

ESTUDO POR RPE DA FLUIDEZ DE MEMBRANAS DO MÚSCULO LISO DE RATOS

Urdiel Macedo de Paula¹; Tiago Ribeiro de Oliveira²;

Anita Hilda Straus Takahashi³; Theresinha B. Paiva⁴ e Maria Tereza Lamy-Freund⁵

⁽¹⁾Centro Federal de Educação Tecnológica do Amazonas (CEFET-AM); ⁽²⁾⁽³⁾Universidade de São Paulo (USP); ⁽³⁾⁽⁴⁾Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP/EPM

RESUMO

Os ratos espontaneamente hipertensos (SHR) são modelos interessantes para o estudo da possível correlação entre a fluidez de membrana das células de músculo liso e a atividade de sistemas de transporte através destas células. Tem sido mostrado que as atividades destes sistemas são diferentes nas artérias de condutância (aorta) e resistência (mesentérica), em ratos normais e estressados. Neste trabalho são empregados marcadores de spin no estudo comparativo da fluidez de membranas lipídicas de ratos SHR, e seus controles normotensos Wistar (EPM), Wistar Kyoto (WKY), e outras membranas. Os lipídios biológicos foram extraídos das artérias aorta e mesentérica. Outros lipídios usados foram a lecitina de ovo e o fosfolípido saturado sintético dipalmitoil fosfatidil glicerol (DPPG). As sondas paramagnéticas usadas foram fosfolipídios marcados em diferentes posições da cadeia carbônica. Os lipídios extraídos das artérias aorta e mesentérica de ratos SHR, NWR e WKY não mostraram diferenças significativas na fluidez. O espectro de RPE das sondas incorporadas nas membranas são típicos de bicamada lipídica homogênea, e, como esperado, não foram detectadas transições de fase entre 5 e 55°C. As bicamadas lipídicas da aorta e mesentérica são mais rígidas do que as formadas pela lecitina de ovo. Comparados com os lipídios sintéticos saturados, que apresentam uma transição de fase gel - fluida, os lipídios naturais formam uma bicamada menos rígida do que a fase gel, e mais empacotada do que a fase fluida destes lipídios.

Palavras-chave: Fluidez de membranas, Reatividade Vascular, Hipertensão.

ABSTRACT

No differences were observed between NWR, WKY and SHR arteries regarding cholesterol contents of phospholipids and fatty acids in aortic and mesenteric membranes. In regards to the membranes' microviscosity, spectral markers of EPR spin inserted in aortic and mesenteric bilayer of phospholipids of NWR has been shown not to be different when compared to SHR. By contrast, spectral markers of RPE spin inserted into intact aortic muscle cell membranes of SHR showed less fluidity than NWR. This indicates that proteins have a relevant role on membrane fluidity of NWR compared to SHR. Therefore, the difference of viscosity observed between these two lineages may be due to the reduction of the total protein content of the stabilized membrane which is responsible for the calcium fixation in membranes. This condition leads to a greater permeabilization of the membrane to calcium and sodium. Higher concentration in cytoplasmic calcium increases cellular viscosity in the membranes of the lineage. In addition, increased intracellular levels of calcium stimulates the opening of high conductance potassium channels leading to hyperpolarization, which in turn leads to a hyporeactive aorta to vasopressors. The difference between the isoforms of the Na^+/K^+ pump would probably explain the functional difference between the aorta and mesenteric artery. This enzyme in the mesenteric artery has less affinity to Na^+ which would reduce the efflux and change the concentration gradient of this ion through the membrane. This condition would impair cytoplasmic removal of calcium in the exchange of $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. This alteration leads to membrane depolarization which consequently changes the reactivity to agonist vasoconstrictors. In conclusion, the microviscosity of membranes in these arteries is not determined by phospholipid contents, but by the presence of proteins.

Key words: membrane fluidity, vascular reactivity and hypertension.

¹ urdiel@biofis.epm.br

² tiagor@biosf.epm.br

³ Doutora em Ciências Biológicas (Biologia Molecular) pela Universidade Federal de São Paulo. straus.bioq@epm.br

⁴ Doutora em Ciências Biológicas (Biologia Molecular) pela Universidade Federal de São Paulo. tbpaiva@biofis.epm.br

⁵ Doutora em Molecular Sciences - University of Sussex. mtfreund@if.usp.br

1. INTRODUÇÃO

Embora a hipertensão arterial seja geralmente caracterizada por um aumento da sensibilidade do músculo liso vascular a estímulos vasoconstritores, resultados divergentes são encontrados para os ratos espontaneamente hipertensos (SHR). Enquanto os vasos de resistência de SHR são mais sensíveis a agonistas contráteis (Hermsmeyer 1982, Feres et al., 1998) vasos condutores, tal como o aorta, mostram diminuição de resposta a agonistas vasoconstritores se comparados ao controle normotenso (Spector et al., 1969, Shibata et al., 1973). Este comportamento foi associado a anormalidades nos sistemas de transporte da membrana de célula do músculo liso de SHR. Assim, um aumento da atividade da bomba Na^+ / K^+ e dos canais de K^+ dependentes de Ca^{2+} podem explicar a hiperpolarização do potencial de membrana observado em aortas de SHR (Silva et al., 1994; Moreland et al., 1986). Por outro lado, artérias mesentéricas de SHR são despolarizadas, pois os canais de K^+ e as bombas de Na^+ / K^+ são hiporeativas nestes animais (Cheung 1984, et al., Barcas, 1999).

Há muitas evidências de que as funções das proteínas de membrana, responsáveis por muitos dos sistemas de transporte, são influenciadas pelas propriedades da bicamada lipídica. Por exemplo, Remmers e colaboradores, (1990) mostraram que a atividade da Na^+/K^+ -ATPase é acelerada em membranas com baixa viscosidade. Em pacientes com hipertensão essencial, assim como no SHR, estudos de polarização de fluorescência mostraram que a microviscosidade da membrana é maior em eritrócito e plaquetas se comparado com controles normotensos (Aragon Birlouz et al., 1986; Naftilan et al., 1986; Dominiczak et al., 1991). De acordo com estes resultados Tsuda e colaboradores (1995), usando a técnica de ressonância paramagnética eletrônica (RPE) aplicada a marcadores de spin, confirmaram uma diminuição da fluidez em eritrócitos e em células

de cultura do músculo liso de SHR. Por outro lado, McLaren e colaboradores (1993), mostraram que a microviscosidade da membrana de eritrócitos, medida por anisotropia de fluorescência, não está correlacionada com a pressão sanguínea.

A maioria dos estudos de composição da bicamada lipídica e propriedades funcionais em hipertensão foram feitos em eritrócitos. Poucas são as informações em membranas de célula de músculo liso vascular encontrado na literatura.

O SHR é um modelo interessante para estudar a correlação entre a fluidez da membrana da célula de músculo liso e a atividade dos sistemas de transporte, tal como Na^+ / K^+ ATPase e canais de K^+ dependente Ca^{2+} . Isto por que foi mostrado que as atividades destes sistemas são diferentes nos vasos de condutância (aorta) e em artérias de resistência (mesentérica) (Silva et al., 1992; Feres et al., 1998).

A técnica de (RPE), aplicada às sondas paramagnéticas, têm sido vastamente empregada na monitoração de viscosidade de membranas lipídicas modelo e naturais (Freed, 1976, 1998; Berliner e Reuben, 1989). O espectro de RPE é sensível aos movimentos na faixa de 10⁻⁷s a 10⁻¹¹s, podendo a sonda, portanto, detectar regiões de diferentes empacotamentos, caso a molécula tenha movimentos com tempos de correlação nesta faixa de sensibilidade. Além disso, devido à assimetria do radical nítróxido, seu espectro de RPE é também sensível ao ordenamento da região onde ele se encontra. O grupo nítróxido pode ser ligado a diferentes posições da cadeia hidrocarbônica, ou na região da cabeça polar, monitorando portanto diferentes regiões da bicamada lipídica.

Neste trabalho investigou-se a hipótese de que as membranas de célula do músculo liso de ratos hipertensos possuem diferença de viscosidade se comparado com as membranas de ratos normotensos controle. Para tanto, realizou-se medições da fluidez de bicamadas lipídicas formadas por lipídios de células do músculo liso vascular de SHR e de animais controle.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Materiais

O fosfolipídio DPPG (1,2-Dipalmitoil-sn-glicero-3-[Fosfo-rac-(1-glicerol)]) foi obtido da Avanti Polar Lipids, Inc (Alabaster, AL, EUA). Os fosfolipídios biológicos foram extraídos (no Laboratório de Bioquímica da Escola Paulista de Medicina- UNIFESP) de artérias Aorta e Mesentérica de ratas fêmeas (de diferentes lotes, com três meses de idade) normotensos Wistar (EPM), SHR e Wistar Kyoto (WKY). A Lecitina de ovo (TypeX-E) foi obtida da Sigma-Aldrich Co. Os marcadores de spin derivados de fosfolipídios usados foram o 5-PCSL (1-Palmitoil-2-(5-Doxilestearoil) fosfatidilcolina) e o 16-PCSL (1-Palmitoil-2-(16-Doxilestearoil) fosfatidilcolina), obtidos da Avanti Polar Lipids. O clorofórmio utilizado para preparação dos filmes lipídicos, foi obtido comercialmente da Merck.

Na extração de fosfolipídios de artéria aorta e mesentérica de ratas, utilizou-se clorofórmio, metanol na proporção 2:1, NaCl 0,1 Molar. Para as dispersões de fosfolipídios biológicos foi usado o tampão Krebs Aorta (NaCl 39,6ml, KCl 2,9ml, MgCl₂ 12,3ml, NaHCO₃ 30ml, C₆H₁₂O₆ 35,7ml, CaCl₂ 12,3ml, quantidade para 1 litro de solução) e Krebs Mesentérica (NaCl 38ml, KCl 2,5ml, MgCl₂ 11,8ml, NaH₂PO₄ 33ml, NaHCO₃ 31ml, C₆H₁₂O₆ 35,7ml, CaCl₂ 19,6ml, quantidade para 1 litro de solução), as substâncias químicas usadas no preparo da solução tampão Krebs foram obtidas comercialmente da Merck. Para as dispersões de fosfolipídios sintéticos foi usado o Tampão 10 mM Hepes + 2 mM NaCl, ajustado com NaOH para pH 7.4. Utilizou-se água Milli-Q nos experimentos.

Extração das artérias Aorta e Mesentérica

As ratas NWR (EPM), SHR e WKY foram decaptadas por guilhotina, o tórax foi aberto e as artérias mesentérica e aorta foram removidas e colocadas em soluções de Krebs, borbuhada com uma mistura gasosa de O₂ (95%) e CO₂

(5%) e mantidas em gelo. Após a remoção de tecidos gordurosos, conjuntivos e adjacentes, as artérias aorta e mesentérica foram colocadas em papel de filtro para serem secas e pesadas. As artérias aorta e mesentérica foram cortadas em pequenos pedaços e conservadas a 80°C.

Extração dos Lipídios

Realizou-se a extração conforme referência (Jordi Folch, M. Lees, e G.H. Sloane Stanley, 1956) onde se utilizou clorofórmio/metanol 2:1 para ressuspender os fosfolipídios extraídos do tecido muscular liso de artéria aorta e mesentérica.

Preparação das membranas sintéticas (DPPG e Lecitina)

Inicialmente o pó foi pesado e dissolvido em clorofórmio, em uma concentração de 100 mM, depois foi evaporado com um fluxo contínuo de nitrogênio gasoso, formando um filme na parede do tubo de ensaio. As amostras ficaram a baixa pressão por, no mínimo, 2 horas para evaporação completa do clorofórmio. As amostras foram depois suspensas na solução de tampão Hepes para o DPPG e Tampão Krebs para a lecitina, por meio de agitação mecânica em um vórtex. Os marcadores de spin derivados de anfifílicos foram dissolvidos em clorofórmio, na primeira etapa do processo. As dispersões eram mantidas em gelo e usadas no mesmo dia.

Preparação das membranas biológicas

Inicialmente evaporou-se, com um fluxo contínuo de nitrogênio gasoso, a solução resultante da extração mantida em clorofórmio/metanol 2:1, a uma concentração de 100 mM, formando um filme na parede do tubo de ensaio. Em seguida realizou-se o mesmo procedimento aplicado para as membranas sintéticas. As amostras foram depois suspensas na solução de tampão Krebs aorta e mesentérica respectivamente.

Medidas da microviscosidade das membranas

A técnica utilizada para a monitoração da microviscosidade das membranas foi a ressonância paramagnética eletrônica (RPE). Os espectros de RPE foram obtidos em um espectrômetro EMX da Bruker. A temperatura foi controlada e variada no intervalo de 5°C à 55°C, por um aparelho BVT-2000 da Bruker (Eurotherm), e a temperatura na amostra foi verificada com um termopar Fluke 51 K/J. Para todos os espectros foi utilizada uma potência de 5 mW, valor para o qual não ocorre saturação do sinal nem aumento da temperatura da amostra devido à absorção da microonda pelas moléculas da água. A frequência da microonda utilizada era da ordem de 9.4 GHz. A amplitude de modulação do sinal foi de 1.0 G para todos os espectros.

Os parâmetros dos espectros definidos para a monitoração da microviscosidade das membranas foram o $2A_{max}$ (Fig.1) para espectros obtidos com o marcador 5 PCSL e o $h+1 / h0$ (fig. 2) para os espectros obtidos com o marcador 16-PCSL.

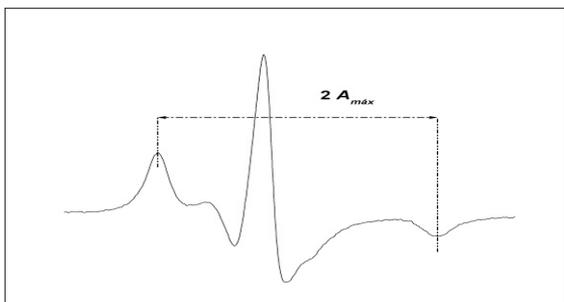


Fig. 1 Parâmetro $2 A_{max}$ obtido a partir do espectro do marcador 5 PCSL.

Para os espectros obtidos com o marcador 5-PCSL, o parâmetro de desdobramento hiperfino A_{max} pode ser usado como um parâmetro empírico de monitoração da microviscosidade ambiente, pois seu valor decresce quando a microviscosidade ambiente diminui (Freed, J.H., 1976).

Fig. 2 Parâmetro $h+1/h0$ obtido a partir do espectro do marcador 16 PCSL.

Para os espectros obtidos com o marcador 16-PCSL, a relação $h+1 / h0$ pode ser usada como um parâmetro de monitoração da microviscosidade ambiente, pois seu valor tende a unidade quando a microviscosidade ambiente diminui (Freed, J.H., 1976).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho utilizaram-se dois marcadores de spin derivados de fosfolipídio com duas cadeias saturadas e uma colina na cabeça polar. Sendo o 5-PCSL e o 16-PCSL, no qual o grupo nitróxido está ligado ao 5o e 16o carbonos da cadeia acila, respectivamente. Esses marcadores derivados de PC foram utilizados devido ao fato de serem “zwitteriônicos” e possuírem similaridade com os fosfoglicerídeos, fosfatidiletanolamina e fosfatidilcolina, mais abundantes em membranas biológicas.

Inicialmente foram obtidos espectros de RPE para lipídios extraídos de aortas de animais normotensos, de forma a verificar o caráter estrutural das dispersões lipídicas. Os resultados obtidos são apresentados na fig.1

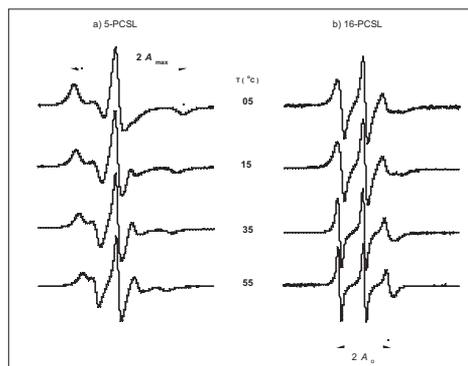


Fig. 1 Espectros de RPE de (a) 0.6 mol % 5-PCSL e (b) 0.2 mol % 16-PCSL, incorporados em 10 mM de artéria aorta de ratos EPM.

Os espectros de RPE apresentados na figura 1 são típicos de marcadores de spin incorporados a bicamadas lipídicas, onde apresentam uma maior anisotropia na posição do 5° C-átomo, se comparada com o interior da bicamada (posição 16o C-átomo).

A partir dos espectros de RPE foi possível obter vários parâmetros ligados à ordem e mobilidade do grupo nitróxido no interior das bicamadas. Neste trabalho os parâmetros que se mostraram mais sensíveis ao empacotamento das bicamadas foram o desdobramento hiperfino máximo ($A_{máx}$) para o marcador 5-PCSL e a razão entre as alturas do pico de campo baixo e do pico central (h_{+1}/h_0), para o marcador 16-PCSL.

Os espectros de RPE foram obtidos para temperaturas entre 5°C e 55 °C, para dispersões lipídicas constituídas de fosfolipídios extraídos de artérias aorta e mesentérica de ratas EPM, SHR e WKY. Para cada tipo de animal os fosfolipídios extraídos das artérias aorta e mesentérica foram parte de um grupo de trinta ratas. Portanto tornou-se necessário verificar a reprodutibilidade dos conjuntos de dados. Desta forma foram obtidos espectros de dois grupos distintos para cada conjunto de dados. Alguns resultados obtidos são apresentados na figura 2.

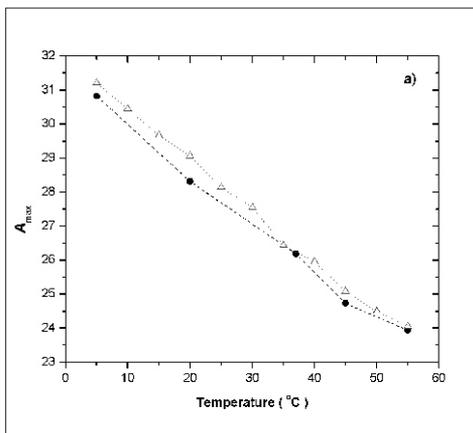


Fig 2 a Dependência térmica de $A_{máx}$ medido no espectro de RPE de 0.6% 5-PCSL incorporado em 10 mM de artéria aorta de ratos EPM em tampão Krebs, para duas preparações diferentes (e)

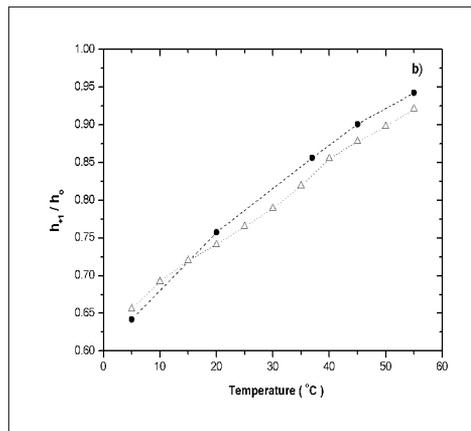
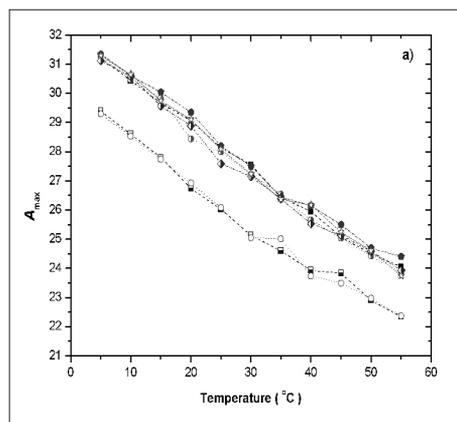


Fig 2 b Dependência térmica de h_{+1}/h_0 medido no espectro de RPE de 0.2 mol % 16-PCSL incorporado em 10 mM de artéria mesentérica de ratos SHR em tampão Krebs, para duas preparações diferentes (e)

A figura 2 exemplifica a reprodutibilidade de todos os resultados obtidos, pois a diferença existente entre os valores obtidos para cada grupo é desprezível perante a incerteza empregada no experimento.

Para verificar a existência de diferenças na microviscosidade das membranas das dispersões lipídicas de aorta e mesentérica, de animais EPM, SHR, WKY; foram elaborados gráficos onde se observou os parâmetros $A_{máx}$ e h_{+1}/h_0 em função da temperatura, para todos os grupos (Figura 3).



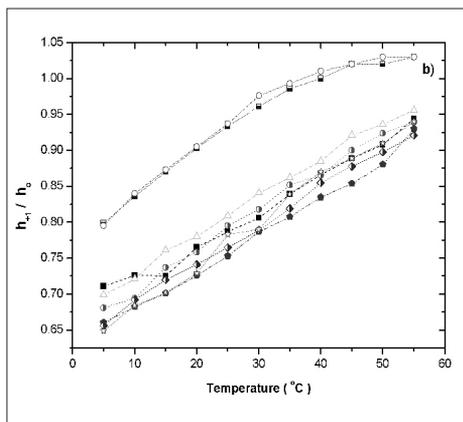


Fig. 3 - Dependência térmica de **a)** A_{max} medido no espectro de RPE de 0.6 mol % 5-PCSL, ou **b)** h_{+1}/h_0 medido no espectro de RPE de 0.2 mol % 16-PCSL, incorporado em 10 mM de Aorta de ratos EPM (\square), SHR (\square), WKY (\square) e Mesentérica de ratos EPM (\square), SHR (\square), WKY (\square), e Lecitina de ovo (e) em tampão Krebs.

De acordo com a figura 3, observou-se que as membranas constituídas de fosfolípidios extraídos de células do músculo liso de ratas normotensas e hipertensas, não apresentam diferenças significativas de microviscosidade. Surpreendentemente, bicamadas lipídicas das artérias aorta e mesentérica apresentaram empacotamentos semelhantes.

Na figura 3, apresentou-se também valores de $A_{máx}$ e h_{+1}/h_0 obtidos para dispersões de lecitina de ovo, obtidos nas mesmas condições das demais dispersões. Este procedimento tem a intenção de comparar os valores obtidos para os diferentes lipídios extraídos de célula do músculo liso de ratas, com os valores obtidos para uma membrana biológica conhecida, neste caso a lecitina de ovo.

Como pode ser observado, embora exista uma diferença de microviscosidade entre as membranas de lecitina de ovo e membranas dos grupos de animais, o comportamento nos dois conjuntos, em relação a variação de temperatura, é bem similar. Ambos não apresentam uma transição de fase gel-fluido bem definido. Isto

está de acordo com as expectativas para membranas biológicas, que são formadas por diferentes lipídios, apresentando diversas insaturações, portanto não apresenta fase gel.

Com intuito comparar com o comportamento dos marcadores em membranas modelo, obteve-se espectros de RPE para dispersões lipídicas sintéticas, DPPG, em condições similares as anteriores (Fig 4).

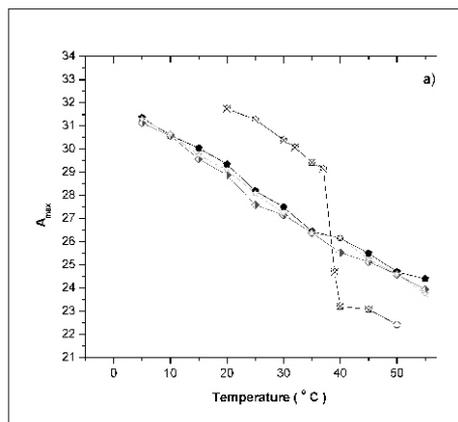


Fig 4 Comparação d **a)** A_{max} medido no espectro de EPR de 0.6 mol % 5-PCSL, e **b)** h_{+1}/h_0 medido no espectro de RPE de 0.2 mol % 16-PCSL incorporado em bicamadas lipídicas de Mesentérica EPM (\square), SHR (\square), WKY (\square) artéria de ratas, e 10 mM DPPG (\square) em tampão HEPE pH 7.4.

CONCLUSÃO

Fosfolipídios marcados nas posições do 5° e 16° carbonos da cadeia acila não mostram qualquer diferença no empacotamento dos lipídios extraídos de artéria aorta e mesentérica de ratos normotensos e hipertensos. Portanto, caso exista alguma diferença na fluidez destas membranas, não parece estar relacionada à microviscosidade dos lipídios presentes na bicamada.

As bicamadas formadas por lipídios extraídos de aorta e mesentérica são encontradas em estado mais rígido do que as membranas de lecitina de ovo. Quando comparados com lipídios saturados sintéticos, que sofrem transição de fase térmica gel-fluido, os lipídios das artérias aorta e mesentérica formam bicamadas menos rígidas do que a fase gel e mais rígidas do que a fase fluida do DPPG.

REFERÊNCIAS

BORGES, A.C., Feres, T., VIANNA, L.M. e PAIVA, T.B. (1999). *Recovery of impaired K⁺ channels in mesenteric Arteries from spontaneously hypertensive rats by prolonged treatment with cholecalciferol.* British J. Pharmacol., 127, 772-778.

BERLINER, L.J. (ed.) (1976) *Spin Labeling, Theory and Applications.* Academic Press.

CHEUNG, D.W. (1984) *Membrane potencial of vascular smooth muscle and hypertension in spontaneously hypertensive rats.* Can. J. Physiol. Pharmacol. 62: 957-960.

DOMINICZAK, A.F e BOHR, D.F. (1991). *The primacy of membrane microviscosity in genetic hypertension.* Am.J Hypertens. 4 (12 Pt 1): 963-969

FERES, T., BORGES, A.C., SILVA, E.G., Paiva, A.C. e PAIVA, T.B. (1998). *Impaired function of alpha-2 adrenoceptor in smooth muscle mesenteric arteries from spontaneously hypertensive rats.* British J. Pharmacol. 125: 1144-1149

HERMSMEYER, K., ABEL, P.W. e HOST, R.L. (1982). *Noradrenaline sensitivity and membrane potencial of caudal arterial muscle in DOCA-salt, Dahl and SHR hypertension rat.* Hypertension, 4, 11-49-11-51

JORDI, F., LEES, M., e SLOANE, G.H.S (1956) *A Simple*

method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues, McLean Hospital Research Laboratories, Waverley, and the Department of Biological Chemistry, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts.

MCLAREN, Y., KREUTZ, R., LINDPAINTNER, K., BOHR, D.F., GANTEN, D., Reid, J.L. e DOMINICZAK, A.F. (1993). *Membrane microviscosity does not correlate with blood pressure: a cosegregation study.* J.Hypertens. 11(1): 25-30.

MORELAND, R.S., MAJOR, T.C. e WEBB (1986). *Contractile reponses to ouabain and K free solution in aorta from hypertensive rats.* Am J. Physiol., 250: H612-H619

NAFTILAN, A.J., DZAU, V.J e LOSCAIZO, J. (1986). *Preliminary observations on abnormalities of membrane structure and function in essential hypertension.* Hypertension 8 (suppl II): II19-II24

REMMERES, A.E., NORDBY, G.L e MEDZIHRADESKY, F. (1990). *Modulation of opioid receptor binding by cis and trans fatty acids.* J. Neurochem. 55: 1993-2000.

RIMON, G., HANSKI, E., BRAUN, S e LEVITZKI, A. (1978). *Mode of coupling between hormone receptors and adenylate cyclase elucidated by modulation of membrane fluidity.* Nature. 276:394-396.

SHIBATA, S., e KURAHASHI, K. (1973). *A possible etiology of contractility of vascular smooth muscle from spontaneously hypertensive rats.* J Pharmacol. Exp. Ther. 185, 406-417.

SILVA, E.G., FERDIANI-NETO, E., Ferreira, A.T., PAIVA, A.C. e PAIVA, T.B. (1994). *Role of calcium - dependent K-channels in membrane potencial and contractility of aorta from spontaneously hypertensive rats.* British J. Pharmacol. 113, 1022-1028

SPECTOR, S., FLEICH, J.H., MALING, H.M. e BRODIE, B.B. (1969). *Vascular smooth muscle reactivity in normotensive and hypertensive rats.* British J. Pharmacol. 113, 1022-1028

TSUDA, K., MINATOGAWA, Y., IWAHASHI, H., NISHIO, I., KIDO, R e MASUYAMA, Y. (1995). *Spin-labelling study of biomembranes in spontaneously hypertensive rats: calcium-and calmodulin-dependent regulation.* Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 22 (suppl 1): S234-236.