o interior da célula, produzindo uma queda mensurável do pH interno. A taxa de acidificação, medida com sondas fluorescentes sensíveis à pH, reflete as cinéticas de ligação e flip-flop do AG (KAMP et al., 2003).

Neste projeto, em parceria com o NUPESF (Núcleo de Pesquisa de Sistemas Fotodinâmicos) da Universidade Estadual de Maringá, avaliamos a aplicabilidade de xantenos halogenados eritrosina (ERI) e o seu derivado éster com 10 carbonos ERIDEC como sondas fluorescentes para o estudo do transporte de AG através de membranas.

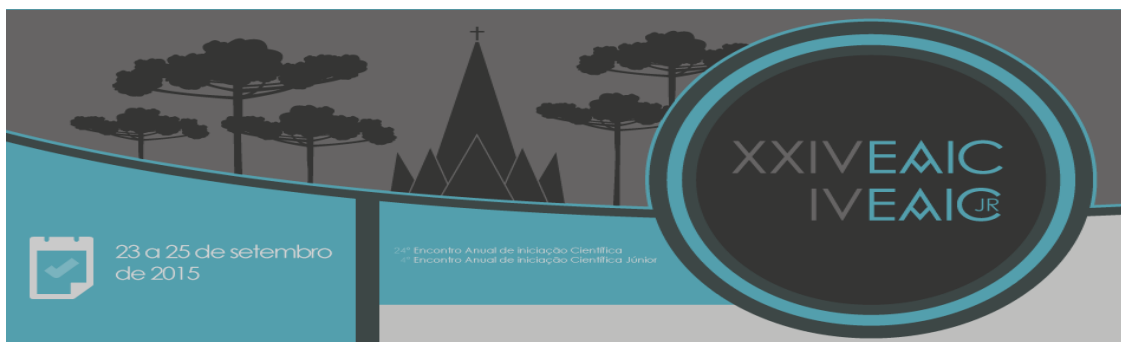
Materiais e métodos

Lipossomas (large unilamellar vesicles – LUVs) de fosfatidilcolina de ovo (egg-PC) foram formados por extrusão. Um filme lipídico (25 mg de egg-PC em clorofórmio, seguida de evaporação do solvente) foi hidratado em um tampão com 25 mM HEPES/KOH (pH 7.4) por 1 hora, à temperatura ambiente. Em seguida, a suspensão de egg-PC foi submetida a 5 ciclos de congelamento/descongelamento com N_2 líquido e a extrusão (12 ciclos) com um mini-extrusor. O encapsulamento do xanteno hidrossolúvel ERI foi realizado durante a hidratação do filme (concentração final de 2.5×10^{-5} mol/l). A ERI não encapsulada foi removida por filtração com Sephadex G25. Para inserir o derivado éster ERIDEC na bicamada lipídica, LUVs foram incubadas com ERIDEC (~ 1 mol% em relação a egg-PC), por 3 horas, à temperatura ambiente. Os espectros de emissão foram registrados com um fluorímetro (excitação 495 nm) antes e após à adição de ácido oleico (solução estoque de 1mM de AO/DMSO) ao tampão externo. A relação entre o pH no interior das LUVs e a intensidade de fluorescência da ERI foi calibrada por permeabilização das LUVs a H^+ com nigericina a $2\mu M$. O pH externo foi ajustado com KOH/ H_2SO_4 .

Resultados e Discussão

Para avaliar a resposta da ERI à acidificação do interior das LUVs causada pelo flip-flop do AO, espectros de emissão da ERI encapsulada em LUVs foram registrados na presença de AO. Como mostrado na Fig.1, o AO causou uma redução, dose dependente, da intensidade de fluorescência.

O ionóforo nigericina permeabiliza a bicamada lipídica à H^+ . O espectro de emissão da ERI em LUVs com nigericina é dependente de pH, com deslocamento do pico de emissão a pHs mais baixos (BATISTELA et al., 2011) (Fig.2). A partir da curva pH versus intensidade de fluorescência (Fig.3), as intensidades de fluorescência da Fig.1 foram convertidas em pH, como



mostrado na tabela 1. A redução do pH causada pelo AO foi comparável aos pHs reportados com a sonda de pH piranina (BRUNALDI et al., 2007).

Considerando que todo o sinal de fluorescência é gerado pela ERI encapsulada, os resultados indicam que o AO entregou H^+ para o interior das LUVs, acidificando o seu conteúdo. Portanto, a ERI pode ser utilizada como uma sonda de pH para o estudo do transporte de AG através da bicamada lipídica.

Em uma segunda etapa, foi avaliado o uso do xanteno lipossolúvel ERIDEC para detecção da ligação do AO à bicamada lipídica. Esperava-se uma redução da fluorescência em resposta a ligação da espécie ionizada do AG à membrana, similar ao reportado com a sonda de superfície FPE (BRUNALDI et al., 2007). Entretanto, a adição de AO à LUVs com ERIDEC não produziu mudanças significativas no espectro de emissão da ERIDEC (Fig. 4).

Tabela 1

[AO] (μM)	I_{557} (nm)	pH	Delta pH
0	376,14	7,72	
5	366,30	7,49	0,23
10	353,88	7,20	0,51
15	344,44	6,98	0,73
20	322,60	6,48	1,24

Tab.1: Conversão da intensidade de fluorescência a 557 nm (I_{557}) em pH para cada dose de AO adicionada a LUVs.

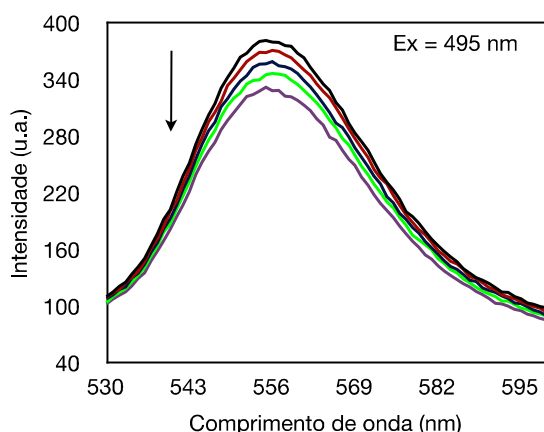


Fig.1.: Espectro de emissão da ERI encapsulada em LUVs de egg-PC (2,5 mg/ml) na presença de AO (0, 5, 10, 15 e 20 μM).

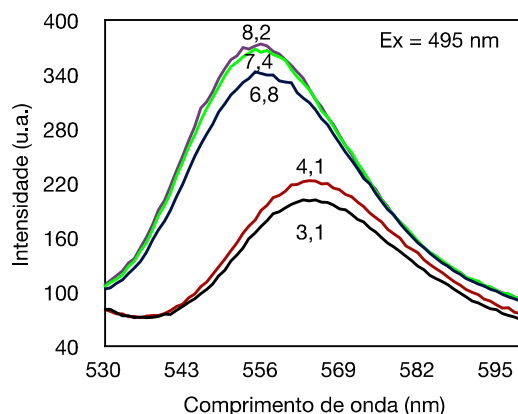


Fig.2.: Espectro de emissão da ERI encapsulada em LUVs de egg-PC (2,5 mg/ml) com nigericina frente a diferentes pHs

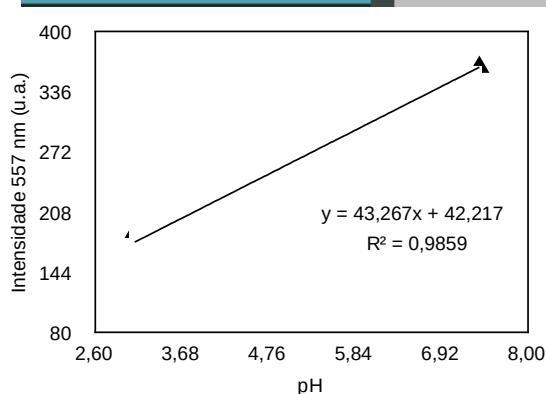
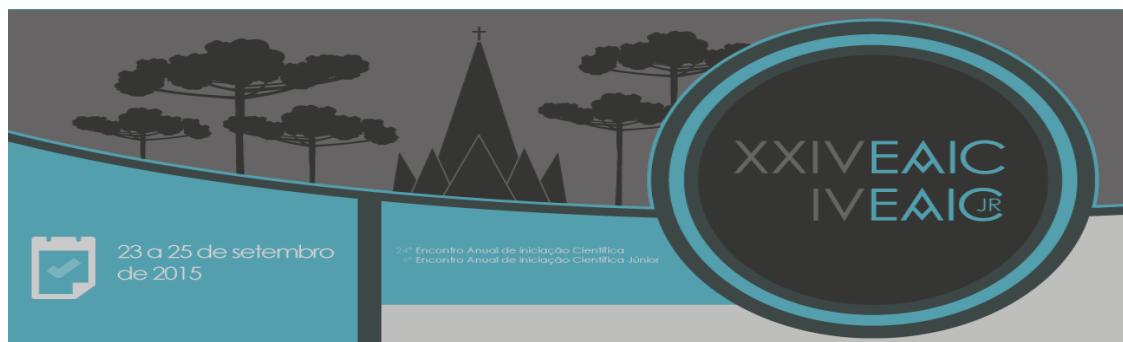


Fig.3.: pH *versus* intensidade de fluorescência (557 nm) da ERI encapsulada em LUVs de egg-PC (2,5 mg/ml) permeabilizadas com nigericina.

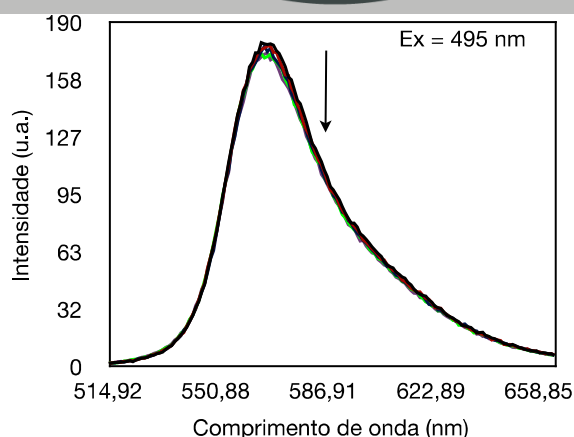


Fig.4.: Espectro de emissão da ERIDEC incorporada em LUVs de egg-PC (1,87 mg/ml) na presença de AO (0, 5, 10, 15 e 20 μ M).

Conclusões

Conclui-se que ERI pode ser utilizada como uma sonda de pH para o estudo do transporte de AG através da bicamada lipídica enquanto que o mesmo não se aplica à ERIDEC.

Agradecimentos

CNPq.

Referências

BATISTELA, V.R.; PELLOSI, D.S.; SOUZA, F.D.; COSTA, W.F.; SANTIN, S.M.O.; SOUZA, V.R.; CAETANO, W.; OLIVEIRA, H.P.M; SCARMINIO, I.S.; HIOKA, N. pKa determinations of xanthene derivates in aqueous solutions by multivariate analysis applied to UV-Vis spectrophotometric data. **Spectrochimica Acta Part A**, v. 79, p. 889-897, 2011.

BRUNALDI, K.; J. SIMARD, F.; KAMP, C.; REWAL, T.; ASAWAKARN, P.; O'SHEA, P.; HAMILTON, J. Fluorescence assays for measuring fatty acid binding and transport through membranes. **Methods Mol. Biol.**, v. 400, p. 237-255, 2007, 2007.

KAMP, F.; GUO, W.; SOUTO, R.; PILCH, P.F.; CORKEY, B.E.; HAMILTON, J.A. Rapid flip-flop o oleic acid across the plasma membrane of adipocytes. **J. Biol. Chem.** v. 278, p. 7988-7995, 2003.