

## AVALIAÇÃO DA LIGAÇÃO DO ÁCIDO 2 $\alpha$ -HIDROXI-OLÉICO À BICAMADA LIPÍDICA DE LIPOSSOMAS E SEU IMPACTO NA FLUIDEZ DE MEMBRANA

Sophia Hellen de Assis Domingues (PIBIC/CNPq/UEM), Marcos William Crisóstomo Silva (PIBIC/CNPq/UEM), Kellen Brunaldi (Orientadora). E-mail: kbrunaldi@uem.br.

Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Biológicas, Maringá, PR.

**Área e subárea do conhecimento:** Ciências Biológicas, Biofísica/Biofísica Molecular

**Palavras-chave:** minerval; glioblastoma; vesícula.

### RESUMO

O ácido 2 $\alpha$ -hidroxiloléico (2OHAO) parece ser uma alternativa promissora ao tratamento do glioblastoma multiforme humano (GBM), um tumor cerebral incurável. O alvo principal do 2OHAO é a membrana celular, onde promove alterações na composição lipídica que impactam a fluidez de membrana. O objetivo deste projeto foi avaliar a relação entre fluidez de membrana e a ligação do 2OHAO à bicamada lipídica de lipossomas livres de proteínas. Para tal, LUVs (*large unilamellar vesicles*) de palmitoil-oleoil-fosfatidilcolina (POPC), contendo as sondas lipofílicas e fluorescentes pireno e FPE (N-fluoresceína-5-tiocarbamoil-1, 2, dihexadecanoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina), foram incubadas com concentrações crescentes de 2OHOA. O 2OHAO causou uma redução dose-dependente da razão entre as intensidades de fluorescência emitidas pelos excímeros e monômeros de pireno (razão E/M), sugestivo de redução da fluidez de membrana. A sonda FPE, sensível a cargas de superfície de membrana, também apresentou uma redução dose-dependente da sua fluorescência. Este resultado foi interpretado como ligação do 2OHOA carregado negativamente à membrana. Conclui-se que o efeito redutor da fluidez de membrana pelo 2OHAO está, em parte, associado a uma interação direta da forma livre do 2OHAO com os lipídios de membrana. Esse efeito pode ser relevante para o potencial terapêutico do 2OHAO no tratamento do GBM, uma vez que a fluidez de membrana afeta vários processos celulares importantes.

### INTRODUÇÃO

O ácido 2 $\alpha$ -hidroxiloléico (2OHAO – nome comercial Minerval<sup>®</sup>; Figura 1) parece ser uma alternativa promissora ao tratamento do glioblastoma multiforme humano (GBM), um tumor cerebral incurável. O 2OHAO produz um acúmulo de esfingomielina na membrana celular das células cancerígenas, produzindo uma redução da fluidez de membrana com modulação da atividade de proteínas de membrana envolvidas na proliferação celular (MARTIN et al., 2013). No entanto, é desconhecido o papel da interação direta do 2OHAO com os componentes lipídicos da membrana celular na fluidez de membrana.

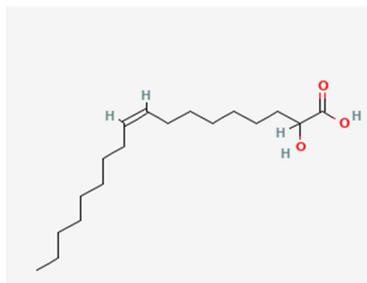


Figura 1. Estrutura química do 2OHAO

Portanto, o objetivo deste projeto foi avaliar a relação entre fluidez de membrana e a ligação do 2OHAO na bicamada lipídica de lipossomas livres de proteínas, um modelo biomimético da membrana celular. Para tal, medidas de fluorescência no estado estacionário foram obtidas com as sondas fluorescentes e lipofílicas pireno, sensível a fluidez de membrana, e FPE (N-fluoresceína-5-tiocarbamoil-1, 2, dihexadecanoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina), sensível a cargas de superfície.

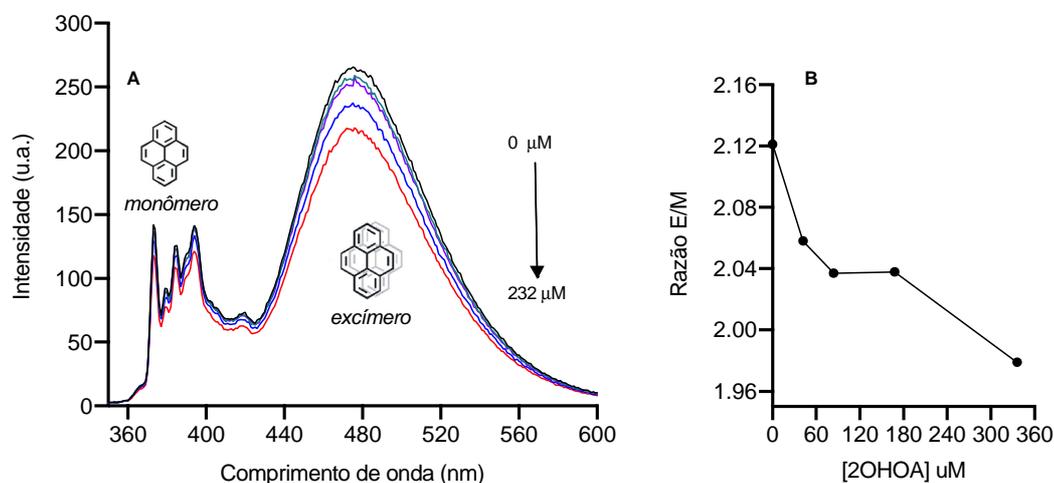
## MATERIAIS E MÉTODOS

Lipossomas do tipo LUV (*large unilamellar vesicle*) de palmitoiloleoilfosfatidilcolina (POPC) foram preparados pelo método de filme fino, seguido de extrusão (Brunaldi et al, 2007). O tampão utilizado foi trizma base 25 mM e KCl 150 mM (pH 7,4). As LUVs (300  $\mu$ M de POPC) foram incubadas com as sondas fluorescentes pireno (9 mol%) e FPE (0,4 mol%) por 20 minutos (temperatura ambiente) e por 3 horas (37 °C), respectivamente. As medidas de fluorescência no estado estacionário foram obtidas por meio de um fluorímetro Cary Eclipse Varian. O pireno foi excitado em 340 nm. A razão E/M do pireno foi calculada como a razão entre as intensidades em 373 nm (monômeros) e 473 nm (excímeros). O FPE foi excitado em 490 nm.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

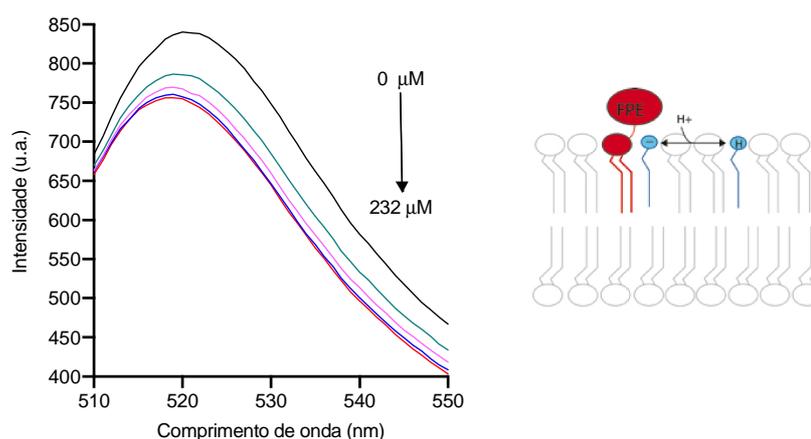
A fluidez de membrana foi avaliada por meio da sonda lipofílica e fluorescente pireno. Como apresentado na figura 2A, os espectros de emissão do pireno incorporado as LUVs apresentaram os picos característicos referentes aos monômeros (388 nm) e excímeros (484 nm) de pireno. A titulação das LUVs com concentrações crescentes de 2OHAO resultou em uma redução, dose-dependente, da intensidade de fluorescência do pireno.

A razão E/M é utilizada como índice de difusão lateral da bicamada, sendo observada uma relação direta entre fluidez e razão E/M (MACDONALD, et al., 1988). De fato, pode-se notar na figura 2B que a incorporação de 2OHOA as LUVs resultou em razões E/M menores, indicativo de uma redução na fluidez de membrana.



**Figura 2. Efeito do 2OHAO na fluidez de membrana.** A. Espectros de emissão do pireno antes e após a adição de 2OHOA nas concentrações finais 29, 58, 136 e 232  $\mu\text{M}$  (intervalo de 5 minutos entre as adições) a LUVs (300  $\mu\text{M}$  POPC e 27  $\mu\text{M}$  de pireno). Os espectros correspondem a média de 3 registros. Pireno foi excitado a 337 nm. As fendas de excitação e emissão foram de 2,5 e 5 nm, respectivamente. B. Razão E/M calculados a partir dos espectros de emissão do pireno, apresentados em A.

A ligação do 2OHAO a LUVs foi avaliada por meio da sonda fluorescente e lipofílica FPE, uma fosfatidiletanolamina com um grupamento fluoresceína ligado à cabeça polar. O FPE localiza-se na monocamada externa da bicamada lipídica e é sensível a cargas de superfície da membrana, respondendo a inserção de cargas negativas e positivas como um aumento e redução da fluorescência, respectivamente (BRUNALDI et al, 200. Xu et al, 2013).



**Figura 3. Ligação do 2OHAO à bicamada lipídica.** Espectros de emissão do FPE incorporado a monocamada externa de LUVs (300  $\mu\text{M}$  POPC) antes e após a adição de 2OHOA nas concentrações finais 29, 58, 136 e 232  $\mu\text{M}$  (intervalo de 5 minutos entre as adições). Os espectros correspondem a média de 3 registros. FPE foi excitado a 490 nm. As fendas de excitação e emissão foram de 5 nm cada. Uma

figura ilustrativa mostrando a localização do FPE e do 2OHAO (em azul, formas neutra/protonada e negativa/ionizada) na bicamada lipídica é apresentada no painel a direita (adaptado de Xu et al, 2013).

Como mostrado na figura 3, o 2OHAO produziu uma redução, dose-dependente, da fluorescência do FPE. Este resultado indica a ligação/particionamento do 2OHAO à monocamada externa da bicamada lipídica, mais especificamente da forma ionizada e carregada negativamente do 2OHOA. Por se tratar de um ácido graxo, pressupõe-se que o 2OHAO prontamente (em segundos) se liga e atravessa a bicamada lipídica. Ao final do equilíbrio químico, tem-se a geração das formas neutra (grupamento carboxila protonado) e carregada negativamente (grupamento carboxila ionizado) de 2OHAO (BRUNALDI et al, 2007. Xu et al, 2013).

## CONCLUSÕES

Conclui-se que a redução da fluidez de membrana pelo 2OHAO está, em parte, associado a uma interação direta da forma livre do 2OHAO com os lipídios de membrana. Esse efeito pode ser relevante para o potencial terapêutico do 2OHOA no tratamento do GBM, uma vez que a fluidez de membrana afeta vários processos celulares importantes.

## AGRADECIMENTOS

Ao CNPq e à Fundação Araucária pelo incentivo à pesquisa e concessão da bolsa de iniciação científica.

## REFERÊNCIAS

BRUNALDI, Kellen et al. Fluorescence assays for measuring fatty acid binding and transport through membranes. **Methods in Membrane Lipids**, p. 237-255, 2007.

MACDONALD, A. G. et al. Temperature, pressure and cholesterol effects on bilayer fluidity; a comparison of pyrene excimer/monomer ratios with the steady-state fluorescence polarization of diphenylhexatriene in liposomes and microsomes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 938, n. 2, p. 231-242, 1988.

MARTIN, Maria Laura et al. Sustained activation of sphingomyelin synthase by 2-hydroxyoleic acid induces sphingolipidosis in tumor cells<sup>1</sup> [S]. **Journal of lipid research**, v. 54, n. 5, p. 1457-1465, 2013.

XU, Su et al. CD36 enhances fatty acid uptake by increasing the rate of intracellular esterification but not transport across the plasma membrane. **Biochemistry**, v. 52, n. 41, p. 7254-7261, 2013.

32º Encontro Anual de Iniciação Científica  
12º Encontro Anual de Iniciação Científica Júnior



23 e 24 de Novembro de 2023