DEPARTAMENTO DE ZOOLOGIA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Modelos fosfolipídicos do sarcolema cardíaco: efeitos do cálcio e do pH

Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular e Molecular. O trabalho foi realizado sob a orientação científica do Professor Doutor Romeu António Videira (Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro) e supervisão do Professor Doutor António Joaquim de Matos Moreno (Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra)

Guilherme Amaro dos Santos

2009

Agradecimentos

Ao Professor Doutor Vítor Manuel Calado Madeira desejo expressar o meu agradecimento pela orientação científica, pela visão crítica e criatividade científica permanentes, e pela disponibilização dos meios que permitiram a realização do trabalho científico agora apresentado. É um privilégio ter sido seu aluno e ter iniciado no seu grupo a minha actividade científica. Para mim tem sido, e será sempre, uma referência como Professor e Cientista.

Ao Professor Doutor António Joaquim de Matos Moreno e ao Professor Doutor Romeu António Videira desejo expressar os meus agradecimentos pela confiança, disponibilidade e empenho, no debate e revisão crítica desta dissertação e que contribuíram decisivamente para a melhoria e conclusão da apresentação final. Expresso, ainda, o meu reconhecimento pelos seus ensinamentos e pelo incentivo permanente.

Ao Dr. Manuel Joaquim Marques Gonçalves de Matos (Dr. Manolo) desejo expressar o meu agradecimento pelos conhecimentos, disponibilidade e estímulos transmitidos, fundamentais para a concretização deste trabalho. Agradeço ainda a dedicação e apoio na introdução deste projecto, e no ensinamento de boas práticas de laboratório e da atitude e pensamento científicos.

Aos Professores, Investigadores, Funcionários, Colegas e Amigos com quem tive o prazer de partilhar os laboratórios e o gabinete, desejo expressar os meus sinceros agradecimentos pelo apoio, incentivo, disponibilidade e amizade dispensados e que fizeram com que o departamento de Zoologia fosse uma segunda casa para mim.

... a todos, o meu sincero Obrigado!

$[Ca^{2+}]_o$	concentração de cálcio extracelular
ATP	adenosina 5'-trifosfato
DPH	1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno
DPPC	1,2-dipaltoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina, ou 16:0/16:0-glicerofosfocolina
DPPE	1,2-dipaltoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina, ou 16:0/16:0-glicerofosfoetanolamina
DPPS	1,2-dipaltoil-*sn*-glicero-3-fosfoserina, ou 16:0/16:0-glicerofosfoserina
DSC	calorimetria diferencial de varrimento
GLC	cromatografia gás-líquido, ou cromatografia gasosa
Hepes	ácido N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-2-etanossulfónico
HPLC	cromatografia líquida de alta eficiência
K_a	constante de dissociação protónica
K_d	constante de dissociação iónica
Liso-PS	liso-glicerofosfoserina
Mes	ácido 2-(N-morfolino)etanossulfónico
Mio	miofilamentos
Mit	mitocôndria
Nu	núcleo
P	polarização de fluorescência, referido no contexto das propriedades físicas estudadas com a sonda DPH
PC	fosfatidilcolina
PE	fosfatidiletanolamina
PI	fosfatidilinositol
PLD	fosfolipase D
PS	fosfatidilserina
rpm	rotações por minuto
RS	retículo sarcoplasmático
RSJ	retículo sarcoplasmático juncional
SAPA	ácido 1-estearoil-2-araquidonil-*sn*-glicero-3-fosfórico, ou ácido 18:0/20:4-glicerofosfórico

Abreviaturas

SAPC	1-estearoil-2-araquidonil-*sn*-glicero-3-fosfocolina, ou 18:0/20:4-glicerofosfocolina
SAPE	1-estearoil-2-araquidonil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina, ou 18:0/20:4-glicerofosfoetanolamina
SAPS	1-estearoil-2-araquidonil-*sn*-glicero-3-fosfoserina, ou 18:0/20:4-glicerofosfoserina
Sar	sarcolema
SDS	dodecilssulfato de sódio
Sph	esfingomielina
T	túbulo transverso, ou túbulo-T
T (ºC)	temperatura em graus celsius
$t_{1/2}$	tempo de meia vida
TLC	cromatografia de camada fina
TLCa	cromatografia analítica de camada fina
TLCp	cromatografia preparativa de camada fina
ΔH	variação de entalpia
ΔT	variação ou intervalo de temperatura

ABSTRACT 1

RESUMO 5

CAPÍTULO 1 INTRODUÇÃO 9

1.1 – A ASSOCIAÇÃO EXCITAÇÃO-CONTRACÇÃO NO MÚSCULO CARDÍACO 11

1.1.1 - ASPECTOS ULTRA-ESTRUTURAIS RELEVANTES 11

1.1.2 - O CA^{2+} E A CONTRACÇÃO MUSCULAR 13

1.1.3 - ASSOCIAÇÃO EXCITAÇÃO-CONTRACÇÃO 14

1.1.4 - ELEMENTOS DA ASSOCIAÇÃO EXCITAÇÃO-CONTRACÇÃO 15

1.1.4.1 - Canais de Ca^{2+} do sarcolema sensíveis à voltagem 15

1.1.4.2 - Canais libertadores de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático 16

1.1.4.3 - Mecanismos de remoção do Ca^{2+} citoplasmático 16

1.1.4.4 - Compartimentos de Ca^{2+} 17

1.1.5 - IMPORTÂNCIA DA COMPARTIMENTAÇÃO DO CA^{2+} EM ESPAÇOS SUBCELULARES DE DIFUSÃO RESTRITA 21

1.2 - ORGANIZAÇÃO E FUNÇÃO DA FRACÇÃO LIPÍDICA DO SARCOLEMA NA ASSOCIAÇÃO EXCITAÇÃO-CONTRACÇÃO 22

1.2.1 - CARACTERIZAÇÃO DO SARCOLEMA 22

1.2.1.1 - Composição lipídica do sarcolema 22

1.2.1.2 - Assimetria lipídica 25

1.2.1.3 - Distribuição lateral e bidimensional dos fosfolípidos 28

1.2.2 - FUNÇÃO DOS FOSFOLÍPIDOS NA ASSOCIAÇÃO EXCITAÇÃO-CONTRACÇÃO 34

1.3 - ALTERAÇÕES DA ORGANIZAÇÃO E FUNÇÃO DO SARCOLEMA INDUZIDAS POR ISQUEMIA E REPERFUSÃO 36

1.4 - MODIFICAÇÃO ESTRUTURAL DE FOSFOLÍPIDOS PELA FOSFOLIPASE D 39

1.5 – OBJECTIVOS 45

CAPÍTULO 2 MATERIAL E MÉTODOS 47

2.1 – SÍNTESE DE 18:0/20:4-GLICEROFOSFOSERINA A PARTIR DE FOSFATIDILCOLINA POR TRANSFOSFATIDILAÇÃO CATALISADA PELA FOSFOLIPASE D DE *STREPTOMYCES* SP. 49

2.1.1 - ENZIMAS E REAGENTES 49

2.1.2 - REACÇÃO ENZIMÁTICA DE TRANSFOSFATIDILAÇÃO 49

2.1.2.1 - Sistema de duas fases em agitação 49
2.1.2.2 - Sistema de micelas invertidas 50
2.1.3 - EXTRACÇÃO DA FRACÇÃO LIPÍDICA RESULTANTE DA ACÇÃO ENZIMÁTICA 50
2.1.4 - PURIFICAÇÃO DA 18:0/20:4-GLICEROFOSFOSERINA 51
2.1.5 - ANÁLISE DA 18:0/20:4-GLICEROFOSFOSERINA SINTETIZADA 52
2.1.5.1 - Quantificação das classes fosfolipídicas resultantes da acção enzimática 52
2.1.5.2 - Análise dos ácidos gordos 53
2.1.5.2.1 - Hidrólise da ligação *sn*-2 pela fosfolipase A2 53
2.1.5.2.2 - Transmetilação dos ácidos gordos 54
2.2 - CARACTERIZAÇÃO DAS PROPRIEDADES FÍSICAS DOS MODELOS FOSFOLIPÍDICOS REPRESENTATIVOS DO SARCOLEMA CARDÍACO 55
2.2.1 - FOSFOLÍPIDOS 55
2.2.2 – HIDRATAÇÃO DAS MISTURAS FOSFOLÍPIDICAS REPRESENTATIVAS DO SARCOLEMA CARDÍACO 55
2.2.3 - CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARRIMENTO (DSC) 56
2.2.3.1 – Preparação e análise das dispersões lipídicas 56
2.2.3.2 – Determinações e princípios calorimétricos 57
2.2.4 - ESPECTROFLUORIMETRIA POR POLARIZAÇÃO DE FLUORESCÊNCIA DO 1,6-DIFENIL-1,3,5--HEXATRIENO (DPH) 64
2.2.4.1 - Preparação das dispersões lipídicas 64
2.2.4.2 - Incorporação da sonda fluorescente 65
2.2.4.3 – Determinações e princípios espectrofluorimétricos 65

CAPÍTULO 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO 69

3.1 – SÍNTESE DE 18:0/20:4-GLICEROFOSFOSERINA A PARTIR DE FOSFATIDILCOLINA POR TRANSFOSFATIDILAÇÃO CATALISADA PELA FOSFOLIPASE D DE *STREPTOMYCES* SP. 71
3.2 - CARACTERIZAÇÃO FÍSICA DE MODELOS FOSFOLIPÍDICOS REPRESENTATIVOS DO FOLHETO INTERNO DO SARCOLEMA CARDÍACO 80
3.2.1 – FOSFOLÍPIDOS CONSTITUINTES PUROS 83
3.2.2 – MISTURAS BINÁRIAS 87
3.2.2.1 - Lipossomas de 16:0/16:0-glicerofosfocolina com 33,7% de 18:0/20:4--glicerofosfoetanolamina 87
3.2.2.2 - Lipossomas de 16:0/16:0-glicerofosfocolina com 25,5% de 18:0/20:4--glicerofosfoetanolamina 93
3.2.2.3 - Lipossomas de 16:0/16:0-glicerofosfocolina com 13,0% de 18:0/20:4--glicerofosfoserina 95

3.2.2.4 - Lipossomas de 16:0/16:0-glicerofosfocolina com 7,4% de 18:0/20:4-glicerofosfoserina 100

3.2.3 – MISTURAS TERNÁRIAS 102

3.2.3.1 - Lipossomas representativos do folheto citoplasmático do sarcolema assimétrico 102

3.2.3.2 - Lipossomas representativos do sarcolema simétrico 106

CAPÍTULO 4 CONCLUSÕES 113

REFERÊNCIAS 119

Abstract

The ultrastructure of cardiac muscle reveals that at many sites on the surface of cells the sarcolemma is invaginated to form a network of tubules with transverse and longitudinal orientation to which the sarcoplasmic reticulum is apposed to form dyads. Ca^{2+} channels and other exchangers engaged in the contractile cycle are mainly located closed to the dyadic cleft, and require fast flows and higher cytosolic concentrations of Ca^{2+} for the physiological activity. The subsarcolemmal dyadic region has been indicated as a compartment for restrict Ca^{2+} diffusion where most of cellular Ca^{2+} exchanges take place. The negatively charged phospholipids from the inner sarcolemmal leaflet represent the main locus for exchangeable Ca^{2+} binding sites.

The pathological ischemic condition is associated with intracellular energy depletion and acidosis and is followed by sarcolemma destabilization, like loss of asymmetry, aggregation of intramembraneous constituents and disruption. Reperfusion after long ischemia may result in lipid extrusion from the sarcolemma.

As phospholipids form the basic structural matrix of biological membranes, phospholipid models representative of the inner leaflet of the cardiac sarcolemma were prepared with the most abundant phospholipid molecule of the main phospholipid classes: 16:0/16:0-glycerophosphocholine (DPPC), 18:0/20:4-glycerophosphoetahnol-amine (SAPE) and 18:0/20:4-glycerophosphoserine (SAPS).

In the first section of this work, the SAPS was synthesized from commercially available 18:0/20:4-glycerophosphocholine (SAPC) by enzymatic synthesis with phospholipase D from *Streptomyces* sp.. Phospholipase D catalyses the hydrolysis of phosphatidylcholine with the production of phosphatidic acid. However, in the presence of serine, the enzyme also catalyzes the transfer of the phosphatidyl group to the nucleophilic acceptor (serine) with the simultaneous production of phosphatidylserine by transphosphatidylation.

Because the synthesis reaction involves an hydrosoluble enzyme and lipophilic products and substrate, the synthesis was studied in a two phase system with an organic phase of diethyl ether and an aqueous solution saturated with L-serine at 30 ºC, under stirring. The maximal conversion of SAPC was reached after 2 hours of incubation with the transphosphatidylation as the main reaction. Although Ca^{2+} is not indispensable for the synthesis of SAPS, it was required for maximal transferase activity of the

phospholipase D, about 74.32% of SAPS. In the presence of Ca^{2+} both activities were stimulated but the transphosphatidylation was favoured above hydrolysis. Increasing the reactor diameter or decreasing the stirring velocity resulted in less transferase activity in the two phase system.

In the two phase system the substrate is presented in the monomeric form and the phospholipase D activity is stirring-dependent. In order to eliminate this dependence and to increase the interaction of the lipid substrate with the enzyme, the reaction was also carried out in inverted micelles. The maximal transphosphatidylation was 77.29% of SAPS. Under these conditions, Ca^{2+} stimulation is less effective and both activities were enhanced by the same factor, suggesting that the interactions substrate-substrate (lipid-lipid) are more important for the enzyme activity. The same results were obtained when the diameter of the reactor was increased and the stirring was less effective.

The thermotropic profiles from differential scanning calorimetry (DSC) and from DPH fluorescence polarization of phospholipid models representative of the inner leaflet of the asymmetric sarcolemma were studied in order to monitor the perturbations induced by Ca^{2+} and H^{+} (under physiological and pathological conditions) in the inter-phospholipid interactions and phospholipid lateral arrangement. Models representing the total phospholipid composition of the sarcolemma were also studied in order to simulate the loss of asymmetry in the sarcolemma (symmetric composition).

The studies were initiated with the binary mixtures DPPC/SAPE and DPPC/SAPS by keeping the compositions as described for the ternary mixtures and replacing the absent molecule by DPPC.

The thermotropic profile of binary mixtures containing SAPS is defined by a unique transition which was not perturbed by the presence of Ca^{2+}. However, an additional transition was induced by H^{+} for SAPS in the symmetric composition. These results suggest that the phosphatidylserine in the sarcolemma should grant miscibility and capability to interact with Ca^{2+} under physiological condition. However, under pathological condition, like ischemia, where loss of asymmetry and acidosis are involved, the phosphatidylserine may destabilize the membrane.

For the binary mixtures containing SAPE in the asymmetric composition, only one transition was detected under physiologic pH. Besides, these mixtures showed sensitivity to different concentrations of Ca^{2+} and H^{+} with the detection of additional transitions. The mixtures containing SAPE in the symmetric composition are characterized by two stable transitions, which are not perturbed for the studied Ca^{2+} and

H^+ concentrations. These results suggest that the composition of the phosphatidylethanolamine should be precisely defined and maintained in the sarcolemma, in order to grant specific physical properties and dynamics to the membrane. In this way, the phosphatidylethanolamine may have an important role in the lipid asymmetry regulation.

The ternary mixtures representative of the inner leaflet of the asymmetric sarcolemma have a thermotropic profile defined by a unique and highly symmetric transition ending next to the physiologic temperature, at 37 ºC. This transition occurs with an increase in the fluidity of the membrane core, typical of a transition between lamellar phases as detected by fluorescence polarization. The thermotropic profile and miscibility were not perturbed by Ca^{2+} concentrations under 7500 µM and pH 5.5.

In the mixtures representative of the symmetric sarcolemma, two transitions were detected. An additional transition emerged in the presence of Ca^{2+} and increased with progressive concentrations of Ca^{2+}. The thermotropic profile was not perturbed for pH above 5.5. These results suggest that under loss of sarcolemma asymmetry the phospholipids should adopt an irregular lateral arrangement into domains with distinct compositions, in order to maximize their interactions.

The phospholipid classes composition of the inner leaflet of the asymmetric sarcolemma agrees closely with the predictions for a regular lateral arrangement of hexagonal geometry, and so the phospholipids should preferentially adopt a regular lateral arrangement which conduct to the detected miscibility. The loss of asymmetry will result in a significant decrease of phospholipid miscibility in the sarcolemma.

Additional studies with saturated phospholipids indicate that the regular lateral arrangement may be determined mainly by the phospholipid classes composition. The acyl chains unsaturations also should be very important to grant the membrane fluidity and the stability to face the Ca^{2+} fluctuations in the dyadic cleft under the physiological temperature.

Considering the results of these studies a sequence for the events involved in the ischemia condition is proposed.

Keywords: sarcolemma, biomembranes, lipid asymmetry, ischemia, membrane models, DSC, phospholipase D, transphosphatidylation, enzymatic synthesis

Resumo

Aspectos ultra-estruturais do músculo cardíaco indicam que o sarcolema forma uma cadeia de invaginações (túbulos) transversais e longitudinais, favorecendo as zonas de justaposição com o retículo sarcoplasmático, designadas por fenda diádica. Por seu lado, canais e trocadores de Ca^{2+} envolvidos no ciclo contractivo estão preferencialmente localizados em zonas adjacentes à fenda diádica, e requerem na sua actividade fisiológica fluxos rápidos de Ca^{2+} e concentrações superiores às do citosol. A zona da fenda diádica é apontada como um compartimento de difusão restrita onde ocorre quase todo o fluxo celular de Ca^{2+}, sendo os fosfolípidos aniónicos, existentes exclusivamente no folheto interno do sarcolema assimétrico, indicados como os principais locais de ligação do Ca^{2+} disponível para troca rápida.

A situação patológica de isquemia (supressão da perfusão) associada intracelularmente com o esgotamento de energia e o decréscimo do pH (acidose), é também acompanhada por alterações estruturais do sarcolema como a perda de assimetria lipídica, o rearranjo lateral de constituintes membranares e perda de integridade. A reperfusão após períodos de isquemia prolongados pode resultar na extrusão de lípidos do sarcolema.

Atendendo a que os fosfolípidos constituem a matriz estrutural das membranas biológicas, foram preparados modelos fosfolipídicos representativos do folheto interno do sarcolema cardíaco, constituídos pela espécie mais abundante de cada uma das classes fosfolipídicas mais representativas: 16:0/16:0-glicerofosfocolina (DPPC), 18:0/20:4-glicerofosfoetanolamina (SAPE) e 18:0/20:4-glicerofosfoserina (SAPS).

A primeira parte do trabalho envolveu a síntese enzimática de 18:0/20:4--glicerofosfoserina, catalisada pela fosfolipase D de *Streptomyces* sp., a partir 18:0/20:4-glicerofosfocolina (disponível comercialmente). A fosfolipase D catalisa a hidrólise da fosfatidilcolina com formação de ácido fosfatídico. No entanto, na presença de serina a enzima catalisa também a transferência do grupo fosfatidil para o aceitador nucleofílico (serina) com formação simultânea de fosfatidilserina, por transfosfatidilação.

A reacção envolve uma enzima hidrossolúvel, um substrato e produtos lipossolúveis, pelo que a síntese foi estudada num sistema com duas fases, uma fase orgânica composta por éter dietílico e uma fase aquosa saturada com L-serina, a 30 ºC e

sob a agitação magnética. A conversão máxima foi atingida ao fim de 2 horas de reacção, sendo a transfosfatidilação marcadamente superior. A presença de Ca^{2+} não é essencial para a actividade da enzima mas é indispensável para se atingir a transfosfatidilação máxima, cerca de 74,32% de 18:0/20:4-glicerofosfoserina. Aliás, o Ca^{2+} estimula ambas as actividades, mas a transfosfatidilação é favorecida relativamente à hidrólise. O aumento do diâmetro do reactor ou a diminuição da velocidade de agitação do sistema traduzem-se numa redução da transfosfatidilação no sistema bifásico.

No sistema bifásico, o substrato apresenta-se na forma monomérica e a actividade da enzima está dependente da eficiência da agitação. Para suprimir esta limitação e potenciar a interacção do substrato lipídico com a enzima, a reacção de síntese foi também estudada em micelas invertidas. A transfosfatidilação máxima foi cerca de 77,29% de 18:0/20:4-glicerofosfoserina. Nesta situação, a estimulação pelo Ca^{2+} foi menor, e ambas as actividades foram igualmente estimuladas, sugerindo uma maior importância das interacções substrato-substrato (lípido-lípido) na actividade da enzima. A actividade da enzima não foi alterado quando se reduziu a eficiência da agitação do sistema de micelas invertidas.

Para detectar as alterações induzidas pelo Ca^{2+} e pelo H^{+} (em condições patológica e fisiologicamente relevantes) nas interacções inter-fosfolípidos e na distribuição lateral dos fosfolípidos do sarcolema, foram estudados os perfis termotrópicos por calorimetria diferencial de varrimento (DSC) e polarização de fluorescência do DPH, em modelos fosfolipídicos representativos do folheto interno do sarcolema cardíaco assimétrico. Foram também estudados modelos com as proporções representativas da fracção fosfolipídica total do sarcolema. Com o estudo da composição fosfolipídica total pretendeu-se simular as condições de perda de assimetria lipídica.

No entanto, os estudos foram iniciados em misturas binárias com as espécies de fosfatidilcolina/fosfatidiletanolamina e fosfatidilcolina/fosfatidilserina, mantendo as proporções referidas para as misturas ternárias e substituindo a espécie ausente pela fosfatidilcolina.

Nos estudos realizados com misturas binárias contendo SAPS constata-se que o seu comportamento termotrópico, caracterizado por uma transição única, não é alterado pela presença de concentrações crescentes de Ca^{2+}, sendo apenas influenciado pelo aumento de H^{+}, dado que se detecta de uma transição adicional quando a proporção de

SAPS é reduzida, simulando a perda de assimetria. É assim possível sugerir que a fosfatidilserina deverá conferir ao sarcolema homogeneidade e capacidade de interacção com o Ca^{2+} em condições fisiológicas, devendo-se apresentar como factor de instabilidade em condições patológicas que envolvam a perda de assimetria seguida de acidose, como poderá ser o caso da isquemia.

Por outro lado, nas misturas binárias contendo SAPE a pH fisiológico, apenas se detectou uma única transição para a proporção representativa do sarcolema assimétrico (33,7%). É também nesta proporção que as misturas com SAPE apresentaram susceptibilidade à presença e concentração de Ca^{2+} e à redução do pH com a detecção de transições adicionais. As misturas binárias com SAPE em proporção semelhante à do sarcolema simétrico apresentam sempre duas transições que não são susceptíveis aos catiões estudados. Estes resultados parecem indicar que a proporção de fosfatidiletanolamina no sarcolema tem de estar bem definida e mantida, a fim de conferir à membrana as propriedades físicas e a dinâmica características. Assim a fosfatidiletanolamina poderá constituir um elemento para a regulação da assimetria lipídica.

As misturas ternárias, representativas do folheto citoplasmático do sarcolema assimétrico, apresentam um registo calorimétrico caracterizado por uma única transição com acentuada simetria, e que termina próximo da temperatura fisiológica, a 37 ºC. Esta coincide com um aumento da fluidez no interior da membrana característico de uma transição entre fases lamelares, como mostram os dados de polarização de fluorescência. O perfil termotrópico e a miscibilidade não são alterados na presença de concentrações de Ca^{2+} até 7500 µM e pH 5,5.

Nas misturas representativas do sarcolema simétrico foram detectadas duas transições. A presença de Ca^{2+} induz o aparecimento de uma transição adicional, que se destaca com o aumento da concentração. O comportamento termotrópico não é alterado para valores de pH até 5,5. Estes resultados sugerem que em condições de perda de assimetria, os fosfolípidos se distribuem em domínios lipídicos distintos, com diferentes composições, de maneira a maximizar a interacção entre os seus constituintes.

A composição do folheto interno do sarcolema assimétrico em termos de classes fosfolipídicas aproxima-se claramente dos valores previstos para um arranjo lateral regular de simetria hexagonal, pelo que os fosfolípidos deverão adoptar uma distribuição regular no plano da membrana, a qual é responsável pela miscibilidade

detectada. A perda de assimetria deverá traduzir-se num decréscimo significativo da miscibilidade dos fosfolípidos do sarcolema.

Estudos adicionais com fosfolipídos saturados, indicam que a distribuição regular no plano da membrana deverá ser determinada pelas proporções das classes fosfolipídicas constituintes, sendo aparentemente independente das espécies. O grau de insaturação das cadeias acil deverá ser também muito importante, por garantir, à temperatura fisiológica, a fluidez da membrana e conferir resistência às variações do Ca^{2+} na fenda diádica.

Considerando os resultados obtidos, foi proposta uma sequência para os eventos associados à situação patológica de isquemia.

Palavras-chave: sarcolema, biomembranas, assimetria lipídica, isquemia, modelos membranares, DSC, fosfolipase D, transfosfatidilação, síntese enzimática

Capítulo 1 Introdução

O músculo cardíaco, através da sua função contráctil, permite que o sangue seja bombeado pelo coração, levando oxigénio e nutrientes a todas as células do organismo, incluindo os outros músculos.

1.1 – A associação excitação-contracção no músculo cardíaco

1.1.1 - Aspectos ultra-estruturais relevantes

Tal como no músculo liso, a actividade contráctil cardíaca é involuntária. No entanto, o músculo cardíaco, à semelhança do músculo esquelético, é um músculo estriado (Figura 1).

O Ca^{2+} desempenha um papel fundamental na activação dos miofilamentos musculares. Contudo, pequenas diferenças na ultra-estrutura reveladas por microscopia electrónica, no tamanho, disposição e abundância de alguns constituintes celulares, permitem antever que a quantidade, a sequência e o controlo dos fluxos de Ca^{2+} ao longo da associação excitação-contracção são diferentes para aqueles dois tecidos musculares estriados (McNutt e Fawcett, 1974; Scheuermann, 1993).

Em ambos os músculos estriados, o sarcolema apresenta invaginações tubulares de orientação transversal designadas por túbulos transversos ou túbulos-T (Figura 1-B).

No músculo esquelético dois túbulos-T estão presentes ao nível de cada sarcómero. No músculo cardíaco apenas um túbulo-T está associado a cada sarcómero, próximo da linha-Z (Figura 1-A). Os túbulos-T apresentam, no entanto, um diâmetro cinco vezes superior relativamente ao músculo esquelético.

Os túbulos-T consecutivos estão interconectados por túbulos de orientação longitudinal, ao longo da célula, e ao contrário do músculo esquelético, o glicocálix acompanha a invaginação do sarcolema na formação dos túbulos, forrando-os até às proximidades dos filamentos contrácteis (McNutt e Fawcett, 1974). O glicocálix é constituído por mucopolissacarídeos de carga negativa, apresentando especial afinidade por Ca^{2+}.

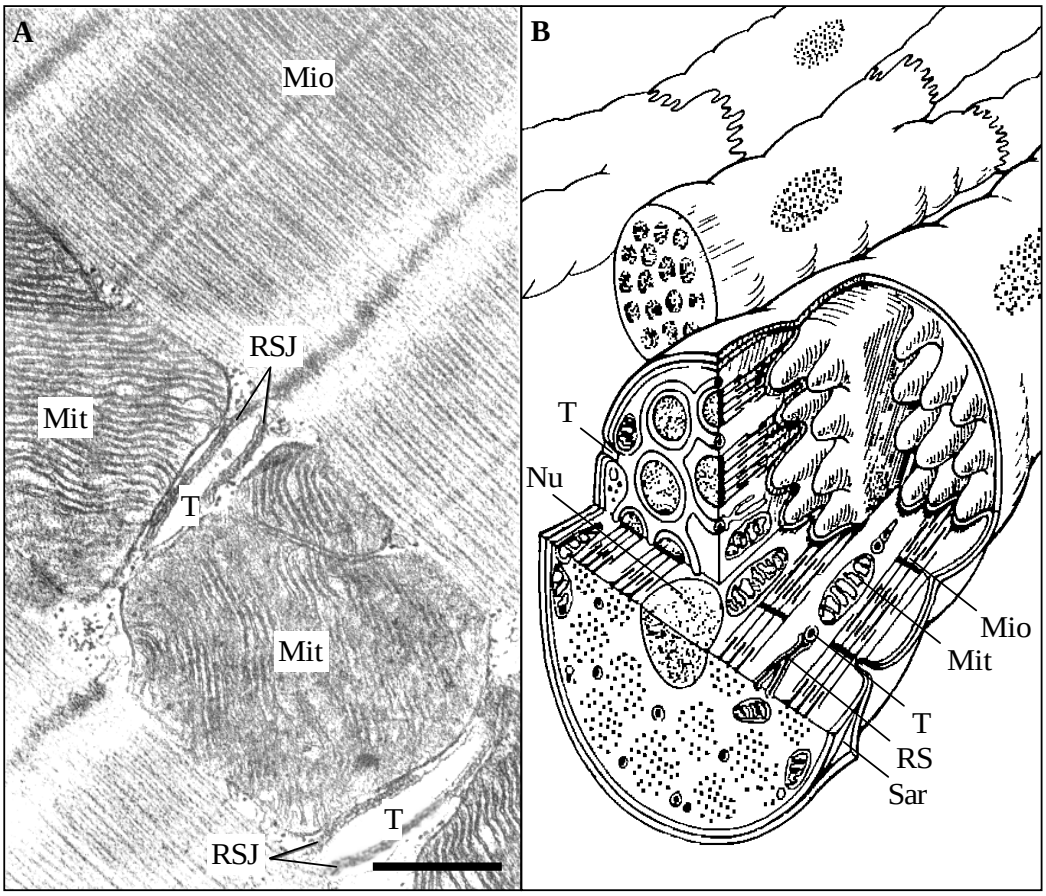


Figura 1 - A. Corte longitudinal de uma fibra muscular cardíaca (adaptado de Scheuermann (1993)). O retículo sarcoplasmático juncional (RSJ) encontra-se em aposição directa, adjacente a cada um dos lados do túbulo-T, formando tríadas. Cada túbulo-T está associado a um sarcómero, próximo da linha-Z.
B. Representação esquemática da organização estrutural do tecido muscular cardíaco.
Mio: miofilamentos, Mit: mitocôndria, Nu: núcleo, RS: retículo sarcoplasmático, RSJ: retículo sarcoplasmático juncional, Sar: sarcolema, T: túbulo-T.

O retículo sarcoplasmático do músculo cardíaco apresenta-se menos desenvolvido relativamente ao músculo esquelético. O retículo sarcoplasmático juncional encontra-se situado em aposição directa, adjacente ao sarcolema e aos túbulos-T de orientação transversal, sob a forma de cisternas terminais (Figura 1-A).

No músculo cardíaco, as cisternas terminais são menos volumosas e frequentemente só uma cisterna terminal se encontra em aposição, em apenas um dos lados, de um túbulo-T, formando a díada ou fenda diádica. No músculo esquelético as tríadas são comuns, com duas cisternas em aposição a um único túbulo-T (McNutt e Fawcett, 1974). Em contraste com o músculo esquelético, as cisternas do retículo cardíaco podem também estar em aposição com os túbulos de orientação longitudinal, longe da periferia da célula, formando o retículo sarcoplasmático corbular

(Scheuermann, 1993). Tanto o retículo sarcoplasmático juncional como o corbular são ricos em calsequestrina (armazenando Ca^{2+}) e canais de Ca^{2+}, sendo desprovidos de Ca^{2+}-ATPases. Aparentemente existe uma homologia entre as duas estruturas (Scheuermann, 1993). Curiosamente, a aposição do retículo sarcoplasmático juncional dos músculos cardíaco e esquelético, implicados na formação das díadas e tríadas respectivas, devem estar estrutural e funcionalmente relacionados. No entanto, o retículo sarcoplasmático corbular não encontra homólogo no músculo esquelético (Sun *et al.*, 1995). É importante notar que no músculo esquelético o retículo sarcoplasmático juncional apresenta maior volume e maior capacidade de armazenamento de Ca^{2+}. No músculo cardíaco as cisternas terminais são menos volumosas e aplanadas, apresentando uma maior superfície de aposição não só com o sarcolema, mas também com os túbulos nas díadas, os quais apresentam um diâmetro superior. A análise ultra-estrutural parece indicar que, o músculo cardíaco deverá possuir compartimentos adicionais e/ou alternativos ao retículo sarcoplasmático, para o armazenamento de Ca^{2+}, e que uma estrutura tão desenvolvida como a fenda diádica deve ter um papel fundamental na homeostasia do Ca^{2+}.

1.1.2 - O Ca^{2+} e a contracção muscular

Embora os músculos não sejam todos activados da mesma maneira, todos requerem um aumento do nível intracelular de Ca^{2+} para desenvolverem a contracção.

A origem do Ca^{2+} intracelular é habitualmente atribuída ao exterior, via canais de Ca^{2+} sensíveis à voltagem (influxo de Ca^{2+}) e/ou a compartimentos intracelulares de armazenamento de Ca^{2+}. O mais conhecido é o retículo sarcoplasmático, que liberta o catião através de canais libertadores de Ca^{2+} (Ca^{2+} transitório). Uma vez no citoplasma, o Ca^{2+} vai activar os miofilamentos e iniciar a contracção.

No músculo esquelético, os sinais eléctricos induzidos pela despolarização do sarcolema são transmitidos directamente aos canais libertadores de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático. A libertação do Ca^{2+} transitório no músculo esquelético não requer o influxo de Ca^{2+}, sendo meramente dependente da voltagem. Pelo contrário, no músculo cardíaco a despolarização do sarcolema não é directamente responsável pelo controlo da

libertação do Ca^{2+} transitório. A libertação de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático é induzida pelo influxo de Ca^{2+} via canais do sarcolema sensíveis à voltagem.

Os iões de Ca^{2+} são o segundo mensageiro, que vai transportar o sinal intracelular responsável pela associação excitação-contracção nas células musculares.

1.1.3 - Associação excitação-contracção

No músculo cardíaco, a excitação do sarcolema é transduzida na contracção dos miofilamentos. O mecanismo pelo qual o sinal electro-químico extracelular é transduzido na actividade mecânica da célula é designado por associação excitação--contracção.

As evidências experimentais existentes favorecem a hipótese inicialmente proposta por Fabiato (1983) para a associação excitação-contracção: Ca^{2+} induz a libertação de mais Ca^{2+}.

De acordo com esta teoria, a despolarização do sarcolema causa o influxo rápido de Ca^{2+} através de canais sensíveis à voltagem e, esta corrente de Ca^{2+} por sua vez vai induzir a libertação de mais catião do retículo sarcoplasmático via canais libertadores de Ca^{2+}.

O influxo inicial serve como sinal indutor, que vai ser amplificado pela libertação de mais Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático. Uma vez no citoplasma, o Ca^{2+} vai activar os miofilamentos e iniciar a contracção.

O relaxamento muscular sucede à contracção e dá-se pela remoção de Ca^{2+} do citoplasma, quer para o retículo sarcoplasmático quer para o meio extracelular. Após serem alcançados os níveis iónicos intracelulares de repouso, um novo ciclo contractivo tem lugar (Figura 2).

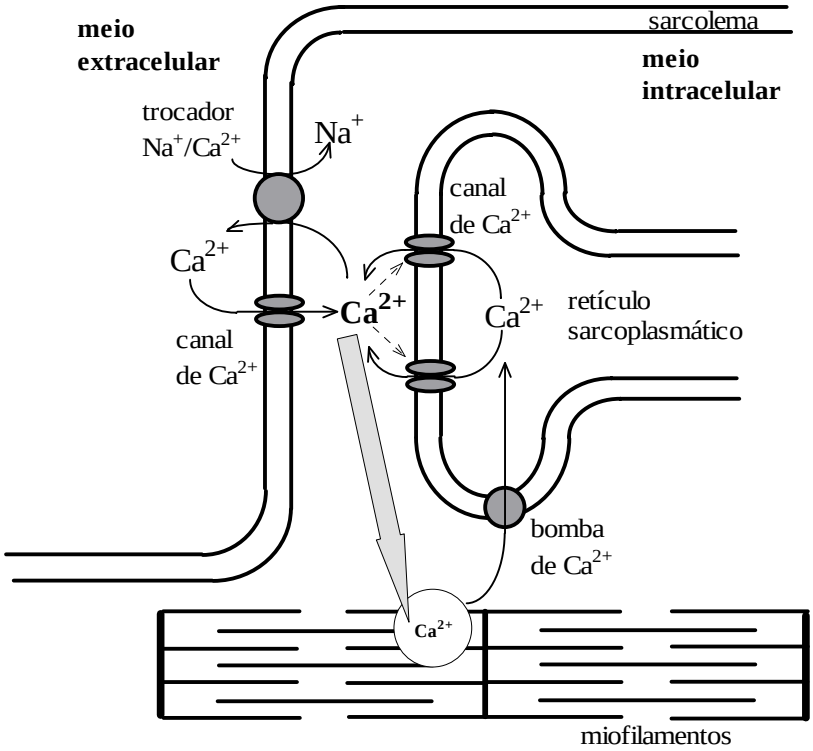


Figura 2 - Representação gráfica dos principais elementos envolvidos no ciclo contractivo do músculo cardíaco. A interacção entre os elementos da associação excitação-contracção, relativamente aos fluxos de Ca^{2+} envolvidos no ciclo contractivo, bem como a sua localização intracelular relativa, estão também representados na figura.

1.1.4 - Elementos da associação excitação-contracção

1.1.4.1 - Canais de Ca^{2+} do sarcolema sensíveis à voltagem

Os canais de Ca^{2+}, reconhecidos pela sua omnipresença desde a paramécia até ao Homem, são responsáveis pela transdução de sinais eléctricos em sinais químicos nas células excitáveis. Os canais de Ca^{2+}, sendo sensíveis à voltagem, controlam o influxo do catião na célula regulando os eventos intracelulares dependentes do Ca^{2+}.

No músculo cardíaco coexistem dois tipos de canais de Ca^{2+} no sarcolema. Os canais de Ca^{2+} tipo-L, que se caracterizam por uma activação a alta voltagem, uma elevada condutância e uma inactivação lenta. E os canais de Ca^{2+} tipo-T que se caracterizam por uma activação a potenciais mais baixos, uma baixa condutância e uma activação rápida (Bean, 1989; Hille, 1992).

Os canais de Ca^{2+} tipo-T contribuem de maneira pouco significativa para o influxo de Ca^{2+} em condições de despolarização do sarcolema. É possível que estes canais desempenhem uma função importante na actividade *pacemaker* (Bean, 1989).

Os canais de Ca^{2+} tipo-L, pelas suas características, vão proporcionar o influxo rápido de Ca^{2+} necessário para induzir a libertação de mais Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático (Bean, 1989; Cleemann e Morad, 1991).

Os canais de Ca^{2+} envolvidos na associação excitação-contracção estão preferencialmente localizados nos túbulos transversos, em zonas adjacentes à fenda diádica (Sun *et al.*, 1995).

1.1.4.2 - Canais libertadores de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático

Os sinais eléctricos são transduzidos através do sarcolema das células musculares cardíacas, em sinais intracelulares transportados pelo Ca^{2+}. Este sinal químico transporta a informação para o funcionamento dos canais libertadores de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático.

Os canais libertadores de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático são activados na presença de concentrações micromolares de Ca^{2+}, libertando o catião para o citosol. Estes canais mantêm uma actividade máxima entre 1 e 100 µM de Ca^{2+}, sendo inactivados para concentrações superiores (Ashley e Williams, 1990). Os canais libertadores de Ca^{2+} estão agrupados em arranjos ordenados, que se estendem para o citoplasma nas regiões juncionais do retículo sarcoplasmático (Anderson *et al.*, 1989; Inui *et al.*, 1987; Sun *et al.*, 1995).

1.1.4.3 - Mecanismos de remoção do Ca^{2+} citoplasmático

A remoção de Ca^{2+} do citoplasma, durante o período de relaxamento, é normalmente atribuída à Ca^{2+}-ATPase e ao trocador Na^{+}/Ca^{2+}.

A Ca^{2+}-ATPase é abundante e está distribuída uniformemente pela membrana do retículo sarcoplasmático, com excepção dos componentes juncional e corbular, onde

está ausente (Jorgensen *et al.*, 1982). Após a libertação induzida de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático durante a contracção, o Ca^{2+} é bombeado, de novo, para o lúmen do retículo sarcoplasmático pela Ca^{2+}-ATPase, assegurando assim a actividade normal do ciclo contractivo.

Os trocadores Na^{+}/Ca^{2+} do sarcolema estão preferencialmente localizados nos túbulos-T, em zonas adjacentes à fenda diádica (Frank *et al.*, 1992). Trocando três Na^{+} por cada Ca^{2+}, o trocador Na^{+}/Ca^{2+} é, possivelmente, a maior via de remoção de Ca^{2+}, sendo suficiente para equilibrar os influxos de Ca^{2+} que originam a contracção (Callewaert, 1992; Langer *et al.*, 1993). O funcionamento do trocador Na^{2+}/Ca^{2+} está dependente dos gradientes electroquímicos de Na^{+} e Ca^{2+}. Em células intactas a constante de dissociação para o Na^{+}, $K_d(Na^{+})$, está compreendido entre 20 e 30 mM e a $K_d(Ca^{2+})$ é cerca de 6 µM (Hilgemann *et al.*, 1992; Langer, 1994; Langer *et al.*, 1993). No entanto, em condições fisiológicas a concentração extracelular de Na^{+} mantém-se constante, e a concentração intracelular não aumenta mais do que 0,2 mM, pelo que o Na^{+} não deve constituir um factor de controle significativo (Langer *et al.*, 1993). O trocador Na^{+}/Ca^{2+} pode também promover o influxo do Ca^{2+} extracelular para a célula (du Toit e Opie, 1993; Levi *et al.*, 1993), mediante condições de elevada concentração de Na^{+} intracelular e de despolarização membranar. Contudo, o influxo de Ca^{2+} por este sistema é muito lento comparado com as correntes que se verificam nas células cardíacas (Callewaert, 1992).

1.1.4.4 - Compartimentos de Ca^{2+}

Um único miócito cardíaco contém cerca de 400×10^{-16} moles de Ca^{2+} disponível para troca (Langer, 1994; Langer *et al.*, 1990), o qual se encontra compartimentado e distribuído intracelularmente (Figura 3).

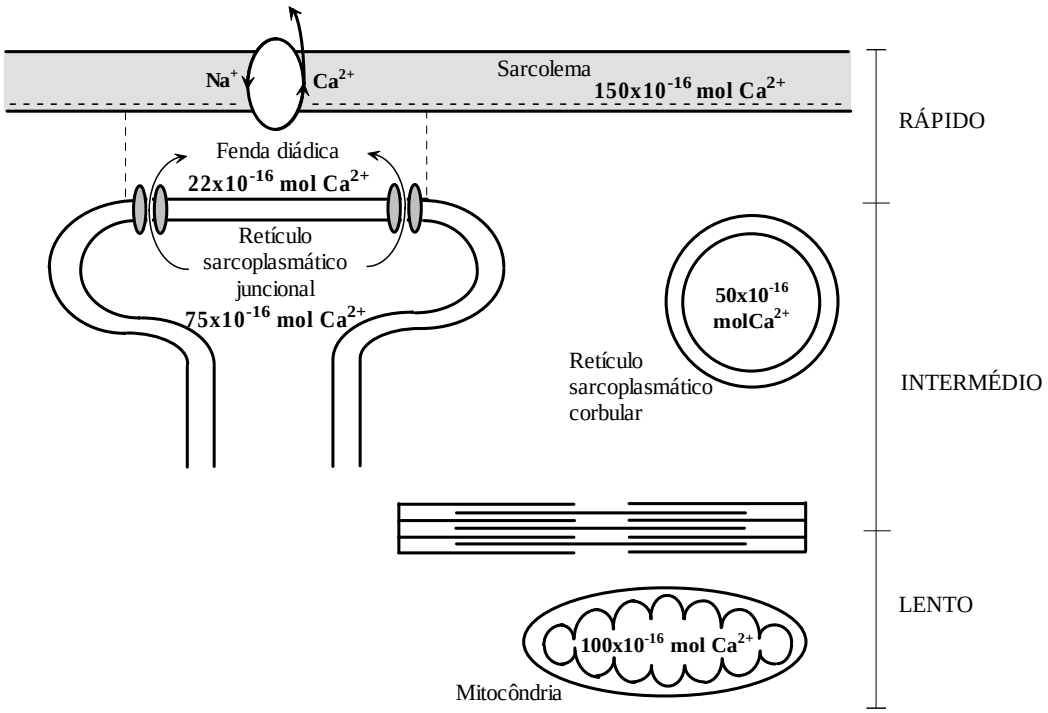


Figura 3 - Compartimentos de Ca^{2+} na célula muscular cardíaca, para $[Ca^{2+}]_o$=1 mM, de acordo com os estudos de Langer et *al.* (1990) realizados em células de ratos adultos. É de salientar, que a capacidade de troca dos compartimentos intracelulares de Ca^{2+} é maior à medida que estes se aproximam do meio extracelular. Este facto poderá explicar a rapidez dos fluxos intracelulares de Ca^{2+}, que estão na origem do ciclo contractivo das células do músculo cardíaco.

Três compartimentos distintos foram descritos e caracterizados cineticamente em miócitos adultos sob perfusão (Langer, 1994; Langer e Rich, 1992; Langer *et al.*, 1990), conforme está representado na Tabela I.

Tabela I - Compartimentos de Ca^{2+} em miócitos adultos: caracterização cinética (dados retirados de Langer et *al.* (1990)).

	Rápido		**Intermédio**		**Lento**
	sarcolema	**fenda diádica**	**retículo sarcoplasm. juncional**	**retículo sarcoplasm. corbular**	**mitocôndria**
Conteúdo 10^{-16} molCa^{2+}/célula	150	22	75	50	100
Tempo de meia vida ($t_{½}$)	<1 s	650 ms	5,5 ms	19 s	3,6 min
Fluxo 10^{-16} molCa^{2+}/célula	112	24	15,6	1,8	0,3

O compartimento lento contem 25% do Ca^{2+} intracelular disponível para troca e foi atribuído à mitocôndria. O fluxo de Ca^{2+} através da membrana mitocondrial é muito pequeno, devendo apenas ser importante na regulação do metabolismo da energética mitocondrial. Contudo, a mitocôndria tem uma grande capacidade para acumular Ca^{2+}, podendo desempenhar um papel crucial em condições patológicas, perante um aumento excessivo da concentração do catião no citosol, para além de 2 µM (Callewaert, 1992; Langer, 1994).

O compartimento intermédio contém cerca de 32% do Ca^{2+} intracelular disponível para troca e é atribuído ao retículo sarcoplasmático. O Ca^{2+} é armazenado neste organito em cisternas especializadas, denominadas por retículo sarcoplasmático juncional e corbular, onde o Ca^{2+} é tamponizado por calsequestrina. O compartimento intermédio não é cineticamente homogénio, sendo constituído por dois componentes exponenciais. O mais rápido ($t_{½}$= 3,5 s), contém 60% do Ca^{2+} armazenado neste compartimento, e deverá corresponder ao retículo sarcoplasmático juncional. O outro componente, mais lento ($t_{½}$= 19 s), contém menos Ca^{2+} (40%) e deverá residir no retículo sarcoplasmático corbular, que se encontra mais afastado do sarcolema (Langer, 1994; Langer *et al.*, 1990).

O ciclo contractivo é iniciado pela entrada de 2×10^{-16} mol Ca^{2+}/célula via os canais do sarcolema, que induzem a libertação de cerca de $12{,}5\times10^{-16}$ mol Ca^{2+}/célula do retículo sarcoplasmático. Contudo, é necessário um aumento de cerca de $32{,}5\times10^{-16}$ mol/célula para o desenvolvimento da contracção, que atendendo à capacidade intracelular de tamponização se traduz numa concentração efectiva inferior a 2 µM (Langer, 1994).

O compartimento rápido não só é responsável por mais de 88% do fluxo celular de Ca^{2+}, como também contém praticamente metade (43%) do Ca^{2+} disponível para troca.

A maioria do Ca^{2+} do compartimento rápido é desalojado na presença de lantânio (La^{3+}). A localização desta fracção é atribuída ao sarcolema (Post e Langer, 1992a, b). Os fosfolípidos aniónicos, no folheto interno da membrana, constituem os principais locais de ligação do Ca^{2+} ao sarcolema. Os restantes elementos da membrana, como as proteínas, embora possam apresentar maior afinidade pelo Ca^{2+}, apresentam menor capacidade (Post e Langer, 1992b).

A fosfatidiletanolamina da monocamada exoplásmica e os açucares acídicos do glicocálix deverão também contribuir para a ligação do Ca^{2+}, à superfície externa do sarcolema.

Uma vez que os fosfolípidos se apresentam como locais de ligação de Ca^{2+} de baixa afinidade ($K_d = 1{,}1$ mM) mas de grande capacidade, o seu significado parece estar confinado a regiões intracelulares onde a concentração local do catião é bastante superior ao nível intracelular (Post e Langer, 1992a, b). Deverá ser o caso da fenda diádica, onde o sarcolema e o retículo sarcoplasmático estão em estreita proximidade, cerca de 10 nm, e onde ocorre a maioria dos fluxos de Ca^{2+} durante o ciclo contractivo. Por outro lado, o Ca^{2+} armazenado pelo sarcolema está em equilíbrio com o catião do retículo sarcoplasmático. Uma redução do Ca^{2+} do compartimento intermédio leva à diminuição do compartimento rápido (Post e Langer, 1992a).

A outra fracção do compartimento rápido é mais pequena e não é removida na presença de La^{3+}. O fluxo de Ca^{2+} deste compartimento está exclusivamente dependente do trocador Na^{+}/Ca^{2+} (Langer e Rich, 1992). Além disso, este compartimento está em equilíbrio não só com retículo sarcoplasmático, mas também com o Ca^{2+} ligado ao sarcolema, pelo que a sua localização tem sido atribuída à fenda diádica (Langer e Rich, 1992; Langer *et al.*, 1995).

Aparentemente, a fenda diádica actua como um intermediário entre o sarcolema e o retículo sarcoplasmático. O conteúdo de Ca^{2+} da fenda diádica parece dever-se não só à estrutura da fenda e à libertação directa de Ca^{2+} que aí se dá, proveniente do exterior e do retículo sarcoplasmático, mas também à constituição e distribuição assimétrica dos fosfolípidos do sarcolema (Post *et al.*, 1988a).

Os mesmos compartimentos foram também descritos para miócitos de ratos recém-nascidos (Kuwata e Langer, 1989). Pequenas diferenças surgem a nível quantitativo, devido a diferenças no estado de desenvolvimento e organização de organitos e estruturas celulares envolvidas no fenómeno de contracção, nomeadamente do retículo sarcoplasmático e do sarcolema. Apesar de nos cardiomiócitos de ratos recém-nascidos, o sistema de túbulos-T estar ausente e o retículo sarcoplasmático estar pouco desenvolvido, as regiões de justaposição do sarcolema com o retículo sarcoplasmático, correspondentes às fendas diádicas, estão presentes.

1.1.5 - Importância da compartimentação do Ca^{2+} em espaços subcelulares de difusão restrita

A relevância do Ca^{2+}, como sinal intracelular, advém da capacidade da célula em manter a concentração de repouso do Ca^{2+} em níveis bastante mais baixos, em relação aos níveis extracelulares. Contudo, os elementos da associação excitação-contracção sensíveis ao Ca^{2+}, para poderem responder aos sinais do catião, requerem concentrações superiores àquelas existentes no citosol.

A concentração de Ca^{2+} livre numa célula miocardial em repouso é de cerca de 0,15 µM (Isenberg *et al.*, 1996; Wier *et al.*, 1987), não atingindo mais do que 1 µM durante um pico transitório de uma célula em contracção. Nessa gama de concentrações os canais libertadores de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático estariam quase sempre activados, o que levaria ao esgotamento de Ca^{2+} desse compartimento (Stern, 1992). Por outro lado, os trocadores Na^{+}/Ca^{2+}, com um $K_d(Ca^{2+})$ de cerca de 6 µM, teriam uma actividade bastante reduzida. Assim, a actividade fisiológica de alguns elementos, fundamentais na associação excitação-contracção, só pode ser considerada se eles estiverem localizados num espaço subcelular onde a difusão do Ca^{2+} é restrita. Aparentemente, tanto os trocadores Na^{+}/Ca^{2+} como os canais de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático e do sarcolema estão preferencialmente localizados na zona de justaposição do retículo sarcoplasmático com o sarcolema, denominada por fenda diádica. Pelo que, a maioria dos fluxos iónicos de Ca^{2+} do ciclo contráctil se devem realizar na fenda diádica (Figura 3). É possível que aí a difusão do Ca^{2+} esteja restrita a 20% da difusão livre (Langer *et al.*, 1993).

Os espaços subcelulares de difusão restrita de Ca^{2+}, actuam como amplificadores do sinal. Pequenos fluxos iónicos dão origem a alterações significativas de concentração, nas proximidades de estruturas funcionalmente relevantes que aí se localizem. Assim, a quantidade de Ca^{2+} requerida é reduzida, minimizando os custos energéticos inerentes aos sistemas transportadores de Ca^{2+} (Niggli e Lipp, 1993).

1.2 - Organização e função da fracção lipídica do sarcolema na associação excitação-contracção

1.2.1 - Caracterização do sarcolema

1.2.1.1 - Composição lipídica do sarcolema

A membrana plasmática das células musculares cardíacas, o sarcolema, comporta-se como uma barreira semi-permeável que contem bombas, trocadores e canais que controlam os fluxos iónicos envolvidos na associação excitação-contracção do coração.

O sarcolema é constituído predominantemente por fosfolípidos, proteínas e colesterol. As razões fosfolípido/proteína (µmol/mg) e fosfolípido/colesterol (nmol/nmol) foram estimadas em 1,4 e 2 respectivamente (Post *et al.*, 1988a).

De maneira semelhante ao que acontece na maioria das membranas biológicas, os fosfolípidos estão organizados numa estrutura em bicamada, com os ácidos gordos hidrofóbicos orientados para o seu interior. O colesterol insere-se nesta estrutura interagindo com os fosfolípidos, assim como as proteínas conforme o modelo inicialmente proposto por Singer e Nicolson (1972).

A composição fosfolipídica do sarcolema isolado de miócitos puros está representada na Tabela II, para ratos recém-nascidos (Post *et al.*, 1988a) e para ratos adultos (Weglicki *et al.*, 1980).

Tabela II - Composição fosfolipídica do sarcolema isolado de miócitos de ratos recém--nascidos (Post *et al.*, 1988a) e adultos (Weglicki *et al.*, 1980).

	Ratos recém-nascidos	**Ratos adultos**
Fosfatidilcolina	53,3%	48,5%
Esfingomielina	13,8%	13,4%
Fosfatidiletanolamina	25,5%	27,5%
Fosfatidilserina e fosfatidilinositol	7,4%	10,6%

Em ambos os casos a composição fosfolipídica é semelhante. A fosfatidilcolina e a fosfatidiletanolamina apresentam-se como as duas classes fosfolipídicas mais abundantes, enquanto que a esfingomielina e os fosfolípidos aniónicos (fosfatidilserina e fosfatidilinositol) se encontram em percentagens consideravelmente inferiores.

O isolamento do sarcolema de miócitos purificados é vantajoso porque a fracção de membrana plasmática está livre de contaminações de células endoteliais, fibroblastos e outras células existentes no coração intacto.

A composição do sarcolema relativamente à constituição em ácidos gordos, de cada uma das espécies fosfolipídicas, foi também estudada e está representada na Figura 4.

Os valores apresentados para miócitos de ratos recém-nascidos (Matos *et al.*, 1990) e de ratos adultos (Bester e Lochner, 1988) revelam algumas diferenças significativas. Essas diferenças traduzem-se na existência de um maior número de insaturações nos ácidos gordos dos ratos adultos.

No sarcolema de ratos recém-nascidos, a fosfatidilcolina é rica em ácidos gordos saturados, 16:0 e 18:0, os quais perfazem quase 50% do total, seguindo-se as espécies insaturadas 18:1 e 18:2. Nas fracções de fosfatidiletanolamina e de fosfatidilserina/fosfatidilinositol cerca de 70% dos ácidos gordos estão caracteristicamente nas formas 18:0 e 20:4. No entanto, no sarcolema de ratos adultos verifica-se a existência do ácido gordo 22:6 em quantidades cerca de 3 vezes superiores, para qualquer uma das espécies fosfolipídicas referidas, relativamente aos ratos recém--nascidos. Esta diferença deve-se possivelmente ao efeito da idade na composição específica em ácidos gordos das células cardíacas.

As espécies moleculares de cada uma das classes fosfolipídicas, do sarcolema de ratos adultos, foram determinadas por um outro método, aplicando HPLC de fase reversa (Vecchini *et al.*, 1997). As espécies moleculares de fosfatidiletanolamina e fosfatidilserina estão representadas na Tabela III, bem como as respectivas massas percentuais, as quais confirmam os estudos previamente referidos.

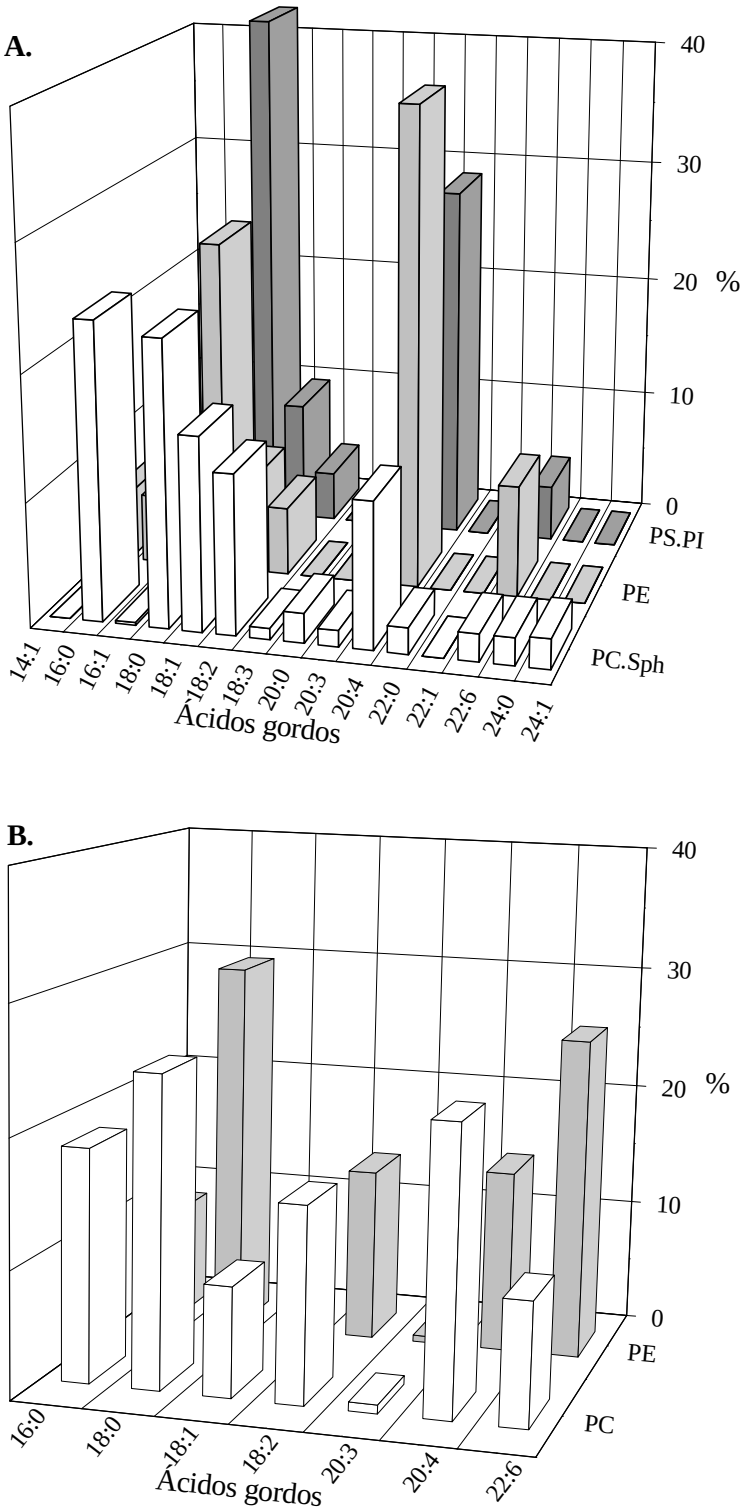


Figura 4 - Composição em ácidos gordos de classes fosfolipídicas do sarcolema: **A.** ratos recém-nascidos (Matos *et al.*, 1990) e **B.** ratos adultos (Bester e Lochner, 1988).
PC: fosfatidilcolina, PE: fosfatidiletanolamina, PI: fosfatidilinositol, PS: fosfatidilserina, Sph: esfingomielina.

Tabela III - Espécies moleculares de fosfatidiletanolamina e de fosfatidilserina do sarcolema de ratos adultos (Vecchini *et al.*, 1997).

	Fosfatidiletanolamina	**Fosfatidilserina**
16:0/16:0	3,5 ± 0,1	1,6 ± 0,1
16:0/18:0	4,8 ± 0,4	3,4 ± 0,2
16:0/18:1	-	10,7 ± 0,1
16:0/18:2	2,9 ± 0,2	3,4 ± 0,3
16:0/18:3	1,9 ± 0,2	-
16:0/20:3	0,9 ± 0,1	4,0 ± 0,5
16:0/20:4	4,5 ± 0,2	2,3 ± 0,3
16:0/22:4	6,6 ± 1,0	-
16:0/22:6	4,0 ± 0,3	-
16:1/18:0	-	2,1 ± 0,1
18:0/16:0	-	4,0 ± 0,3
18:0/18:1	2,0 ± 0,3	-
18:0/18:2	6,6 ± 0,2	3,9 ± 0,1
18:0/18:3	-	2,1 ± 0,2
18:0/20:3	0,8 ± 0,1	-
18:0/20:4	15,6 ± 1,1	15,5 ± 1,0
18:0/22:4	0,5 ± 0,2	3,2 ± 0,3
18:0/22:5	3,0 ± 0,3	1,1 ± 0,3
18:0/22:6	15,9 ± 1,3	21,3 ± 1,1
18:1/16:0	-	2,4 ± 0,1
18:1/16:1	0,7 ± 0,1	1,4 ± 0,2
18:1/18:0	2,2 ± 0,2	4,6 ± 0,1
18:1/18:1	8,4 ± 0,3	9,2 ± 0,3
18:1/18:2	5,2 ± 0,5	-
18:1/20:4	1,1 ± 0,1	-
18:1/22:4	0,9 ± 0,1	2,8 ± 0,2
18:1/22:6	7,8 ± 0,5	-

1.2.1.2 - Assimetria lipídica

A distribuição assimétrica das classes fosfolipídicas entre os dois folhetos da bicamada foi determinada por Verkleij (1973), para a membrana dos eritrócitos. Nesses estudos as fosfolipases, nomeadamente a fosfolipase A_2, foram utilizadas como uma ferramenta na determinação da distribuição assimétrica dos fosfolípidos na membrana plasmática.

A membrana plasmática dos eritrócitos tem sido exaustivamente estudada devido à inexistência de sistemas membranares intracelulares, que se apresentam nas outras células como potenciais contaminantes.

A assimetria lipídica apresenta-se até aos nossos dias não só como uma característica de viabilidade e de vida celular, mas também como um sinal da dinâmica e da importância da membrana plasmática na actividade de qualquer célula.

A distribuição dos fosfolípidos no sarcolema de miócitos puros de ratos recém--nascidos foi determinada por Post (1988a) (Figura 5). Enquanto que os fosfolípidos aniónicos, fosfatidilserina e fosfatidilinositol, estão confinados exclusivamente ao folheto interno do sarcolema e 75% da fosfatidiletanolamina do sarcolema está também localizada no folheto interno, 43% da fosfatidilcolina e 93% da esfingomielina encontram-se situados no folheto externo do sarcolema.

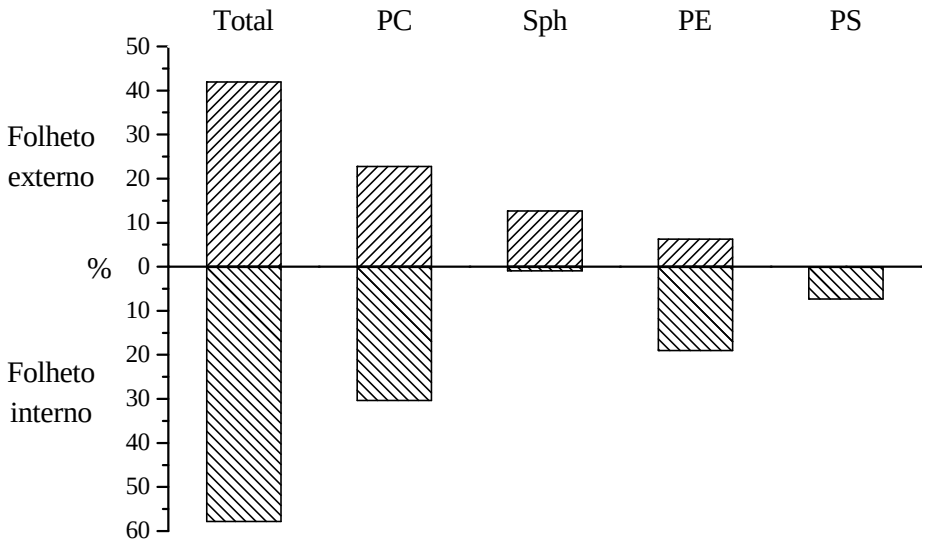


Figura 5 - Distribuição assimétrica dos fosfolípidos no sarcolema de ratos recém-nascidos, segundo os estudos de Post *et al.* (1988a).
PC: fosfatidilcolina, PE: fosfatidiletanolamina, PS: fosfatidilserina, Sph: esfingomielina.

Curiosamente, a composição em ácidos gordos das classes fosfolipídicas fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina é idêntica para as monocamadas interna e externa do sarcolema (Matos *et al.*, 1990). Contudo, os fosfolípidos aniónicos e a esfingomielina estão praticamente confinados a um dos folhetos do sarcolema e consequentemente os seus ácidos gordos contribuem exclusivamente para o folheto interno e externo, respectivamente, da bicamada lipídica.

Assim os ácidos gordos, constituintes dos fosfolípidos do sarcolema, encontram--se ditribuídos assimetricamente pelos dois folhetos da bicamada lipídica, conforme a Figura 6. O folheto interno é relativamente enriquecido em ácidos gordos insaturados, enquanto que o folheto externo é favorecido pelos ácidos gordos saturados.

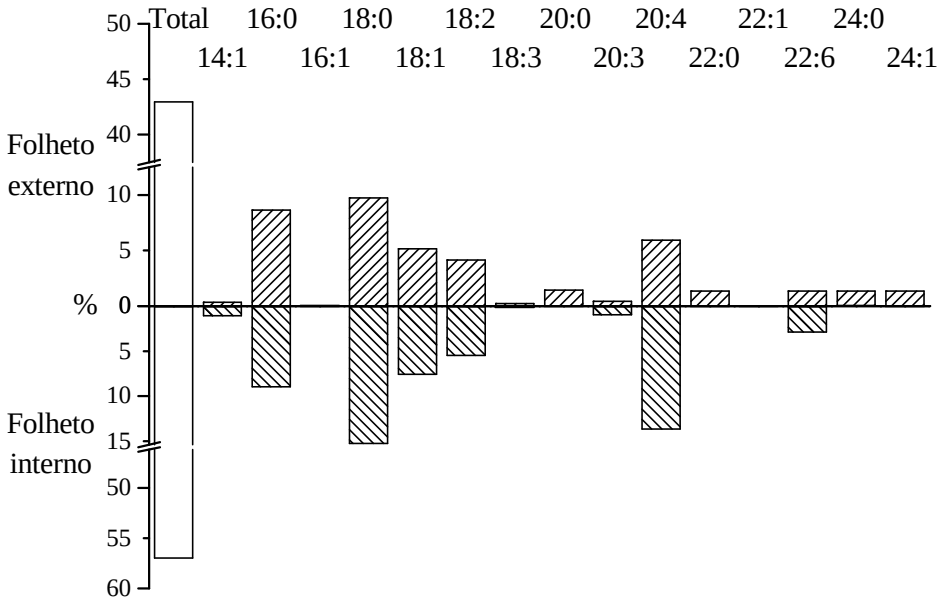


Figura 6 - Distribuição assimétrica dos ácidos gordos dos fosfolípidos do sarcolema de ratos recém-nascidos, segundo os estudos de Matos *et al.* (1990).

O colesterol deverá estar localizado preferencialmente no folheto externo do sarcolema. Esta afirmação é apoiada não só pelos estudos de "*freeze fracturing*" realizados em membranas de eritrócitos (Fisher, 1976), mas também pelo facto de que o colesterol apresenta uma grande afinidade por esfingomielina, relativamente às outras classes fosfolipídicas (Demel *et al.*, 1977), a qual se encontra quase exclusivamente no folheto externo do sarcolema.

A assimetria lipídica no sarcolema, nomeadamente dos aminofosfolípidos, deverá ter origem em mecanismos dependentes de ATP e mediados por enzimas (as flipases ou translocases), de maneira semelhante ao que é descrito para outras células eucarióticas, como os eritrócitos (Diaz e Schroit, 1996; Schroit e Zwaal, 1991).

1.2.1.3 - Distribuição lateral e bidimensional dos fosfolípidos

Segundo o trabalho de Virtanen *et al.* (1998) os fosfolípidos da membrana plasmática, nativa, dos eritrócitos humanos têm tendência em adoptar uma distribuição lateral regular, formando estruturas supramoleculares de simetria hexagonal (Figura 7).

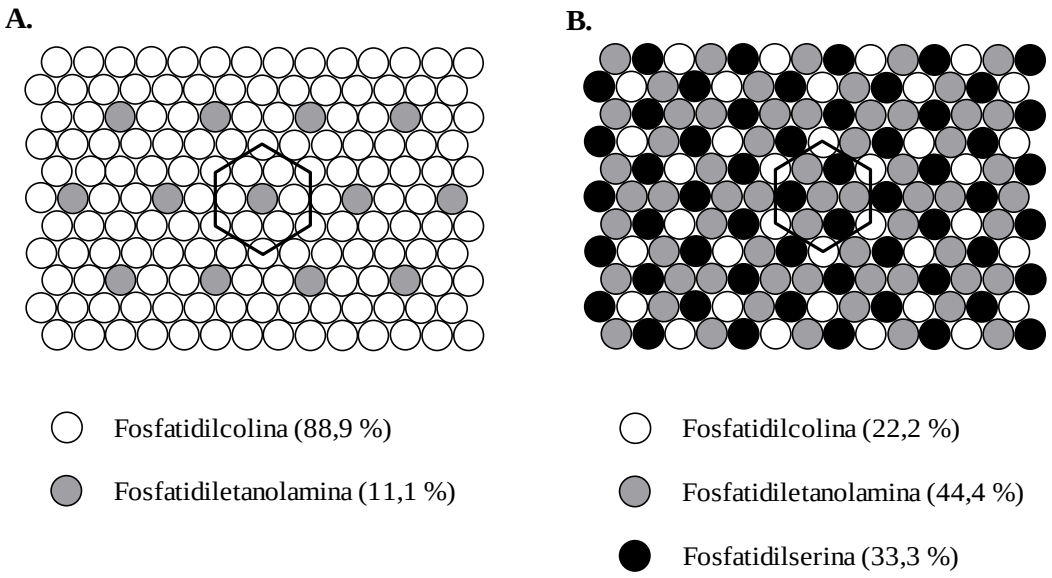


Figura 7 - Distribuição lateral das classes fosfolipídicas, proposta por Virtanen *et al.* (1998) para os folhetos **A.** externo e **B.** interno da membrana de eritrócitos humanos.

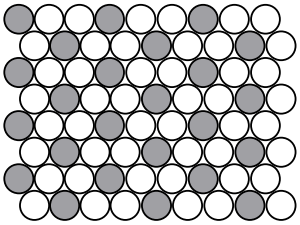
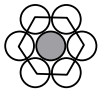
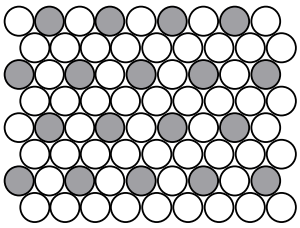
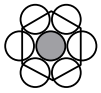
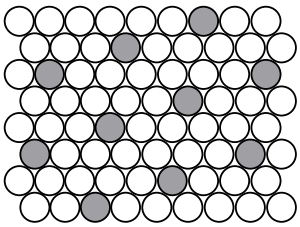
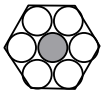
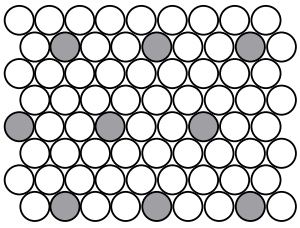
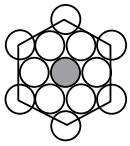
A tendência dos componentes lipídicos em adoptarem uma distribuição lateral regular de simetria hexagonal já havia sido evidenciada anteriormente para misturas binárias de fosfatidilcolina com pirenodecanoil-fosfolípidos (Somerharju *et al.*, 1985), colesterol (Virtanen *et al.*, 1995) e fosfatidiletanolamina (Cheng *et al.*, 1997).

De acordo com este modelo (Somerharju *et al.*, 1999), os grupos polares dos fosfolípidos são os elementos básicos das estruturas regulares. As espécies fosfolipídicas constituídas por grupos polares idênticos, relativamente ao tamanho e/ou carga, são considerados equivalentes, formando uma única classe. Assim, os fosfolípidos que contêm colina, a fosfatidilcolina e a esfingomielina, formam uma classe; os fosfolípidos aniónicos, fosfatidilserina e fosfatidilinositol, formam outra; e a fosfatidiletanolamina isolada forma uma terceira classe.

A classe de maior fracção molar, normalmente constituída pelos fosfolípidos que contêm colina, é designada por hospedeira enquanto que as restantes classes, de menor fracção molar, são designadas por hóspedes.

No caso de misturas binárias, as estruturas supramoleculares de simetria hexagonal mais simples e pequenas são constituídas por 3, 4, 7 e 9 elementos básicos (grupos polares) (Tabela IV).

Tabela IV - Arranjos regulares de simetria hexagonal em misturas binárias.

x_h	Arranjo lateral regular	Estrutura supramolecular	P
33,3			3
25,0			4
14,3			7
11,1			9

x_h, fracção molar da classe hóspede;
P, número de elementos básicos da estrutura supramolecular

A posição de qualquer elemento no arranjo regular pode ser dada por duas coordenadas inteiras. Para tal basta escolher um dos elementos da classe hóspede como origem, e a partir daí definir os eixos coordenados (*u* e *v*) os quais devem formar entre si um ângulo de 60º (Figura 8).

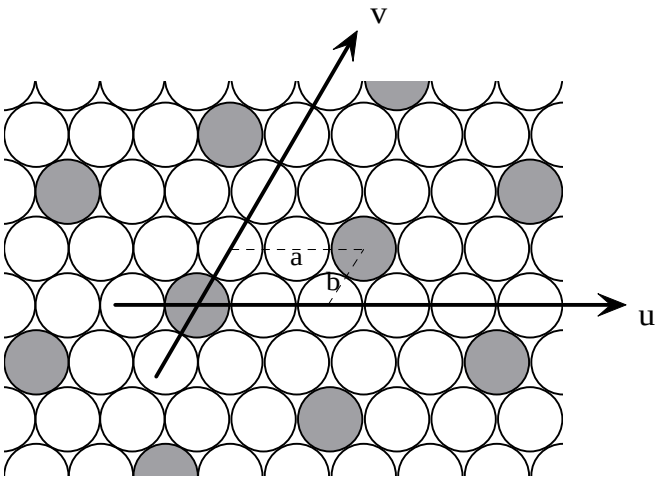


Figura 8 - Ilustração de um arranjo regular de simetria hexagonal e determinação das coordenadas de um elemento.

As estruturas supramoleculares hexagonais são defenidas pela equação:

$$P = a^2 + ab + b^2 , \qquad (1)$$

onde *P* é o número de elementos básicos numa estrutura supramolecular e *a* e *b* são as coordenadas do elemento hóspede mais próximo da origem definida, segundo o plano positivo *uv* (Figura 8).

A composição do arranjo regular é obtida pelas seguintes equações:

$$x_h = \frac{1}{P} \qquad (2)$$

$$x_H = 1 - \frac{1}{P} \qquad (3)$$

onde x_h e x_H são as fracções molares da classe hóspede e hospedeira, respectivamente.

O folheto externo da membrana dos eritrócitos, assim como no sarcolema, é constituído apenas por duas classes de grupos polares, podendo ser analizado em termos de uma estrutura binária. No entanto, o folheto interno, de ambas as membranas, contém três classes e terá de ser racionalizado por uma estrutura ternária.

As estruturas supramoleculares ternárias de simetria hexagonal derivam de outras binárias com 9 elementos, pela substituição de elementos básicos da classe hospedeira por elementos hóspedes, em posições simetricamente equivalentes (Figura 9).

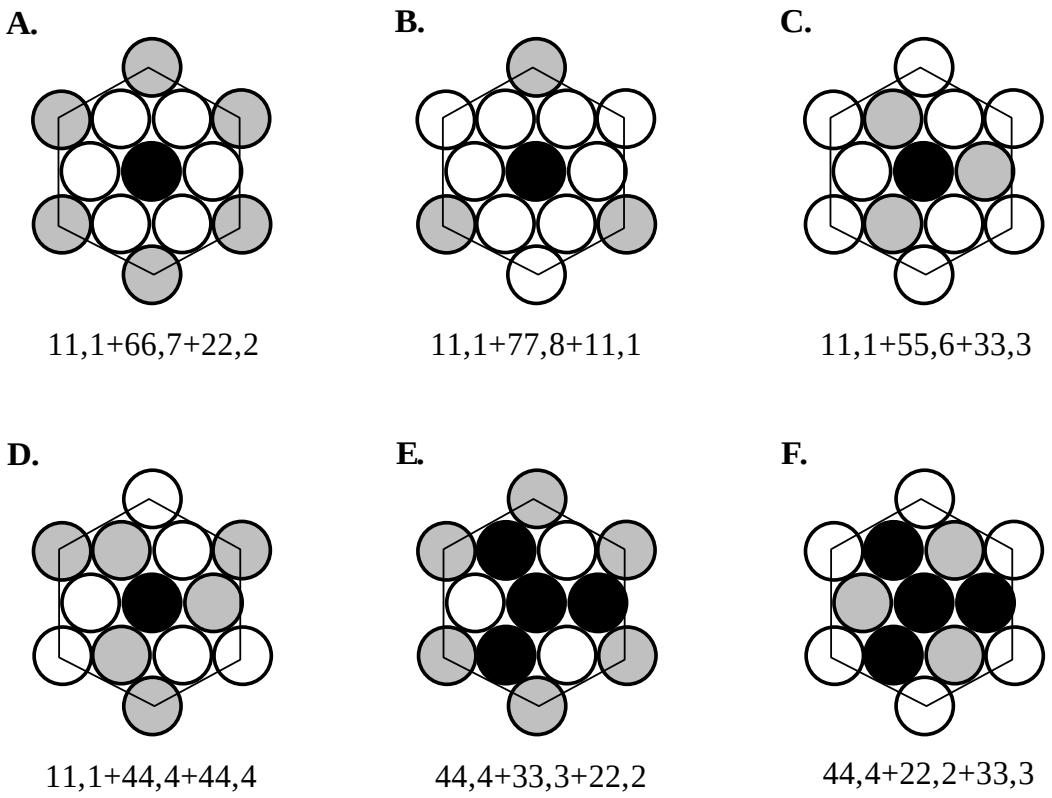


Figura 9 - Estruturas supramoleculares ternárias de simetria hexagonal.

Nesses arranjos regulares as fracções molares dos componentes são múltiplas de $\frac{1}{9}$: 0,111; 0,222; 0,333; 0,444; etc.

As composições fosfolipídicas determinadas para cada um dos folhetos da membrana de eritrócitos, de várias espécies de mamíferos, são semelhantes à distribuição das classes previstas para um arranjo regular de simetria hexagonal

(Tabela V). Claramente, estas semelhanças estão muito além de uma mera coincidência, entre os valores experimentais e os valores previstos.

Tabela V - Composições fosfolipídicas, de cada um dos folhetos da membrana, de eritrócitos[a] de várias espécies de mamíferos e do sarcolema de miócitos[b] de rato. Entre parênteses estão indicados valores previstos para um arranjo regular de simetria hexagonal.

	ERITRÓCITO								**SARCOLEMA**	
	Macaco		***Cavalo***		***Coelho***		***Rato***		***Rato***	
	Folheto externo	**Folheto interno**	**Folheto externo**	**Folheto interno**	**Folheto externo**	**Folheto interno**	**Folheto externo**	**Folheto interno**	**Folheto externo**	**Folheto interno**
Fosfatidilcolina e esfingomielina	89,4 (88,9)	23,1 (22,2)	79,7 (77,8)	33,2 (33,3)	87,8 (88,9)	26,1 (22,2)	87,8 (88,9)	31,3 (33,3)	84,8 (85,7)	53,3 (55,6)
Fosfatidiletanolamina	10,6 (11,1)	43,0 (44,4)	20,3 (22,2)	35,6 (33,3)	12,2 (11,1)	56,9 (55,6)	10,2 (11,1)	39,2 (33,3)	15,2 (14,3)	33,7 (33,3)
Fosfolípidos aniónicos	0,0 (0,0)	33,9 (33,3)	0,0 (0,0)	31,2 (33,3)	0,0 (0,0)	16,9 (22,2)	2,0 (0,0)	29,5 (33,3)	0,0 (0,0)	13,0 (11,1)

[a] retirado de Virtanen *et al.* (1998); [b] retirado de Post *et al.* (1988a)

A formação de arranjos regulares de simetria hexagonal, pelos grupos polares dos fosfolípidos, é atribuída principalmente a factores estéricos e a interacções repulsivas (Somerharju *et al.*, 1999).

No caso da fosfatidilcolina e da fosfatidiletanolamina verifica-se uma grande discrepância entre as áreas transversais do grupo polar e das cadeias acil all-*trans*. Isoladamente, o empacotamento de cada uma destas classes pode ser considerado sob tensão. No entanto, quando a fosfatidilcolina e a fosfatidiletanolamina são misturadas deverá ocorrer uma diminuição da tensão de empacotamento, devido à complementaridade das suas formas.

A tensão de empacotamento deverá ser mínima quando os fosfolípidos adoptam uma distribuição regular, permitida para as fracções fosfolipídicas previstas pelo modelo.

No caso dos fosfolípidos aniónicos as interacções repulsivas mútuas devem impedir que estes ocupem posições adjacentes na membrana.

Assim, os arranjos regulares de simetria hexagonal são distribuições laterais dos grupos polares onde a tensão de empacotamento é mínima. A tensão de empacotamento resulta não só das diferentes formas lipídicas, mas também da repulsão entre grupos polares. A diminuição da tensão de empacotamento ocorre quando o empacotamento e as interacções entre as cadeias lipídicas é maior. As distribuições laterais regulares são,

também, favorecidas pela entropia rotacional dos grupos polares (Eldridge, 1993; Somerharju *et al.*, 2009).

Contudo, convém salientar que os arranjos regulares devem ser considerados como estados de energia mínima da bicamada e não como estados permanentes. Os arranjos regulares deverão estar limitados tanto espacial como temporalmente, coexistindo dinamicamente com domínios de arranjos irregulares (ao acaso).

Foi argumentado que a distribuição lateral regular dos lípidos da membrana plasmática dos eritrócitos e também das plaquetas, de várias espécies de mamíferos, pode ser prevista pela composição fosfolipídica de cada um dos folhetos (Cheng *et al.*, 1997; Virtanen *et al.*, 1998). O mesmo se pode aplicar à membrana plasmática das células musculares cardíacas, o sarcolema. De maneira semelhante à membrana dos eritrócitos, a composição fosfolipídica determinada para cada um dos folhetos do sarcolema (Tabela V) é semelhante à distribuição das classes prevista para um arranjo regular de simetria hexagonal (Figura 10).

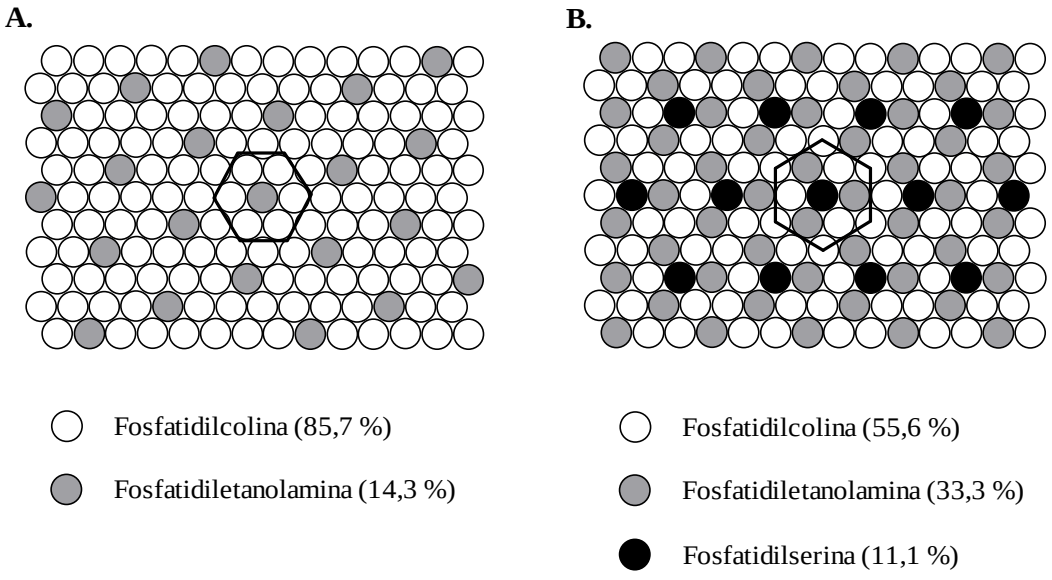


Figura 10 - Distribuição lateral das classes fosfolipídicas do sarcolema, de acordo com o modelo de Somerharju *et al.* (1999), para o folheto **A.** externo e **B.** interno.

1.2.2 - Função dos fosfolípidos na associação excitação-contracção

Apesar do sarcolema, como um todo, isolar o meio intracelular do meio exterior, uma pequena fracção desta membrana tem merecido uma atenção especial. Trata-se da fracção dos túbulos-T, que está em aposição directa com o retículo sarcoplasmático juncional na fenda diádica, e onde deverão estar situadas a maioria das proteínas envolvidas na associação excitação-contracção. É o caso dos canais de Ca^{2+}, do sarcolema e do retículo sarcoplasmático, e dos trocadores Na^{+}/Ca^{2+}.

O destaque tem sido dirigido para os fosfolípidos aniónicos, que se localizam exclusivamente no folheto interno da membrana, e para a sua função e importância na associação excitação-contracção.

Foi demonstrado que as proteínas responsáveis pela homeostasia do Ca^{2+} no músculo cardíaco são moduladas pelo ambiente lipídico que as rodeia (Bastiaanse *et al.*, 1994; Vemuri e Philipson, 1987, 1989, 1990). A influência dos lípidos pode ser exercida quer indirectamente, por alteração das propriedades físico-químicas do sarcolema, como a fluidez e o potencial membranar, quer directamente por interacção directa dos lípidos com as proteínas.

Concretamente, a actividade dos transportadores catiónicos do sarcolema, como o trocador Na^{+}/Ca^{2+} e a Na^{+}/K^{+}-ATPase, é substancialmente estimulada pela presença de fosfolípidos aniónicos (Vemuri e Philipson, 1987, 1989). O mesmo se aplica à Ca^{2+}-ATPase do retículo sarcoplasmático (Vemuri e Philipson, 1989). Em ambos os casos a actividade óptima é atingida para cerca de 50 mol% de fosfatidilserina ou de cardiolipina.

Em sistemas reconstituídos na presença de fosfatidilserina (na ausência de cardiolipina), a actividade máxima de todas as proteínas transportadoras do sarcolema requer também a presença de colesterol (Bastiaanse *et al.*, 1994; Vemuri e Philipson, 1987, 1989). A quantidade de colesterol requerida é semelhante aos níveis endógenos do sarcolema, cerca de 35 mol%. Contudo, a actividade da Ca^{2+}-ATPase do retículo sarcoplasmático não é afectada pela presença de colesterol.

Curiosamente, as membranas plasmáticas são ricas em colesterol, enquanto que as membranas subcelulares são substancialmente mais ricas em cardiolipina e pobres em colesterol. Assim, a actividade das proteínas transportadoras, envolvidas na associação excitação-contracção, deverá estar optimizada de acordo com o ambiente lipídico *in vivo*, com o qual interagem (Vemuri e Philipson, 1989).

As actividades dos transportadores catiónicos, do sarcolema e do retículo sarcoplasmático, são também influenciadas pela composição em ácidos gordos da fosfatidilcolina e fosfatidilserina. Em ambos os casos, a actividade máxima tende a ocorrer para sistemas reconstituídos em que as espécies de fosfatidilcolina são saturadas e a fosfatidilserina insaturada, particularmente quando o comprimento das duas classes é diferente (Vemuri e Philipson, 1990).

Aparentemente, a actividade dos transportadores é estimulada pela desordem associada aos fosfolípidos aniónicos, como a fosfatidilserina.

Vários estudos indicam que o sarcolema deverá ter, também, um papel fundamental no armazenamento e fluxo celulares de Ca^{2+}. A ligação do Ca^{2+} ao sarcolema cardíaco está intimamente correlacionada com a função contráctil (Philipson *et al.*, 1980b). Um aumento do Ca^{2+} ligado ao sarcolema coincide sempre com um aumento da contracção celular.

Nas células musculares cardíacas a maioria do Ca^{2+} compartimentado movimenta-se muito rapidamente. Em miócitos de ratos adultos este compartimento contem cerca de 45% (Langer *et al.*, 1990) e em ratos recém-nascidos cerca de 66% (Kuwata e Langer, 1989) do Ca^{2+} disponível para troca. A quantidade de Ca^{2+} existente neste compartimento rápido é suficiente para, por si só, causar a contracção celular.

A rapidez de troca, bem como a acessibilidade deste compartimento a La^{3+}, (que substitui o Ca^{2+} devido à sua grande afinidade pelo sarcolema) indicam que este compartimento se encontra no sarcolema e/ou no meio intracelular em equilíbrio rápido com o sarcolema (Post e Langer, 1992a).

Cerca de 80% do Ca^{2+} existente no compartimento rápido tem a sua origem na fracção lipídica do sarcolema (Post e Langer, 1992b). O Ca^{2+} está aparentemente associado com os fosfolípidos aniónicos que se encontram exclusivamente na monocamada citoplasmática, onde se deverá localizar a maioria do compartimento rápido (Philipson *et al.*, 1980a; Post e Langer, 1992b).

O efeito dos fosfolípidos aniónicos na concentração e movimento do Ca^{2+} deverá ser mais relevante nos túbulos transversos, onde o sarcolema está em aposição directa com o retículo sarcoplasmático juncional, formando a fenda diádica.

A interacção transitória do Ca^{2+} com a monocamada citoplasmática do sarcolema deverá diminuir a difusão do catião da fenda diádica para o restante citoplasma. Assim, é possível que a concentração de Ca^{2+} na fenda diádica atinja valores superiores a

600 µM durante a sístole, permanecendo acima de 20 µM durante a diástole (Peskoff *et al.*, 1992).

No citoplasma, em geral, a concentração transitória de Ca^{2+} não deverá exceder 1 µM durante o ciclo contractivo (Isenberg *et al.*, 1996; Trafford *et al.*, 1995; Wier *et al.*, 1987).

Os elevados níveis de Ca^{2+} da fenda diádica satisfazem os requisitos fisiológicos dos canais de Ca^{2+}, do sarcolema e do retículo sarcoplasmático, e também dos trocadores Na^{+}/Ca^{2+} que abundam nesta região.

1.3 - Alterações da organização e função do sarcolema induzidas por isquemia e reperfusão

A supressão da perfusão (isquemia) do tecido cardíaco induz a perda da actividade contráctil no miocárdio desprovido de oxigénio. Esta situação patológica está não só associada, intracelularmente, com o esgotamento de energia (ATP) e a acumulação de intermediários metabólicos, mas está também associada com alterações do equilíbrio iónico da célula (como a redistribuição do Ca^{2+}), com o decréscimo do pH (acidose) e com alterações morfológicas da mitocôndria (Post *et al.*, 1985; Post *et al.*, 1988b; Post *et al.*, 1995). A isquemia é também acompanhada por alterações estruturais do sarcolema, que têm origem nestes eventos intracelulares. A disfunção do sarcolema deverá ter também origem nas alterações da interacção, intracelular, com o citosqueleto (Musters *et al.*, 1991) e, extracelular, com o gicocálix (Post *et al.*, 1988b), promovidas pela isquemia.

A simulação da isquemia em cardiomiócitos provoca uma redistribuição topológica da fosfatidiletanolamina e da fosfatidilserina no sarcolema, havendo uma perda de assimetria fosfolipídica. Após 20 minutos de isquemia, cerca de 50% de fosfatidiletanolamina e 30% de fosfatidilserina encontram-se na monocamada externa (Maulik *et al.*, 1998), indicando uma perda total de assimetria da fosfatidiletanolamina e parcial de fosfatidilserina.

A perda de assimetria no sarcolema isquémico é vulgarmente atribuída ao esgotamento de ATP, o qual é essencial para o funcionamento das amino-translocases que mantêm a assimetria fosfolipídica. É possível que a célula disponha de apenas 10% de ATP após 15 minutos de isquemia (Post *et al.*, 1993).

A supressão da perfusão de corações isolados conduz a uma redistribuição lateral das proteínas transmembranares, seguida de agregação após 45 minutos de isquemia global. A agregação das proteínas transmembranares no sarcolema é atribuída a um rearranjo na distribuição lateral dos lípidos e à formação de domínios lipídicos pouco fluídos, de onde são excluídas as proteínas (Post *et al.*, 1985; Post *et al.*, 1988b; Post *et al.*, 1995).

Os domínios lipídicos podem ser induzidos por alguns catiões, em misturas fosfolipídicas contendo fosfolípidos aniónicos, como a fosfatidilserina e o fosfatidilinositol. No sarcolema isquémico, o decréscimo do pH deverá induzir a formação de domínios lipídicos, constituídos maioritariamente por aqueles fosfolípidos aniónicos.

Quando a duração da isquemia é prolongada as células cardíacas eventualmente perdem a sua integridade e morrem (Musters *et al.*, 1991).

O reatamento da perfusão (reperfusão) do tecido cardíaco, após um pequeno período de isquemia, pode resultar na recuperação do miocárdio. Contudo, se o período de isquemia é prolongado a reperfusão provoca danos irreversíveis no miocárdio.

Estudos experimentais indicam que a reperfusão provoca danos adicionais no tecido previamente sujeito a isquemia (Post *et al.*, 1988b). Após reperfusão, ocorre um aumento massivo do Ca^{2+} intracelular e as células cardíacas contraem severamente. A morte celular é, aparentemente, iniciada pela reintrodução de Ca^{2+} no meio extracelular, provocando uma sobrecarga intracelular do catião, nas células outrora privadas da sua presença durante a isquemia (paradoxo do Ca^{2+}).

Ao nível do sarcolema, a reperfusão provoca um agravamento da agregação das proteínas, iniciada durante o período de isquemia pela acidose (Post *et al.*, 1988b). O Ca^{2+} deverá induzir a separação lateral massiva de fases de fosfatidilserina, na bicamada.

A reperfusão precedida de isquemia (Post *et al.*, 1985; Post *et al.*, 1988b) ou a isquemia prolongada (Musters *et al.*, 1991) resultam também na extrusão de lípidos do sarcolema, sob a forma de vesículas multilamelares grandes. A formação destas vesículas, constituídas exclusivamente por lípidos, marca a perda de integridade da bicamada lipídica do sarcolema. A extrusão de lípidos do sarcolema, sob a forma de vesículas multilamelares, é atribuída à tendência intrínseca da fosfatidiletanolamina para formar estruturas não-lamelares. A separação lateral de fases de fosfatidilserina deverá estar na origem da destabilização da bicamada, que antecede a extrusão do lípido.

A preferência da fosfatidiletanolamina por estruturas hexagonais invertidas deve--se à forma cónica da molécula. Nas membranas biológicas esta tendência é suprimida e compensada por outros fosfolípidos, como a fosfatidilcolina e a fosfatidilserina.

Outros processos intracelulares, como a hidrólise e a peroxidação dos fosfolípidos devem também contribuir para a degradação do sarcolema isquémico. No entanto, a sua importância parece estar confinada a longos períodos de isquemia, para os quais já não é possível a recuperação do miocárdio por reperfusão (Post *et al.*, 1995; van der Vusse *et al.*, 1994).

As células cardíacas perdem a sua integridade após 20 a 30 minutos de isquemia (van der Vusse *et al.*, 1994). Em estudos realizados *in vivo*, a recuperação do coração por reperfusão apenas é possível para períodos de isquemia até 30 minutos (Post *et al.*, 1988b). Para um período de tempo superior a integridade do sarcolema é perdida, provocando danos irreversíveis.

Em estudos realizados em miócitos isquémicos, o reatamento da função contráctil foi precedido pela recuperação da assimetria lipídica após reoxigenação (Post *et al.*, 1995). Assim, a recuperação do coração isquémico por reperfusão parece estar intimamente associada com a viabilidade celular, e esta por sua vez, está dependente da integridade do sarcolema. As alterações provocadas pela isquemia no sarcolema parecem ser determinantes para a sobrevivência do tecido cardíaco, sendo em certa medida reversíveis. Contudo, o mecanismo e a sequência de eventos pelos quais ocorre a degradação da estrutura do sarcolema ainda não foram estabelecidos.

1.4 - Modificação estrutural de fosfolípidos pela fosfolipase D

As fosfolipases D são fosfodiesterases que catalisam *in vivo* a hidrólise de vários fosfolípidos, como a fosfatidilcolina, a fosfatidiletanolamina e o fosfatidilinositol, dando origem a ácido fosfatídico e a bases não fosforiladas (Figura 11).

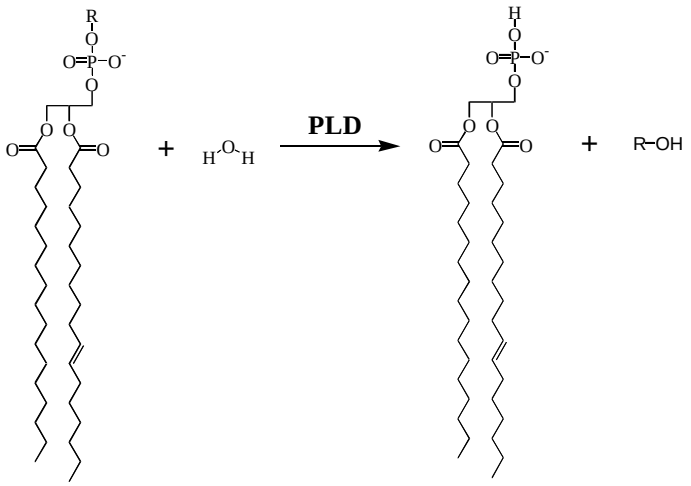


Figura 11 - Hidrólise de fosfolípidos catalizada pela acção enzimática da fosfolipase D (PLD).

A fosfolipase D é activada nas diferentes células por uma grande variedade de estímulos, incluindo hormonas, neurotransmissores, factores de crescimento, citoquininas, antigénios e estímulos físicos, como a radiação. Pensa-se por isso, que esta enzima deve desempenhar uma função importante na transdução de sinais em vários tipos de células (Exton, 1997; Liscovitch, 1996).

Nos mamíferos, plantas e microrganismos a actividade catalítica predominante da fosfolipase D é a hidrólise de fosfatidilcolina, com clivagem da ligação P-O (Holbrook *et al.*, 1991). O ácido fosfatídico, resultante da hidrólise de fosfatidilcolina catalizada pela fosfolipase D, e os seus metabolitos devem estar envolvidos numa grande variedade de processos fisiológicos, como a regulação metabólica, a inflamação, a secreção e a resposta imunitária (Morris *et al.*, 1996). Note-se porém, que o ácido fosfatídico pode resultar também de outras vias metabólicas, como a fosfolipase C e a biossíntese fosfolipídica *de novo* por fosforilação de diacilglicerol (Shukla e Halenda, 1991).

Tendo como base as propriedades da fosfolipase D parcialmente purificada, deverão existir várias isozimas que estarão relacionadas com os diversos mecanismos de activação e regulação da enzima, e com as suas múltiplas funções. A actividade da fosfolipase D foi encontrada em diversas células na membrana citoplasmática, sob a forma de proteínas integrais e periféricas, no citosol e em alguns organitos como o complexo de Golgi e o retículo endoplasmático (Liscovitch, 1996). Algumas isozimas diferem na sua especificidade pelo substrato, hidrolisando fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina com ligações éter (Exton, 1997).

A actividade hidrolítica da fosfolipase D foi primeiro descrita e caracterizada nas plantas. A sua presença tem sido comprovada em folhas, raízes, bolbos e sementes de um grande número de espécies vegetais. É o caso de algumas couves, do nabo, da cenoura, da batata, da ervilha, da semente do algodão e do amendoim.

A enzima pode ser encontrada sob duas formas distintas, dependendo da origem, do estágio de maturação e do método de isolamento: na forma insolúvel, em que a fosfolipase D está associada a organitos intracelulares, nomeadamente a plastídeos, e na forma solúvel.

A fosfolipase D das folhas de couve, do género *Brassica*, apresenta uma maior actividade hidrolítica relativamente às restantes espécies vegetais (Davidson e Long, 1958), pelo que tem constituído o objecto de estudo de eleição.

A preparação da enzima passa habitualmente pela homogeneização do material vegetal com água seguida de centrifugação, da qual se despreza o sedimento. A fracção insolúvel da fosfolipase D, que constitui o sedimento, apresenta uma actividade hidrolítica três vezes inferior à fracção solúvel (Davidson e Long, 1958). O sobrenadante do homogeneizado é então sujeito a choque térmico e a fosfolipase D é precipitada com acetona. A enzima parcialmente purificada é altamente estável a 0 ºC, durante longos períodos de tempo.

A fosfolipase D, *in vitro*, catalisa preferencialmente a hidrólise de espécies moleculares de fosfatidilcolina, hidrolisando também fosfatidiletanolamina e muito lentamente fosfatidilserina, em meio aquoso com pH de cerca de 5,5 (Dawson e Hemington, 1967).

Em todos os estudos realizados, a presença de Ca^{2+} era indispensável para a actividade da enzima. Na ausência deste catião, a capacidade hidrolítica da fosfolipase D era muito pequena ou mesmo inexistente (Dawson e Hemington, 1967). A concentração óptima de Ca^{2+} é aproximadamente proporcional à quantidade de

substrato, para um determinado modelo experimental (Davidson e Long, 1958). Contudo, a concentração óptima de Ca^{2+} pode variar em função, não só, do grau de purificação da enzima (devido aos catiões provenientes do tecido vegetal), mas também em função do substrato e da interface lipídica por ele formada (Dawson e Hemington, 1967). A fosfatidilcolina dispersa na forma monomérica requer uma maior concentração de Ca^{2+} do que os seus agregados lamelares. Os agregados de fosfatidiletanolamina, por sua vez, requerem ainda menos catião.

A reacção catalisada pela fosfolipase D envolve uma enzima hidrossolúvel e um substrato lipossolúvel. Aparentemente a actividade da enzima está largamente dependente das propriedades físico-químicas do substrato lipídico (Dawson e Hemington, 1967). Assim, é provável que solventes orgânicos e substâncias anfipáticas influenciem substancialmente a actividade enzimática da fosfolipase D. É ocaso do éter dietílico e de substâncias anfipáticas aniónicas (como o SDS) na presença de Ca^{2+}, que promovem uma grande estimulação da hidrólise do substrato lipídico. A hidrólise da lisolecitina, a qual é insolúvel em éter e solúvel em água, é inibida na presença de éter dietílico (Davidson e Long, 1958), pelo que o éter deverá aumentar a solubilidade do substrato lipídico no meio de reacção.

O aumento da actividade da fosfolipase D, potenciada pelas substâncias anfipáticas aniónicas, é acompanhado por aumento da quantidade de enzima adsorvida na interface lipídica. Por seu lado, as substâncias anfipáticas catiónicas são, em geral, potentes inibidores da fosfolipase D (Dawson e Hemington, 1967).

Relativamente aos produtos resultantes da hidrólise, o ácido fosfatídico estimula a actividade enzimática, enquanto que o outro produto, as bases, como a colina e a etanolamina, inibem a hidrólise.

Para que a inibição da hidrólise de fosfatidilcolina seja significativa são requeridas concentrações elevadas de colina (Dawson e Hemington, 1967). Outras bases como a etanolamina, o etanol e o glicerol inibem a hidrólise de fosfatidilcolina quando presentes em concentrações relativamente baixas (Yang *et al.*, 1967). Contudo, neste caso, a formação de ácido fosfatídico, por hidrólise catalisada pela fosfolipase D, é acompanhada pela formação simultânea de fosfatidiletanolamina, fosfatidiletanol e fosfatidilglicerol, respectivamente, por transfosfatidilação (Figura 12).

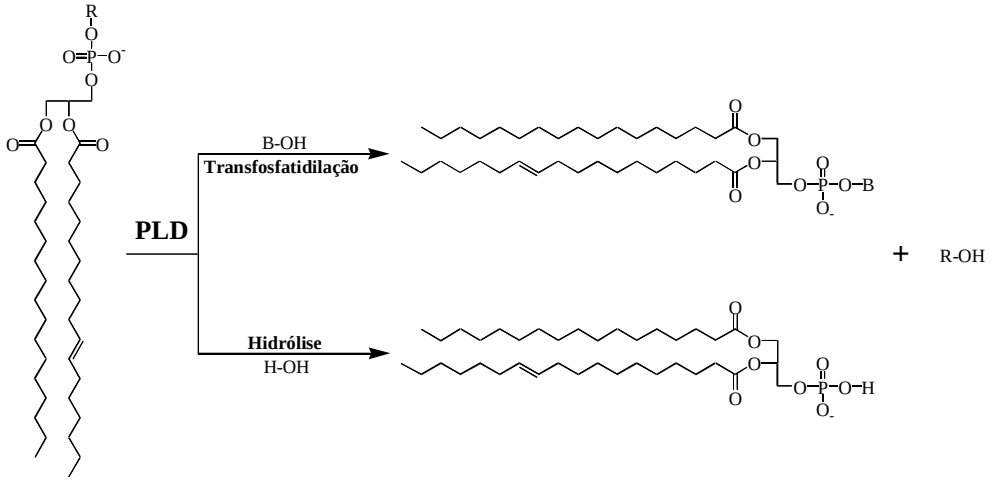


Figura 12 - Modificação de fosfolípidos pela acção enzimática da fosfolipase D (PLD).

Na transfosfatidilação catalisada pela fosfolipase D, o grupo fosfatidil do substrato fosfolipídico é transferido para um aceitador nucleofílico, com a formação do fosfolípido correspondente, e de uma base não-fosforilada contendo um grupo hidroxilo. A transfosfatidilação pode ser considerada como a reacção geral da fosfolipase D, sendo a hidrólise um caso específico, no qual o aceitador é a água.

Apesar de o seu significado biológico ser ainda praticamente desconhecido, a transfosfatidilação atribuída à fosfolipase D é uma característica única e notável entre as fosfolipases. A capacidade de uma enzima hidrolítica catalisar também a formação de novos compostos, pela transferência de um grupo de um composto dador para um aceitador apropriado (actividade de transferase), está normalmente associada a β-glicosidases, proteinases e fosfatases (Morton, 1953).

Aparentemente, as transferases estão também envolvidas nas vias de síntese dos fosfolípidos, como é o caso da cardiolipina sintase e da fosfatidilserina sintase. Curiosamente, estas transferases partilham duas regiões homólogas, nas suas sequências primárias de aminoácidos, com fosfolipases D de mamíferos, plantas e microrganismos (Morris *et al.*, 1996). Estas sequências devem conter resíduos essenciais à função catalítica da transfosfatidilação.

É possível induzir a síntese de fosfatidil-álcoois via fosfolipase D, em vários tipos de células em determinadas condições, nomeadamente por exposição aos álcoois respectivos (Shukla e Halenda, 1991). Contudo, os fosfatidil-álcoois não são normalmente sintetizados nas células, sendo o seu nível basal muito baixo ou inexistente (Liscovitch, 1996). Pensa-se que a transfosfatidilação mediada pela

fosfolipase D, e os fosfatidil-álcoois resultantes, tenham um papel importante apenas em situações patológicas relacionadas com o álcool (Yu *et al.*, 1996).

Tendo em conta que o ácido fosfatídico pode ter origem em várias vias metabólicas, a síntese de fosfatidil-álcoois tem sido exaustivamente usada para demonstrar inequivocamente a activação e presença da actividade da fosfolipase D em tecidos intactos.

A transfosfatidilação catalisada pela fosfolipase D, tem também sido extensivamente usada na síntese enzimática *in vitro* de fosfolípidos pouco abundantes na natureza, a partir de espécies mais comuns. Desde Yang *et al.* (1967), a aplicação da reacção de transfosfatidilação da fosfolipase D na síntese de fosfolípidos naturais e sintéticos, a partir de fosfatidilcolina, tornou-se um procedimento comum. Evita-se, assim, a síntese por reacções químicas e a extracção e isolamento de fosfolípidos na sua forma pura e homogénea, que são normalmente procedimentos demorados, difíceis e dispendiosos.

A economia e eficiência da síntese enzimática de fosfolípidos depende principalmente de uma grande produção do fosfolípido desejado e da minimização da formação de ácido fosfatídico por hidrólise. A formação de ácido fosfatídico pode ocorrer não só por hidrólise do substrato fosfolipídico, se a enzima for pouco selectiva, mas também por hidrólise do produto da transfosfatidilação, dependendo da especificidade da fosfolipase D.

A actividade de transferase ocorre simultaneamente, a par com a actividade hidrolítica. Contudo, um aumento da concentração de aceitador altera ambas as actividades, mas em sentidos opostos, favorecendo a transfosfatidilação que predomina (Comfurius e Zwaal, 1977; Dawson, 1967; Yang *et al.*, 1967). A transfosfatidilação é favorecida, em detrimento da hidrólise, não só pela presença da base aceitadora, mas também pela fase orgânica (habitualmente éter dietílico).

A transfosfatidilação catalizada pela fosfolipase D de origem vegetal está praticamente limitada a álcoois primários simples (com menos de 6 carbonos), como aceitadores nucleofílicos. Quando a L-serina é usada como aceitador, apenas cerca de 45% de fosfatidilcolina é convertida em fosfatidilserina, sendo a restante hidrolisada a ácido fosfatídico (Comfurius e Zwaal, 1977). Contudo, a síntese de fosfatidilserina foi catalisada pela fosfolipase D de algumas estirpes *Streptomyces* com rendimentos entre 60 e 100% (Comfurius *et al.*, 1990; Juneja *et al.*, 1989; Shuto *et al.*, 1987a).

A fosfolipase D dos microrganismos apresenta não só uma maior tolerância relativamente ao substrato e ao aceitador nucleofílico, mas principalmente uma maior selectividade. Embora a enzima de *Streptomyces chromofuscus* tenha uma selectividade praticamente dedicada à hidrólise, a maioria das fosfolipases D de Actinomicetes apresenta uma grande selectividade pela transfosfatidilação (Comfurius *et al.*, 1990; Juneja *et al.*, 1988; Mansfeld e Ulbrich-Hofmann, 2009; Nakajima *et al.*, 1994), como é comprovado pela actividade da enzima proveniente de *Streptomyces species*.

Para além da serina, uma grande variedade de aceitadores tem sido usada na síntese enzimática dos fosfolípidos correspondentes. É o caso da etanolamina (Juneja *et al.*, 1988; Nakajima *et al.*, 1994), nucleosídeos (Shuto *et al.*, 1987b), álcoois primários cíclicos (Testet-Lamant *et al.*, 1992), hidroxilbenzenos (Takami *et al.*, 1994), di-hidroxiacetona (Takami e Suzuki, 1994), álcoois secundários (D'Arrigo *et al.*, 1996) e álcoois N-heterocíclicos (Hirche *et al.*, 1997).

Curiosamente, verificou-se que em alguns casos a transfosfatidilação era maior quando o pH do meio aquoso de reacção era igual ao pK do aceitador nucleofílico presente (Shuto *et al.*, 1987b). Aparentemente, o pH óptimo varia com a origem da fosfolipase D e a natureza da base aceitadora, apresentando habitualmente um valor de cerca de 5,5 ($\pm$1,5).

1.5 – Objectivos

Considerando o papel do sarcolema cardíaco assimétrico na interacção com o Ca^{2+} envolvido no ciclo contractivo e as alterações estruturais e de integridade membranar associadas com a isquemia, o presente projecto procura caracterizar modelos fosfolipídicos representativos do folheto interno do sarcolema cardíaco.

Pretendem-se modelos do sarcolema cardíaco constituídos por misturas preparadas com a espécie mais abundante de cada uma das classes fosfolipídicas representativas do seu folheto interno (16:0/16:0-glicerofosfocolina, 18:0/20:4-glicerofosfoetanolamina e 18:0/20:4-glicerofosfoserina), para estudar o efeito dos catiões, Ca^{2+} e H^{+}.

Assim, o trabalho é iniciado com a síntese de 18:0/20:4-glicerofosfoserina, catalisada pela fosfolipase D de *Streptomyces* sp., e envolve a determinação e optimização do tempo e do sistema de reacção, considerando que estão envolvidos um substrato e produtos lipossolúveis e uma enzima hidrossolúvel.

Para caracterizar as alterações induzidas pelo Ca^{2+} e pelo H^{+} (em condições patológica e fisiologicamente relevantes) nas interacções inter-fosfolipídicas e na distribuição lateral dos fosfolípidos no sarcolema, são estudados os perfis termotrópicos por calorimetria diferencial de varrimento (DSC) e por polarização de fluorescência do DPH.

Os estudos são realizados em misturas ternárias em que as proporções dos fosfolípidos são semelhantes às classes respectivas no folheto interno do sarcolema assimétrico, e também em proporções representativas da fracção fosfolipídica total do sarcolema. Com o estudo da composição fosfolipídica total pretende-se simular as condições de perda de assimetria lipídica do sarcolema.

Com o intuito de determinar a influência de cada um dos aminofosfolípidos nas propriedades da membrana e considerando a complexidade dos sistemas ternários de fosfolípidos, são também estudadas misturas binárias com as espécies de fosfatidilcolina/fosfatidiletanolamina e fosfatidilcolina/fosfatidilserina, mantendo as proporções referidas para as misturas ternárias e substituindo a espécie ausente pela fosfatidilcolina.

Ao estudar e comparar o efeito de concentrações de Ca^{2+} e H^{+} em dispersões fosfolipídicas representativas do sarcolema assimétrico e simétrico, pretende-se também, contribuir para o esclarecimento de algumas questões importantes sobre as

membranas biológicas *in vivo*, e que constituem o cerne da investigação em biomembranas, como por exemplo:

Qual a sequência para os eventos envolvidos na isquemia?

Qual a importância e significado da assimetria lipídica nas membranas?

Qual o sinal que permite à célula manter a assimetria lipídica nas membranas?

Capítulo 2 Material e Métodos

2.1 – Síntese de 18:0/20:4-glicerofosfoserina a partir de fosfatidilcolina por transfosfatidilação catalisada pela fosfolipase D de *Streptomyces* sp.

2.1.1 - Enzimas e reagentes

A fosfolipase D (EC 3.1.4.4) tipo VII de *Streptomyces* sp. e a fosfolipase A_2 (EC 3.1.1.4) de veneno de *Naja naja* foram adquiridas da Sigma Chemical Co. sob a forma de pó liofilizado e a 1-estearoil-2-araquidonil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (18:0/20:4--glicerofosfocolina, SAPC) foi adquirida da Avanti Polar-Lipids Inc. dissolvida em clorofórmio. Os restantes reagentes usados eram de grau analítico e adquiridos comercialmente.

2.1.2 - Reacção enzimática de transfosfatidilação

2.1.2.1 - Sistema de duas fases em agitação

O volume correspondente a 5 µmol de 18:0/20:4-glicerofosfocolina, de uma solução de 20 mg/ml em clorofórmio, foi transferido para um tubo de rosca e fundo redondo, e o solvente foi evaporado sob fluxo de azoto. Clorofórmio puro, recentemente destilado, foi usado para ressolubilizar o lípido, sendo depois novamente evaporado. Este procedimento foi repetido duas vezes a fim de remover eventuais vestígios de álcool. Por último, o lípido foi dissolvido em 0,5 ml de éter dietílico. O éter dietílico foi previamente lavado três vezes, com volumes iguais de água, a fim de remover vestígios de álcoois contaminantes. A solução foi fechada e submetida a ultra-sons durante 45 segundos à temperatura ambiente, num banho de ultra-sons G112SP1T, 8 kc, 600 volt, Laboratory Supplies Co. Hicksville, New York, para rápida dispersão do lípido.

O método descrito por Juneja *et al.* (1989) foi adoptado para síntese de 1-estearoil-2-araquidonil-*sn*-glicero-3-fosfoserina (18:0/20:4-glicerofosfoserina, SAPS) por transfosfatidilação com a fosfolipase D de *Streptomyces* sp. com algumas modificações. À solução de SAPC em éter dietílico foi adicionada uma solução aquosa (pH 5,6) contendo 200 mM de acetato, 54,5 mM de $CaCl_2$ e saturada com L-serina (35% m/v, a 30 ºC); o volume adicionado foi 0,11 ml.

A reacção foi iniciada pela adição de 40 µl de solução aquosa (pH 5,6) contendo 200 mM de acetato e 3 unidades de fosfolipase D de *Streptomyces* sp. (1 unidade de fosfolipase D está definida como a quantidade de enzima que liberta 1,0 mol de colina por hora, a pH 5,6 e a 30 ºC). O tubo foi imediatamente fechado a fim de evitar a evaporação do éter, e incubado durante 2 horas, a 30 ºC sob atmosfera de azoto.

Como reactor foi usado um tubo de vidro fechado (com o diâmetro interno de 1,35 cm e 10 cm de altura) num banho de água, e a mistura das duas fases era efectuada por agitação magnética a 600 rpm, com o auxílio de um magnete (0,46 cm de diâmetro e 1,20 cm de comprimento).

A reacção foi terminada pela adição de 4 ml do solvente de extracção, solução de Folch (clorofórmio/metanol, 2:1, v/v) (Folch *et al.*, 1951).

.

2.1.2.2 - Sistema de micelas invertidas

A reacção enzimática foi também realizada com micelas invertidas de 18:0/20:4--glicerofosfocolina. O procedimento experimental usado é semelhante ao que foi descrito para o sistema de duas fases em agitação, com a excepção de que a incubação do sistema era precedida de agitação por vórtice, durante 30 segundos seguida de ultra-sonicação num banho durante 1 minuto, para se formarem as micelas com a solução aquosa no interior.

2.1.3 - Extracção da fracção lipídica resultante da acção enzimática

Com a finalidade de proceder à extracção do lípido total resultante da acção da enzima, a mistura monofásica foi submetida a vórtice durante 10 minutos. Adicionou-se em seguida 1,2 ml de água, e a mistura bifásica resultante foi centrifugada a 3000 rpm durante 10 minutos, numa centrífuga de bancada. A fase inferior de clorofórmio foi recolhida e misturada com igual volume de etanol absoluto. O solvente foi evaporado até à secura, sob vácuo, num evaporador rotatório a 30 ºC. No final, o resíduo lipídico foi dissolvido em 1 ml de clorofórmio e acondicionado sob atmosfera de azoto.

2.1.4 - Purificação da 18:0/20:4-glicerofosfoserina

A fim de separar e purificar a 18:0/20:4-glicerofosfoserina sintetizada, a solução lipídica foi sujeita a cromatografia preparativa de camada fina (TLCp) unidimensional, em cromatoplacas de silicagel 60 (E. Merck), segundo um método adaptado de Leray *et al*. (1987).

As cromatoplacas eram previamente vaporizadas com ácido bórico 2,3% em etanol absoluto e activadas durante 30 minutos a 110 ºC. A solução lipídica foi aplicada numa das extremidades da cromatoplaca, sob a forma de uma banda longitudinal ou sob a forma de várias aplicações adjacentes. Durante esta operação, a placa era sujeita a um fluxo laminar e suave de azoto.

A placa foi então colocada num tanque de cromatografia fechado, previamente saturado com clorofórmio:etanol:trietilamina:água (30:35:35:6, v/v/v/v), durante aproximadamente 90 minutos à temperatura ambiente, para revelação.

Depois de secar a placa sob um fluxo de azoto, seguida de 4 horas sob alto vácuo, a detecção das fracções fosfolipídicas foi feita por pulverização da cromatoplaca com água.

Após identificação e atribuição das bandas a cada uma das classes fosfolipídicas, por comparação com as mobilidades relativas de padrões apropriados, a banda atribuída à 18:0/20:4-glicerofosfoserina foi raspada da placa e colocada num tubo fechado.

O fosfolípido foi então extraído pelo método de Bligh e Dyer (1959), tendo-se considerado 3 ml como 1 volume de solvente. Assim, adicionou-se 1 volume de clorofórmio e 2 volumes de metanol, que sob agitação em vórtice formou uma só fase. O tubo foi agitado frequentemente, durante 10 minutos. A mistura monofásica foi então filtrada por sucção para um tubo de centrífuga esmerilado. Adicionou-se 1 volume de clorofórmio e 1 volume de água, seguida de nova agitação em vórtice. A separação das fases foi finalizada pela centrifugação a 1500 rpm, durante 5 minutos numa centrífuga de bancada. A fase orgânica inferior foi recolhida num balão e a fase aquosa foi sujeita a nova extracção com 1 volume de clorofórmio. As fases inferiores de clorofórmio foram recolhidas no mesmo balão e misturadas com igual volume de etanol absoluto. O solvente foi evaporado até à secura, sob vácuo, num evaporador rotatório e no final foi obtida uma solução de 18:0/20:4-glicerofosfoserina com o volume de 1 ml de clorofórmio.

A fim de determinar a concentração de 18:0/20:4-glicerofosfoserina em solução, o resíduo lipídico correspondente a 15 µl da solução de 18:0/20:4-glicerofosfoserina foi digerido por refluxo em 0,5 ml de ácido perclórico 70 %, a 180 ºC, para posterior medição do fosfato inorgânico pelo método de Bartlett (1959), conforme será descrito posteriormente com mais detalhe.

2.1.5 - Análise da 18:0/20:4-glicerofosfoserina sintetizada

2.1.5.1 - Quantificação das classes fosfolipídicas resultantes da acção enzimática

Um pequeno volume da solução lipídica, obtida por extracção da fracção lipídica resultante da acção da enzima, foi submetida a cromatografia analítica de camada fina (TLCa) unidimensional, a fim de separar e quantificar as classes fosfolipídicas.

A TLCa foi realizada conforme o método descrito por Leray *et al*. (1987), em placas LK5 da Whatman. A placa foi previamente lavada em clorofórmio:metanol (1:1, v/v) e após vaporização com ácido bórico 2,3% em etanol absoluto, foi activada durante 15 minutos a 110 ºC. A amostra foi aplicada na zona pré-adsorvente, em aplicações de 30 µl cada. A placa foi então colocada num tanque fechado de cromatografia, previamente saturado com clorofórmio:etanol:trietilamina:água (30:35:35:6, v/v/v/v), durante aproxidamente 90 minutos.

Após secar completamente a placa durante 4 horas em alto vácuo, as fracções lipídicas foram detectadas por pulverização com reagente de molibdato. Os aminofosfolípidos foram previamente detectados por pulverização com reagente de ninhidrina.

A fim de proceder à análise quantitativa de cada uma das classes fosfolipídicas componentes, as bandas depois de identificadas foram raspadas para tubos de ensaio e directamente digeridas por refluxo em 0,5 ml de ácido perclórico 70%, a 180 ºC, para posterior medição do fosfato inorgânico pelo método de Bartlett (1959). Brevemente, após o arrefecimento dos tubos com fosfato inorgânico, resultante da digestão, adicionaram-se 7,5 ml de reagente de molibdato e 0,3 ml de reagente redutor de Fiske e

Subbarow (1925), seguida em ambos os casos de agitação em vórtice. Os tubos foram deixados num banho de água em ebulição durante pelo menos 15 minutos.

Foi também preparada, em simultâneo, uma curva padrão a partir do mesmo procedimento experimental descrito, mas aplicado a 0, 25, 50, 100 e 200 µl de uma solução padrão de fosfato, KH_2PO_4 1 mM. Depois de os tubos terem arrefecido, a absorvância das soluções foi lida num espectrofotómetro Baush & Lomb Spectronic 21, a 830 nm.

2.1.5.2 - Análise dos ácidos gordos

2.1.5.2.1 - Hidrólise da ligação *sn*-2 pela fosfolipase A2

A fosfolipase A_2 de veneno de *Naja naja* foi usada na verificação da distribuição dos ácidos gordos nas posições *sn*-1 e *sn*-2 do glicerol, uma vez que a fosfolipase A_2 hidrolisa a ligação éster na posição *sn*-2 dos fosfoglicerídeos, originando lisofosfo-glicerídeos e ácidos gordos livres.

O método descrito por Verkleij *et al.* (1973) foi adoptado com algumas modificações. A 18:0/20:4-glicerofosfoserina purificada foi adicionada a 0,5 ml de clorofórmio e 2 ml de éter dietílico num balão esmerilado de fundo redondo de 25 ml. 22 µg de fosfolipase A_2 em 0,50 ml de tampão (pH 7,4) Tris 10 mM, contendo $CaCl_2$ 10 mM, foi introduzido no balão e a mistura foi sujeita a agitação em vórtice durante 30 segundos e a ultra-sons num banho durante 1 minuto, para formação de micelas invertidas com solução aquosa incorporada. O balão fechado foi incubado durante 1 hora, a 37 ºC, sob atmosfera de azoto e sob agitação magnética contínua.

A reacção foi terminada e a fracção lipídica foi extraída, conforme foi descrito para a reacção de transfosfatidilação da fosfolipase D.

A solução de ácidos gordos livres e lisofosfatidilserina foi submetida a TLCp unidimensional, pelo método já descrito, a fim de se separarem e purificarem esses constituintes. No final, a detecção das bandas foi feita por pulverização das cromatoplacas com água.

Após identificação das duas fracções lipídicas, cada uma das bandas foi raspada e recolhida num tubo de transesterificação e directamente usada para transmetilação dos ácidos gordos.

2.1.5.2.2 - Transmetilação dos ácidos gordos

As duas amostras lipídicas foram submetidas a hidrólise e metilação dos ácidos gordos, pela adição de 5 ml de solução de metilação de ácido sulfúrico 5% em metanol, de acordo com o método de Lipsky e Landowne (1963). A solução foi borbulhada com azoto para remover o oxigénio dissolvido, e deixada a incubar durante 2 horas num banho de água a 70 ºC.

Os metilésteres de ácidos gordos foram extraídos pela adição de 5 ml de água e 10 ml de hexano, seguida de centrifugação, durante 2 minutos a 1000 rpm, numa centrífuga de bancada. A fase superior, de hexano, foi recolhida num Erlenmeyer fechado. A solução resultante foi exposta a sulfato de sódio, durante 30 minutos, para remover eventuais vestígios de água, e depois filtrada para balões periformes.

O solvente foi evaporado até à secura, sob vácuo, num evaporador rotatório a 37 ºC e os metilésteres de ácidos gordos foram redissolvidos em 200 µl de dissulfeto de carbono (CS_2) e acondicionados em atmosfera de azoto.

Durante todo o procedimento descrito, as amostras foram conservadas em atmosfera de azoto de maneira a evitar a peroxidação lipídica.

A cromatografia gás-líquido (GLC) foi efectuada num cromatógrafo gasoso Varian Moduline-Series 2700 equipado com uma coluna SGE BPX 70, de dimensões 25m x 0,53 mm, e usando um programa de temperatura (140 ºC, 5 minutos; 4 ºC/minuto até 190 ºC, 20 minutos). O gás transportador foi o azoto, a um fluxo de 3 ml/min. O injector foi mantido a 210 ºC e o detector a 245 ºC.

Os picos foram identificados por comparação dos tempos de retenção relativos de padrões apropriados.

2.2 - Caracterização das propriedades físicas dos modelos fosfolipídicos representativos do sarcolema cardíaco

2.2.1 - Fosfolípidos

A 1,2-dipaltoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (16:0/16:0-glicerofosfocolina, DPPC), a 1,2-dipaltoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina (16:0/16:0-glicerofosfoetanolamina, DPPE), a 1,2-dipaltoil-*sn*-glicero-3-fosfoserina (16:0/16:0-glicerofosfoserina, DPPS) e a 1-estearoil-2-araquidonil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina (18:0/20:4glicerofosfoetanol--amina, SAPE) foram adquiridas da Avanti Polar-Lipids Inc.

A 18:0/20:4-glicerofosfoserina foi sintetizada a partir da fosfatidilcolina correspondente por transfosfatidilação catalisada pela fosfolipase D de *Streptomyces* sp., conforme foi descrito anteriormente.

2.2.2 – Hidratação das misturas fosfolípidicas representativas do sarcolema cardíaco

A composição da solução tampão de hidratação dos fosfolípidos foi criteriosamente escolhida, tendo em atenção que se pretendia realizar os estudos para valores de pH fisiológica e patologicamente relevantes, entre 5,5 e 7,4. Considerando que a capacidade tampão de uma substância é efectiva para $pH = pK_a \pm 1$ (em que $pK_a = -\log K_a$ e K_a é a constante de dissociação protónica), o lípido foi disperso numa solução aquosa de Hepes ($pK_a = 7{,}55$) e Mes ($pK_a = 6{,}15$). A curva de titulação, teórica, de 10 ml de uma solução Hepes 5 mM e Mes 5 mM com NaOH 5 mM está representada na Figura 13.

A concentração de Hepes e Mes deve ser suficiente para tamponizar as dispersões lipídicas e anular o efeito dos fosfolípidos aniónicos, sem no entanto interferir colateralmente com o sistema, produzindo artefactos.

As dispersões lipídicas, na forma de lipossomas multilamelares, foram preparadas por hidratação e dispersão do material lipídico por vórtice frequente. A agitação mecânica permitia a remoção de todo o material lipídico das paredes do balão e a formação espontânea de lipossomas multilamelares. Este método, embora mais moroso,

evita a formação de lipossomas com características ambíguas, como aqueles resultantes da dispersão auxiliada por esferas de vidro, cuja permeabilidade está aparentemente muito aumentada (Schwartz e McConnell, 1978).

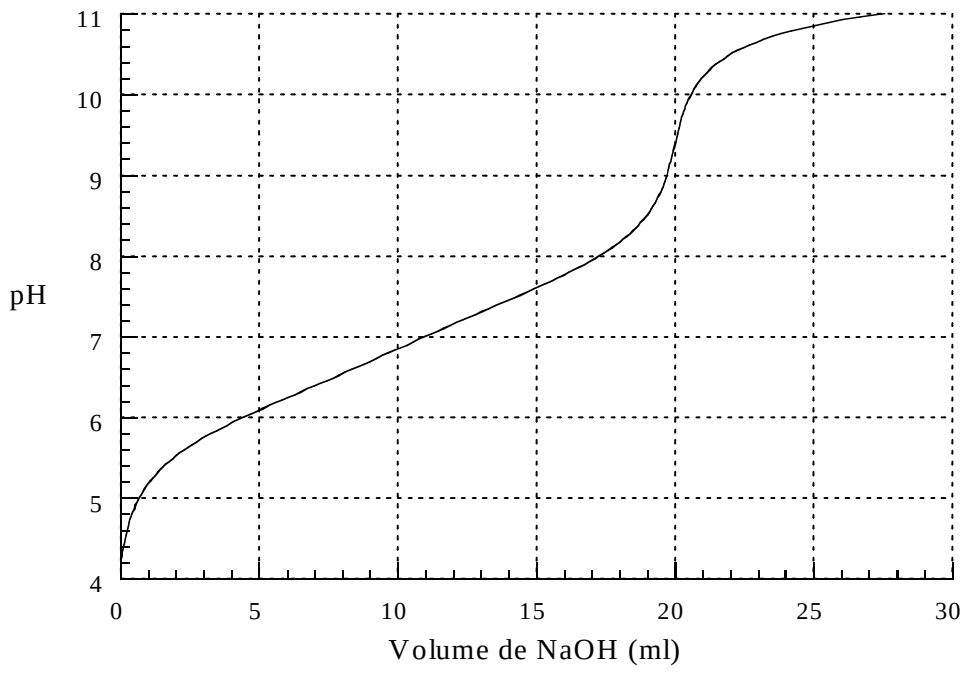


Figura 13 - Curva de titulação, teórica, de 10 ml de uma solução Hepes 5 mM e Mes 5 mM com NaOH 5 mM. (Simulação informática realizada com a aplicação Acid/Base Calculator, versão 1.14, de Aosheng Wang).

2.2.3 - Calorimetria diferencial de varrimento (DSC)

2.2.3.1 – Preparação e análise das dispersões lipídicas

O método descrito por Videira *et al.* (1999) com algumas modificações, foi adoptado para a preparação das dispersões lipídicas Um total de 2 µmol de material lipídico, nas proporções desejadas, foi dissolvido em 3 ml de clorofórmio num balão de fundo redondo de 25 ml e de seguida o solvente foi evaporado até à secura, sob vácuo, num evaporador rotatório à temperatura ambiente. A película lipídica uniforme que se formou nas paredes internas do balão foi sujeita a alto vácuo durante pelo menos duas horas, para evaporação completa dos resíduos de solvente.

A película lipídica foi então hidratada pela adição de 1,5 ml de tampão Hepes 5 mM, Mes 5 mM, KCl 140 mM e NaOH 30 mM. As misturas fosfolipídicas foram hidratadas com concentrações de H^+ e Ca^{2+} fisiológica e patologicamente relevantes. Assim, as misturas fosfolipídicas foram estudadas para vários valores de pH: 7,4; 6,5 e 5,5. E para cada um destes valores em diferentes concentrações de Ca^{2+}: 0, 20, 600 e 1200 µM.

Os lípidos foram dispersos por vórtice frequente durante pelo menos 30 minutos, a 50 ºC. As dispersões lipídicas foram colectadas por centrifugação a 80.000 rpm durante 20 minutos, a 20 ºC, numa centrífuga Beckman TL-100. O sedimento hidratado foi transferido com um pipetador automático, Gilson de 10 µl, para uma panela de alumínio de 40 µl para análise por calorimetria diferencial de varrimento.

As medições foram efectuadas com um calorímetro Pyris 1-DSC (Perkin-Elmer Corp.), acoplado a um computador com o sistema operativo MS Windows. A manipulação da temperatura e a sua programação foram realizadas tendo como interface a aplicação modular Pyris versão 1, fornecida com o instrumento.

A temperatura foi programada para se manter durante 10 minutos a 10 ºC e depois subir até 60 ºC, com a velocidade de varrimento de 10 ºC/minuto. O gás de purga usado foi o azoto. Uma panela vazia foi habitualmente usada como referência. Vários varrimentos eram efectuados, normalmente três, até se obter reprodutibilidade absoluta das curvas de aquecimento.

O aparelho foi previamente calibrado, com os mesmos parâmetros usados no varrimento das amostras lipídicas, tendo-se usado como materiais de referência o Indium (156,60 ºC; 28,45 J/g), Zinco (419,47 ºC; 108,37 J/g) e água ultra-pura (0,00 ºC; 333,88 J/g).

2.2.3.2 – Determinações e princípios calorimétricos

O objectivo da calorimetria é a medição de trocas de calor existentes. Os fluxos de calor provocam alterações locais da temperatura, as quais servem como medida do calor trocado.

As reacções químicas e as transições físicas envolvem normalmente trocas de energia sob a forma de calor.

Presumindo que um sistema de interesse pode existir em dois estados distintos, *A* e *B*, numa gama finita de temperaturas e que a transição do estado *A* para o estado *B* é endotérmica, ou seja ocorre com absorção de calor, então o estado *B* apresenta uma maior entalpia e a variação de entalpia da transição é positiva (Figura 14-A).

O declive para qualquer temperatura (*T*), do gráfico da entalpia (*H*) em função da temperatura, Figura 14-A, a pressão constante é designado por capacidade calorífica, C_p, e é defenido formalmente por:

$$C_p = dH/dT \quad \text{, a pressão constante} \qquad (4)$$

Esta função (Figura 14-B) é obtida por derivação da curva do gráfico da entalpia em função da temperatura (Figura 14-A). De maneira simplista, podemos afirmar que esta função é directamente obtida por calorimetria.

Da expressão (4) temos,

$$dH = C_p dT \qquad (5)$$

como $dH = dq_p$, temos,

$$dq_p = C_p dT \qquad (6)$$

Desta expressão é possível determinar a capacidade calorífica, C_p, para uma variação da temperatura infinitesimal , medindo a quantidade de calor transferida a pressão constante, q_p.

Teoricamente, a capacidade calorífica é definida como a quantidade de calor necessária para elevar de um grau a temperatura da amostra. Uma grande capacidade calorífica implica que para uma dada quantidade de calor, irá haver apenas um pequeno aumento de temperatura, pois a amostra tem uma grande capacidade por calor.

Na transição de fases a temperatura do sistema não aumenta, apesar do calor estar a ser transferido, pois a energia é usada na transição de fases endotérmica e não para aumentar a temperatura do sistema. Nestas circunstâncias, para a temperatura da transição de fases a capacidade calorífica da amostra é infinita.

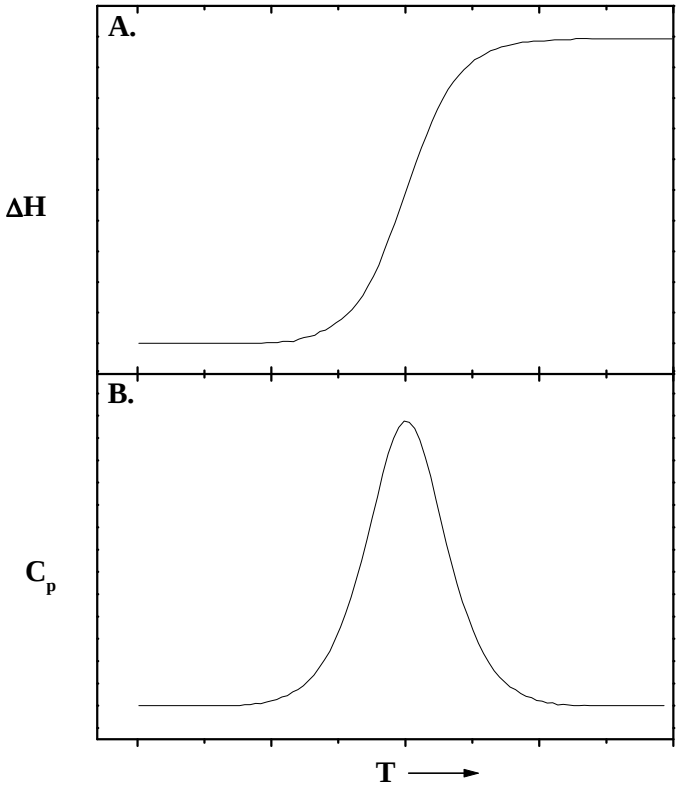


Figura 14 - Representação gráfica do termograma de uma transição endotérmica entre dois estados. **A.** Variação da entalpia e **B.** capacidade calorífica em função da temperatura.

O calorímetro Pyris 1 DSC (Perkin-Elmer Corp.) pertence a uma classe designada por calorímetros de compensação de fluxo. O calor é (quase todo) compensado por energia eléctrica.

Na calorimetria diferencial de varrimento por compensação de fluxo, a amostra e a referência estão confinadas a dois fornos separados e termicamente independentes ou desacoplados (Figura 15). Cada forno contém o seu próprio sensor de temperatura (resistência de platina) a fim de medir linearmente a temperatura. Cada forno contém, ainda, uma resistência de aquecimento (de fio de platina). Ambos os fornos estão inseridos num bloco de alumínio, a temperatura constante.

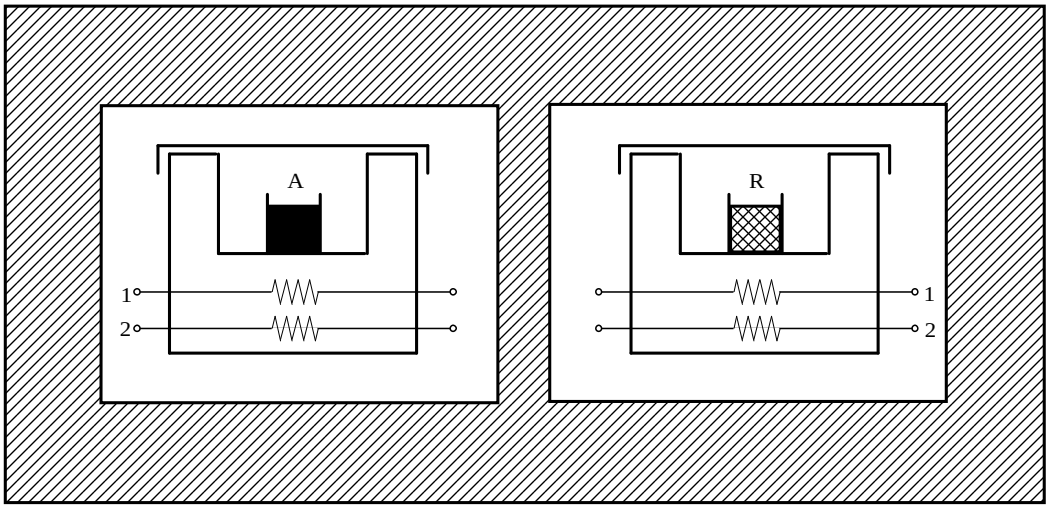


Figura 15 - Representação esquemática do sistema de medição usado na calorimetria diferencial de varrimento por compensação de fluxo. Os sensores de temperatura (1) e as resistências de aquecimento (2) são termicamente independentes para a amostra (A) e a referência (R).

Quando o sistema é submetido a aquecimento, durante um programa específico de temperatura, a mesma energia, na forma de calor, é fornecida a ambos os fornos via um circuito de controlo (Figura 16), de maneira a alterar a sua temperatura média, de acordo com a velocidade de varrimento do programa.

O circuito de controlo está dividido em duas partes (Scheidler e Steim, 1975): o semi-circuito de controlo da temperatura média e o semi-circuito de controlo diferencial da temperatura.

No semi-circuito de controlo da temperatura média, o programador da temperatura envia um sinal proporcional à temperatura média, da amostra e da referência, desejada. Este sinal é comparado com a média dos sinais recebidos dos sensores de temperatura, da amostra e da referência, no controlador da temperatura média. Quando a temperatura programada é maior do que a temperatura média, da amostra e da referência, mais energia de aquecimento (fluxo de calor) é fornecida a ambos os fornos. Se, pelo contrário, a temperatura programada é menor que a temperatura média dos dois fornos, menos energia é enviada pelas resistências de aquecimento.

No semi-circuito de controlo diferencial da temperatura, os sinais dos sensores de temperatura da amostra e da referência são comparados. O controlador vai fornecer mais energia ao forno com menor temperatura detectada.

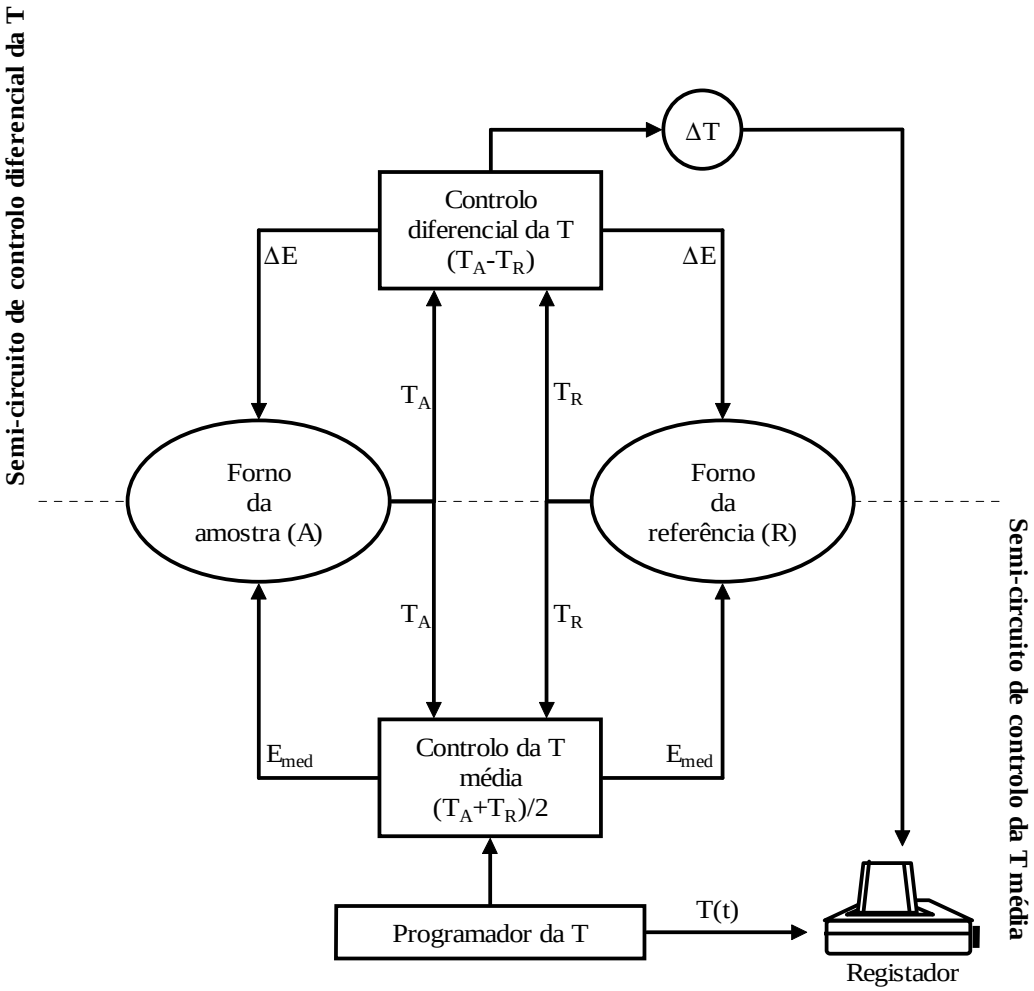


Figura 16 - Representação esquemática do princípio de funcionamento de um calorímetro de compensação de fluxo.
T_A: temperatura da amostra, T_R: temperatura da referência, $\Delta T=T_A-T_R$, E_{med}: energia média de aquecimento, ΔE: energia de aquecimento de compensação (Adaptado com alterações de Höhne *et al.*(1996)).

Como a temperatura média e a temperatura diferencial são medidas constantemente, a temperatura da amostra e da referência mantêm-se iguais entre si e relativamente à temperatura programada. O gás de purga, normalmente azoto, desempenha aqui um papel importante, pois o seu fluxo constante favorece a condutividade térmica.

Na ausência de transições físicas o registo calorimétrico é constante e a linha de base contínua. A energia necessária para aumentar a temperatura programada da amostra e da referência é semelhante, e a diferença entre a energia aplicada na amostra e a energia aplicada na referência é pequena e constante.

Durante uma transição endotérmica de fases da amostra, é preciso fornecer energia suplementar à amostra (compensação de fluxo) para que a sua temperatura iguale a temperatura da referência e acompanhe a velocidade do varrimento programada. A diferença entre a energia aplicada na amostra e na referência aumenta, traduzindo-se numa deflexão do registo calorimétrico. Esta diferença de energia corresponde ao fluxo de calor usado na transição de fases da amostra, e que tem pouca influência sobre a sua temperatura.

A área sob o pico obtido (ou o integral do registo calorimétrico) é proporcional ao calor de transição (ou entalpia de transição), consumido pela amostra durante a transição (Höhne *et al.*, 1996; Scheidler e Steim, 1975).

O calor absoluto da transição é determinado pelo uso de uma constante de calibração. A constante de calibração, K_Q, é o factor de proporcionalidade entre o calor medido (área do pico), Q_m, e o calor realmente transformado, Q_r:

$$Q_r = K_Q \times Q_m \qquad (7)$$

A fim de obter as constantes de calibração, um calorímetro é normalmente calibrado em relação ao calor de transição e também à temperatura, medindo os valores correspondentes de materiais de referência com temperatura e energia de transição conhecidas com exactidão.

Em condições ideais de compensação de fluxo, a diferença de temperatura entre a amostra e a referência seriam imediatamente compensadas por uma alteração de energia correspondente. O fluxo compensado corresponderia exactamente à energia de transição e o factor de calibração seria a unidade.

Contudo, em condições reais a diferença de temperatura não é totalmente compensada, havendo também trocas de energia com o meio circundante. Além disso, as trocas de energia com o meio diferem com a temperatura, sendo então diferentes para a amostra e para a referência, ainda que essas diferenças sejam minimizadas pela tentativa de compensação (Höhne *et al.*, 1996).

A natureza da amostra e a sua massa podem também dar origem a gradientes de temperatura.

Assim, a forma de um sinal isotérmico (pico) depende de factores experimentais e das propriedades da amostra (Courchinoux *et al.*, 1988; Höhne *et al.*, 1996), como é o caso da:

- velocidade de varrimento (Figura 17)
- massa da amostra
- capacidade calorífica da amostra
- condutividade térmica da amostra

Um sinal isotérmico pode ser caracterizado por diversos parâmetros (Figura 18), contudo apenas a temperatura de intercepção do declive ascendente com a linha de base, T_o, é independente dos factores experimentais (como a velocidade de varrimento, Figura 17) e característico de uma substância. Depois de calibração adequada T_o é igual à temperatura da transição (Höhne *et al.*, 1996).

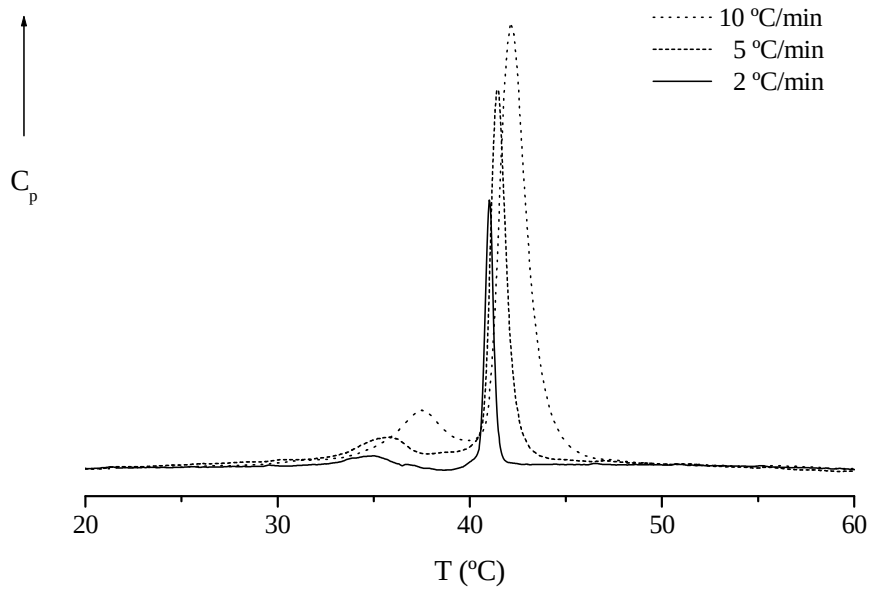


Figura 17- Representação gráfica da dependência da forma do sinal (pico), das transições endotérmicas de DPPC, em função da velocidade de varrimento.

Para uma determinada velocidade de varrimento, o sinal isotérmico pode também ser definido pela área do pico. No entanto, se aumentarmos a velocidade de varrimento aumenta também a área do pico.

Os restantes parâmetros além de variarem com as propriedades da amostra, variam também com os factores experimentais e por isso não são adequados para defenir uma transição.

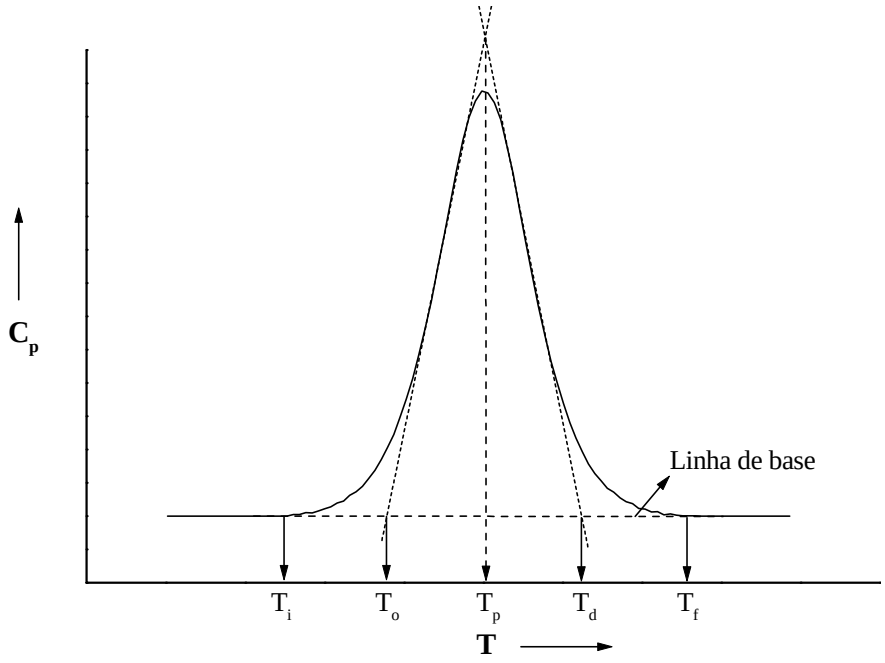


Figura 18 - Caracterização de um sinal calorimétrico de uma transição endotérmica.
T_i: temperatura inicial do pico, T_o: temperatura ascendente extrapolada, T_p: temperatura no máximo do pico, T_d: temperatura descendente extrapolada, T_f: temperatura final do pico.

2.2.4 - Espectrofluorimetria por polarização de fluorescência do 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH)

2.2.4.1 - Preparação das dispersões lipídicas

Os métodos descritos por Videira *et al.* (1996) com algumas modificações, foram adoptados para a preparação das dispersões lipídicas e para a incorporação da sonda fluorescente.

Um total de 0,805 µmol de material lipídico, nas proporções desejadas, foi dissolvido em 3 ml de clorofórmio num balão de fundo redondo de 25 ml e de seguida o solvente foi evaporado até à secura, sob vácuo, num evaporador rotatório à temperatura ambiente. A película lipídica uniforme, que se formou nas paredes internas do balão, foi sujeita a alto vácuo durante pelo menos 2 horas, para evaporação completa dos resíduos de solvente.

A película lipídica foi então hidratada pela adição de 2,5 ml de tampão Hepes 5 mM, Mes 5 mM, KCl 140 mM e NaOH 30 mM (pH 7,4). O tampão de hidratação

variava na sua concentração de Ca^{2+}, tendo sido estudados valores fisiológica e patologicamente relevantes: 0, 20, 600 e 1200 µM.

Os lípidos foram dispersos por vórtice frequente, durante pelo menos 30 minutos, a 50 ºC. A concentração final de lípido total era de 0,32 mM.

2.2.4.2 - Incorporação da sonda fluorescente

As dispersões lipídicas formadas foram transferidas para tubos fechados.

Adicionou-se então a sonda 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH), 1,25 µl de uma solução de DPH 2 mM em tetra-hidrofurano, por injecção de pequenas aliquotas sob vórtice constante. A concentração final de sonda era de 1 µM.

Os tubos ficaram em repouso durante a noite, ao abrigo da luz, a 50 ºC.

As medições dos espectros de fluorescência foram efectuadas num espectrofluorímetro Perkin-Elmer MF-66 equipado com um bloco de células termostatizado e computador, para controlo e aquisição de dados.

A polarização de fluorescência do DPH nas amostras foi obtida nos comprimentos de onda de excitação de 360 nm e de emissão de 430 nm, com as fendas de excitação e de emissão a 5 nm.

2.2.4.3 – Determinações e princípios espectrofluorimétricos

O 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH) é uma molécula hidrofóbica e a sua fluorescência é atribuída à sua conformação all-*trans* (Shinitzky e Barenholz, 1978). Devido à sua baixa solubilidade e à supressão da emissão em meio aquoso, a emissão da fluorescência detectada é atribuída ao DPH partilhado na região das cadeias hidrocarbonadas da bicamama lipídica (Lakowicz, 2006).

O DPH é uma sonda linear que só absorve luz polarizada segundo o seu eixo maior. O momento dipolar de emissão é também colinear com este eixo (Lentz, 1993). Assim, a sonda ao ser excitada por luz monocromática polarizada na direcção do seu eixo maior, pode sofrer uma reorientação da sua posição (e respectivo eixo maior)

durante o período de duração do estado excitado, cerca de 10 ns (Lakowicz, 2006), de acordo com a viscosidade do meio circundante. A luz depois emitida deixará então de estar polarizada paralelamente à luz de excitação, dando-se assim a despolarização de fluorescência.

O valor absoluto de polarização de fluorescência do DPH é medido em termos do grau de polarização, *P*, definido por (Shinitzky e Barenholz, 1978):

$$P = \frac{(I_{=})_{\mathrm{v}} - G \times (I_{+})_{\mathrm{v}}}{(I_{=})_{\mathrm{v}} + G \times (I_{+})_{\mathrm{v}}} \qquad (8)$$

onde $(I_{=})_{\mathrm{v}}$ e $(I_{+})_{\mathrm{v}}$ são as intensidades da fluorescência emitida paralela e perpendicularmente à direcção de polarização da luz de excitação, a qual por sua vez, está polarizada verticalmente, em paralelo com o momento dipolar da sonda; *G* é o factor de correcção para a despolarização causada por artefactos instrumentais, definido por:

$$G = \frac{(I_{+})_{h}}{(I_{=})_{h}} \qquad (9)$$

onde $(I_{=})_{h}$ e $(I_{+})_{h}$ são as intensidades da fluorescência emitida paralela e perpendicularmente à direcção de polarização da luz de excitação, a qual está polarizada numa direcção perpendicular (horizontal) ao momento dipolar de excitação da sonda. O factor G varia com o espectrofluorímetro e com o comprimento de onda utilizados (Litman e Barenholz, 1982).

Quando um fluoróforo está rigidamente fixo, como é o caso de uma solução congelada, é possível descrever P em função de um ângulo, α, entre os dipolos de excitação e emissão (Shinitzky e Barenholz, 1978):

$$P = \frac{3\cos^2\alpha - 1}{\cos^2\alpha + 3} \qquad (10)$$

o que permite determinar os limites da polarização de fluorescência:

$$-0{,}33 < P < 0{,}50$$

Em sistemas membranares os valores da polarização de fluorescência, *P*, expressam a mobilidade rotacional do fluoróforo durante o estado excitado, a qual

reflecte as flutuações na orientação das cadeias hidrocarbonadas dos fosfolípidos circundantes, proporcionando uma medida para a fluidez membranar. Assim, um aumento da fluidez membranar permite maior mobilidade rotacional do DPH, resultando numa diminuição da polarização de fluorescência.

O DPH partilha igualmente entre os estados cristalinos e fluidos de uma membrana (Lentz *et al.*, 1976a) e em misturas partilha igualmente pelos diferentes domínios (Shinitzky e Barenholz, 1978), pelo que os resultados obtidos para *P* traduzem a fluidez total do sistema.

Capítulo 3 Resultados e Discussão

3.1 – Síntese de 18:0/20:4-glicerofosfoserina a partir de fosfatidilcolina por transfosfatidilação catalisada pela fosfolipase D de *Streptomyces* sp.

A síntese enzimática de 18:0/20:4-glicerofosfoserina a partir de 18:0/20:4--glicerofosfocolina (disponível comercialmente) pela fosfolipase D envolve uma enzima hidrossolúvel e um substrato lipossolúvel. Por isso, a reacção foi realizada num sistema heterogéneo com duas fases, uma fase orgânica composta por éter dietílico na qual o lípido está solúvel e uma fase aquosa saturada com L-serina contendo a enzima. A reacção ocorreu à temperatura de 30 ºC, facilitando a interacção entre a enzima e os substratos por agitação magnética. Após duas horas de incubação num tubo fechado, o qual foi usado como reactor, a reacção foi terminada pela precipitação da fosfolipase D com a adição de 4 ml de solução de Folch.

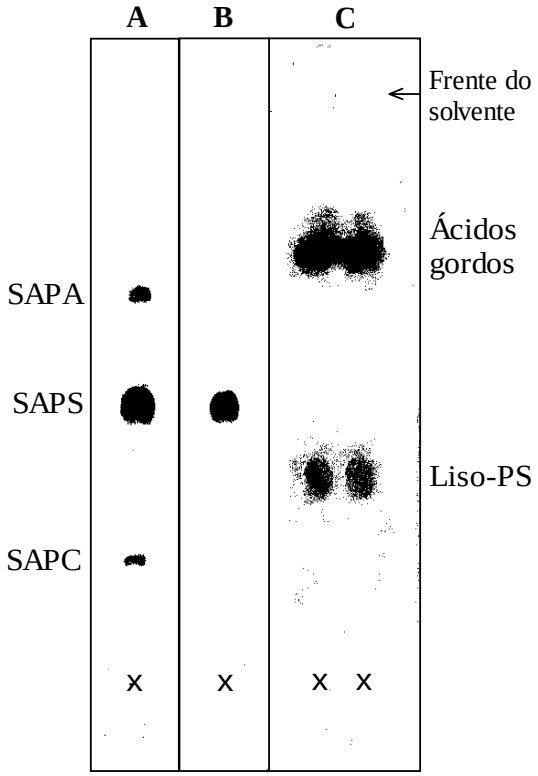


Figura 19 - Cromatogramas de camada fina (TLC) unidimensional dos constituintes lipídicos resultantes da transfosfatidilação da 18:0/20:4-glicerofosfocolina, catalisada pela fosfolipase D, ao longo das diversas etapas de purificação e análise da 18:0/20:4-glicerofosfoserina resultante: **A.** Separação da fracção lipídica total, resultante da acção enzimática, detectada com reagente de molibdato; **B.** 18:0/20:4-glicerofosfoserina purificada e detectada com reagente de ninhidrina e reagente de molibdato; **C.** Separação dos produtos da hidrólise de 18:0/20:4-glicerofosfoserina pela fosfolipase A2, visualizados por pulverização da cromatoplaca com água.
SAPA, ácido 18:0/20:4-glicerofosfórico; SAPS, 18:0/20:4-glicerofosfoserina; SAPC, 18:0/20:4--glicerofosfocolina; Liso-PS: liso-glicerofosfoserina.

A separação da fracção lipídica resultante da acção enzimática obtida por cromatografia de camada fina está representada na Figura 19-A. Os resultados da figura mostram que a fracção lípidica é constituída por 18:0/20:4-glicerofosfoserina (proveniente da transfosfatidilação), por ácido 18:0/20:4-glicerofosfórico (ácido fosfatídico proveniente da hidrólise) e por 18:0/20:4-glicerofosfocolina intacta. A percentagem total de lípido recuperado foi cerca de 90% da quantidade de 18:0/20:4--glicerofosfocolina inicial.

Vestígios de metanol ou etanol dão origem a produtos indesejáveis, os fosfatidilálcoois, uma vez que os álcoois primários actuam como excelentes aceitadores nucleofílicos competindo com a serina (Comfurius e Zwaal, 1977; Heller, 1978; Yang *et al.*, 1967). No entanto, a metodologia utilizada durante a preparação dos sistemas de reacção para remover vestígios de álcoois contaminantes foi adequada, dado que não foram detectados quaisquer fosfatidilálcoois (Figura 19-A).

A Figura 20 mostra a conversão enzimática da 18:0/20:4-glicerofosfocolina pela fosfolipase D de *Streptomyces* sp. em função do tempo de reacção salientando a transfosfatidilação desejada, com formação de 18:0/20:4-glicerofosfoserina (●, SAPS), e a hidrólise indesejada com formação de ácido 18:0/20:4-glicerofosfórico (▼, SAPA). A conversão em SAPS e SAPA apresenta três fases distintas: uma inicial em que a sua produção aumenta com o tempo da reacção e que pode ser visualizada em detalhe na Figura 20-A, com o aumento do declive das tangentes à curva durante as primeiras 0,6 horas; uma segunda fase, mais extensa, em que a concentração de SAPA e SAPS aumenta linearmente com o tempo de reacção; e, posteriormente, uma terceira fase em que a concentração dos produtos se mantém constante e o seu traçado estabiliza num patamar. Estas fases são características para a maioria das enzimas (Motulsky e Christopoulos, 2003).

Independentemente do tempo considerado, a transfosfatidilação é sempre marcadamente superior à hidrólise. Os resultados da Figura 20 também mostram que a conversão máxima de 18:0/20:4-glicerofosfocolina é atingida após duas horas de incubação. Para períodos de tempo superiores praticamente não são sintetizados 18:0/20:4-glicerofosfoserina e ácido 18:0/20:4-glicerofosfórico (ácido fosfatídico) adicionais. Estes resultados sugerem que se atingiu as condições de equilíbrio no sistema heterogéneo ou que a enzima é inibida por um dos produtos resultantes, conforme foi previamente descrito para a colina libertada (Dawson e Hemington, 1967).

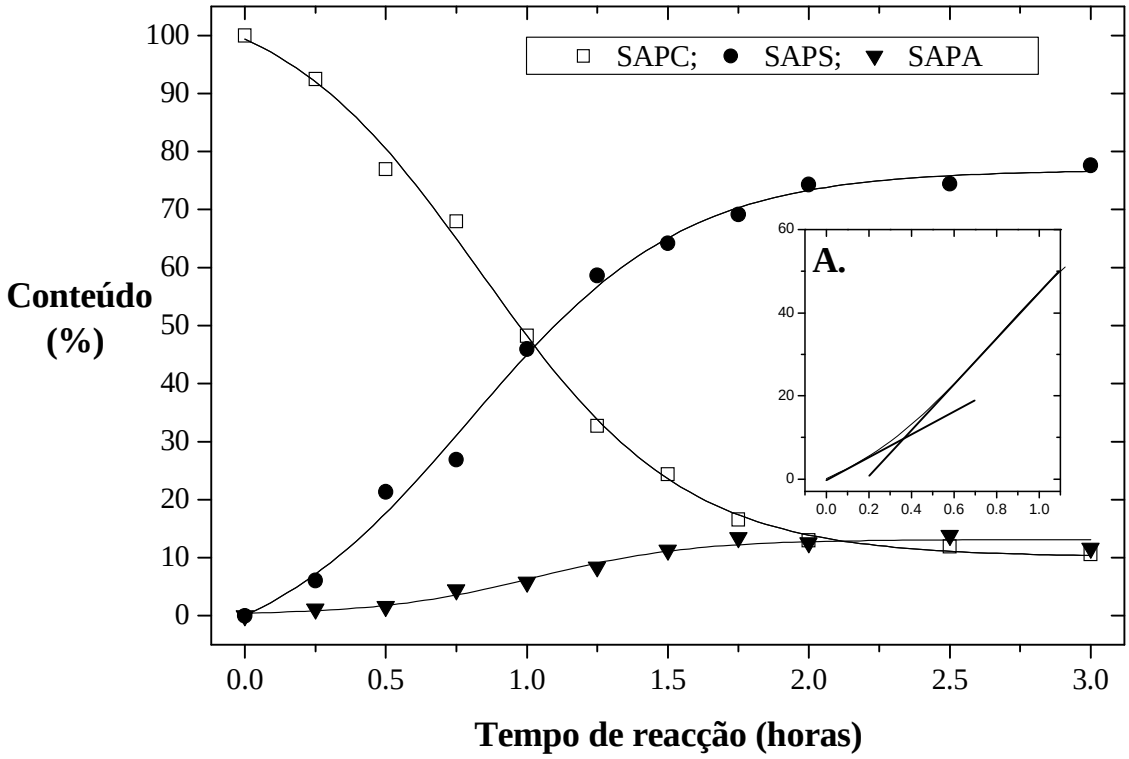


Figura 20 - Representação gráfica da conversão de 18:0/20:4-glicerofosfocolina pela fosfolipase D de *Streptomyces* sp. em função do tempo de reacção, num sistema bifásico saturado com L-serina. Os símbolos representam os dados obtidos para o conteúdo do sistema, em SAPC, SAPS e SAPA conforme a legenda, no tempo de reacção correspondente. As curvas resultam do ajuste de funções sigmoidais aos dados de cada um dos componentes, por regressão com o programa OriginLab OriginPro 8.
A. Os declives das tangentes à curva, representativa da conversão na espécie aminada, indicam que a velocidade de transfosfatidilação aumenta, sendo estimulada ao longo do tempo inicial de reacção. O mesmo pode ser afirmado para a reacção de hidrólise.

Estudos prévios indicam que a actividade da fosfolipase D é dependente da presença de iões metálicos, apesar de variar de acordo com a origem da enzima. Na enzima de origem microbiológica os iões metálicos têm uma menor influência, comparativamente com a fosfolipase D de origem vegetal (Mansfeld e Ulbrich--Hofmann, 2009). O Ca^{2+} é, aparentemente, o activador mais efectivo, e a sua concentração óptima é normalmente proporcional à concentração de substrato lipídico (Davidson e Long, 1958; Heller, 1978).

Apesar de se ter detectado que o Ca^{2+} é essencial para se atingir a actividade máxima de transfosfatidilação da fosfolipase D de *Streptomyces* sp., não é indispensável para a síntese de 18:0/20:4-glicerofosfoserina como mostram os resultados da Tabela VI. Na ausência de Ca^{2+} obteve-se uma razão transfosfatidilação/hidrólise de 4,

enquanto que na presença de 40 mM de Ca^{2+} o seu valor aumentou para cerca de 6. Apesar do Ca^{2+} estimular ambas as actividades enzimáticas, transfosfatidilação e hidrólise, a transfosfatidilação da 18:0/20:4-glicerofosfocolina é favorecida relativamente à hidrólise (Tabela VI).

Tabela VI - Efeito do Ca^{2+} e das dimensões do reactor na conversão de 18:0/20:4--glicerofosfocolina pela fosfolipase D de *Streptomyces* sp., após 2 horas de incubação num sistema bifásico saturado com L-serina.

Reactor	SAPS	SAPA
Tubo (10cm x 1,35cm) + Ca^{2+} 40mM	74,32 ± 0,18%	12,60 ± 0,87%
Tubo (10cm x 1,48cm) + Ca^{2+} 40mM	67,94 ± 0,32%	13,78 ± 0,90%
Tubo (10cm x 1,35cm) sem Ca^{2+}	38,00%	9,30%

Estes resultados sugerem que o Ca^{2+} deverá ter um papel importante na regulação do grau de hidratação do grupo polar do substrato lipídico, limitando a quantidade de água disponível na vizinhança aquando da reacção enzimática. O grau de hidratação dos fosfolípidos, como substrato, é provavelmente um factor muito importante para a actividade da fosfolipase D em particular e das fosfolipases em geral, uma vez que também foi descrito para a fosfolipase A_2 (Misiorowski e Wells, 1974).

Dado que a reacção decorreu num sistema heterogéneo, a superfície de contacto entre as fases deve ser um factor importante para a actividade enzimática, então testou-se a influência do diâmetro do reactor. O aumento da superfície de contacto entre as duas fases, promovido por um aumento do diâmetro do reactor, induziu uma redução da conversão da 18:0/20:4-glicerofosfocolina traduzida na menor percentagem do produto resultante da transfosfatidilação (Tabela VI). Atendendo a que se mantiveram as restantes condições experimentais, incluindo a velocidade de agitação, esta redução deverá resultar da agitação menos eficiente à medida que se aumenta a superfície de contacto entre as duas fases. Resultados semelhantes foram obtidos quando se diminuiu a intensidade de agitação.

Considerando que a fosfolipase D é hidrossolúvel e que os seus substratos são lipossolúveis e organizados na natureza sob a forma de uma matriz quase-bidimensional, a estrutura da interface lípido-água deve, certamente, desempenhar uma importante influência na actividade da fosfolipase D (Roberts, 1996). Estes argumentos são apoiados pelos primeiros estudos realizados com fosfolipase D de

couve em suspensões de lecitina ultrassonicada (Dawson, 1967; Dawson e Hemington, 1967). Segundo estes estudos, a actividade total da fosfolipase D (libertação de colina por hidrólise e transfosfatidilação) é maior em suspensões de lecitina ultrassonicadas, ou seja, em vesículas lipídicas mais pequenas. No entanto, a libertação de colina foi adicionalmente estimulada pela adição de éter, o qual é indispensável para se obter a actividade máxima (Dawson, 1967; Dawson e Hemington, 1967).

Tendo em atenção os dados apresentados, a solubilidade dos elementos constituintes do sistema de reacção e o facto de que os produtos da reacção são fosfolípidos poli-insaturados, em que as cadeias hidrocarbonadas poderão apresentar uma área transversal maior que a área do respectivo grupo polar, as micelas invertidas foram o arranjo quase-bidimensional escolhido para optimizar a síntese de 18:0/20:4--glicerofosfoserina, por promoverem uma elevada área interfacial. Adicionalmente, a remoção e agregação dos grupos polares do substrato fosfolípidico da fase orgânica para o centro aquoso da micela, irá acentuar a sua interacção com os catiões, a serina e a enzima.

As micelas invertidas foram então utilizadas como estrutura da interface lípido--água para estudar a actividade da fosfolipase D, em alternativa ao substrato lipídico monomérico. Com esta nova abordagem, que considera também a interacção substrato--substrato na enzima, pretendeu-se não só aumentar a actividade da fosfolipase D, mas também eliminar outros factores de que está dependente o sistema de duas fases, simplificando o processo. O sistema de duas fases em agitação está dependente não só da presença de éter dietílico para solubilização do substrato e dos produtos fosfolipídicos, mas também da eficiência da agitação e simultaneamente do diâmetro do reactor, ou mais propriamente, da dimensão da superfície de interface entre as duas fases.

Quando a reacção foi catalisada pela fosfolipase D num sistema de micelas invertidas de 18:0/20:4-glicerofosfocolina (Tabela VII), ambas as actividades, de transfosfatidilação e de hidrólise, foram favorecidas relativamente à acção enzimática em monómeros (Tabela VI). Portanto, o sistema de micelas invertidas permite um aumento da conversão de 18:0/20:4-glicerofosfocolina. Este pequeno aumento pode ser significativo na síntese enzimática de fosfolípidos em larga escala.

Tabela VII - Efeito do Ca^{2+} e das dimensões do reactor na conversão de 18:0/20:4--glicerofosfocolina pela fosfolipase D de *Streptomyces* sp., após 2 horas de incubação num sistema de micelas invertidas saturado com L-serina.

Reactor	SAPS	SAPA
Tubo (10cm x 1,35cm) + Ca^{2+} 40mM	77,29 ± 0,37%	14,01 ± 0,61%
Balão de 50ml + Ca^{2+} 40mM	76,76 ± 0,44%	13,15 ± 1,18%
Tubo (10cm x 1,35cm) sem Ca^{2+}	64,80%	12,10%

Tal como previamente descrito para o sistema bifásico com monómeros, o Ca^{2+} não é indispensável para a actividade da enzima mas permite melhorar a sua actividade de transfosfatidilação (Tabela VII). No entanto, apenas nos sistemas de micelas invertidas a transfosfatidilação e a hidrólise são incrementadas pelo mesmo factor.

Os resultados apresentados mostram que a razão transfosfatidilação/hidrólise é semelhante para a acção enzimática em substrato monomérico com Ca^{2+} e em micelas invertidas com e sem Ca^{2+}. Estes dados sugerem que a afinidade da fosfolipase D pela serina e pela água (nucleófilos competidores) nos sistemas monoméricos com cálcio e nos micelares é semelhante, pelo que as condições na vizinhança do substrato lipídico, nomeadamente o grau de hidratação, são similares naqueles sistemas. Assim, é possível que as diferenças observadas na quantidade de 18:0/20:4-glicerofosfocolina convertida, após 2 horas de reacção, resultem principalmente de diferenças na região interfacial de acção da fosfolipase D.

A menor influência do Ca^{2+} na acção da fosfolipase D, relativamente ao substrato monomérico, sugere que a interacção do Ca^{2+} com o substrato lipídico tenha um menor significado do que as interacções substrato-substrato (lípido-lípido) nas micelas invertidas.

Os resultados com o sistema de micelas invertidas de 18:0/20:4-glicerofosfocolina não sofreram alterações significativas por aumento do volume de éter dietílico (para 4 ml) e do diâmetro do reactor (Tubo *versus* balão de fundo redondo de 50 ml) (Tabela VII). No balão, a agitação é menos eficiente, porque o volume de éter e do reactor são maiores, e o magnete e a velocidade de agitação mantiveram-se. Como a reacção entre a enzima e o substrato não ocorreu na interface entre duas fases, a conversão de 18:0/20:4-glicerofosfocolina é independente da intensidade da agitação e do volume da fase orgânica.

Para confirmar a estrutura da 18:0/20:4-glicerofosfoserina resultante da transfosfatidilação, submeteram-se micelas invertidas de fosfatidilserina sintetizada, após purificação por TLC (Figura 19-B), à acção da fosfolipase A_2 para a determinação da posição dos ácidos gordos na cadeia de glicerol. Após a hidrólise da ligação éster dos ácidos gordos na posição *sn*-2 dos fosfolípidos, os produtos da reacção (lisofosfolípidos e ácidos gordos livres) foram separados por TLC unidimensional (Figura 19-C). As fracções foram então sujeitas a transmetilação e os respectivos ésteres metílicos analisados e identificados por cromatografia gasosa.

Os cromatogramas dos metilésteres da 18:0/20:4-glicerofosfocolina inicial e do produto da síntese enzimática, a 18:0/20:4-glicerofosfoserina, estão representadas nas Figuras 21 e 22, respectivamente.

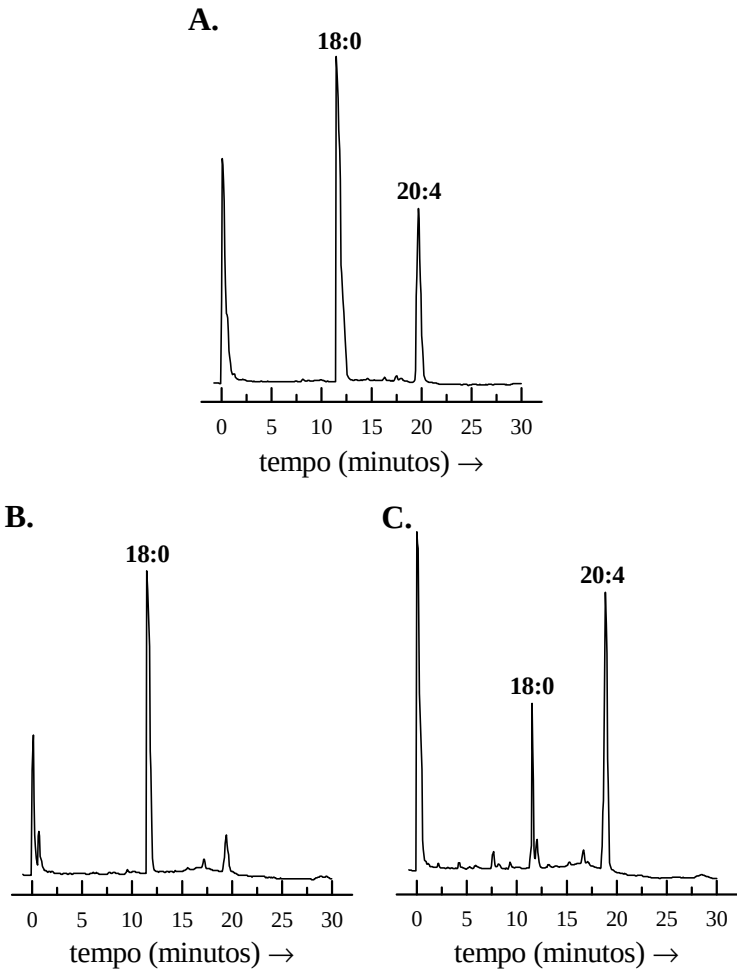


Figura 21 - Identificação dos ácidos gordos constituintes da 18:0/20:4-glicerofosfocolina por cromatografia gasosa. Separação dos metilésteres derivados do fosfolípido (**A.**) e identificação dos ácidos gordos (metilésteres) na posição *sn*-1 (**B.**) e na posição *sn*-2 (**C.**), após hidrólise pela fosfolipase A2.

Nos cromatogramas das Figuras 21-A e 22-A pode-se constatar que as espécies de fosfatidilcolina e a fosfatidilserina envolvidas apresentam a mesma constituição em ácidos gordos: ácido esteárico (C18:0) e ácido araquidónico (C20:4). Além disso, estes resultados também mostram que as insaturações das cadeias hidrocarbonadas constituintes não foram afectadas no processo de transfosfatidilação enzimática e nem no procedimento de purificação.

Na posição *sn*-1, ambos os fosfolípidos são constituídos exclusivamente por ácido esteárico (Figuras 21-B e 22-B).

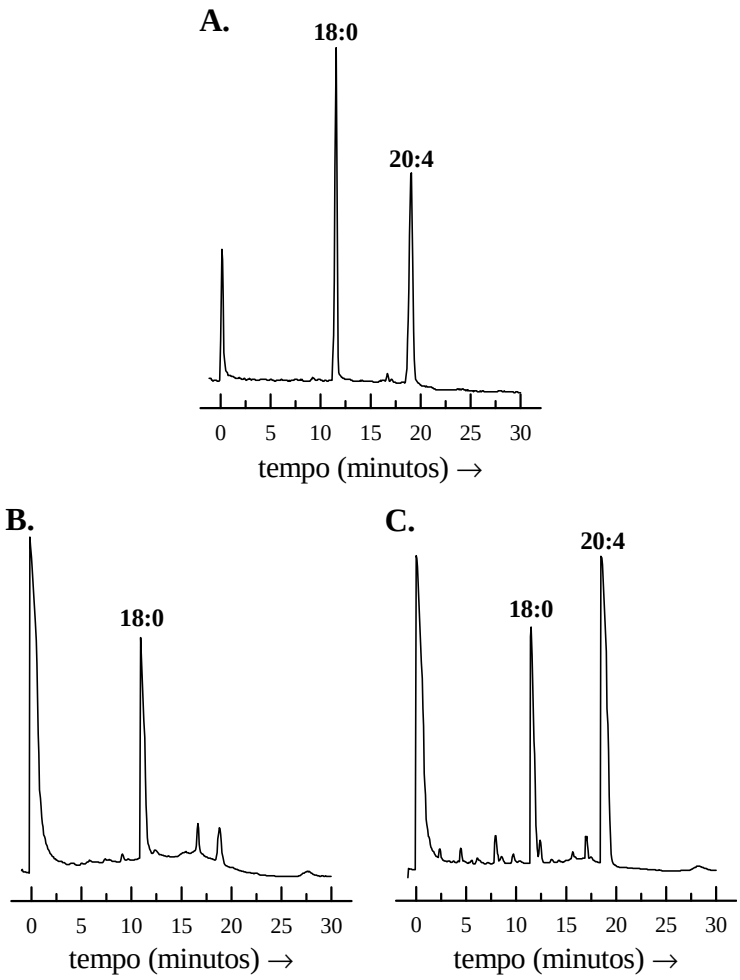


Figura 22 - Identificação, por cromatografia gasosa, dos ácidos gordos constituintes da espécie de fosfatidilserina resultante da transfosfatidilação de 18:0/20:4-glicerofosfocolina catalizada pela fosfolipase D na presença de L-serina. Separação dos metilésteres derivados do fosfolípido (**A.**) e identificação dos ácidos gordos (metilésteres) na posição *sn*-1 (**B.**) e na posição *sn*-2 (**C.**), após hidrólise pela fosfolipase A_2.

No cromatograma referente à análise dos ácidos gordos na posição *sn*-2 da espécie de fosfatidilserina (Figura 22-C), além do pico do ácido araquidónico, detecta-se um pico adicional que foi identificado como ácido esteárico. Este pico não era esperado, uma vez que a fosfolipase A_2 convencionalmente não hidrolisa o ácido esterificado na posição 1. Contudo, o mesmo pico está também presente no correspondente cromatograma da 18:0/20:4-glicerofosfocolina (Figura 21-C) em proporções semelhantes. É possível que o ácido esteárico, identificado nos cromatogramas referentes à posição *sn*-2, seja produto de alguma actividade lisofosfolipase, usualmente característica da fosfolipase A_2 citoplasmática (Roberts, 1996).

O conjunto dos resultados mostra que a síntese enzimática de 18:0/20:4-glicerofosfoserina, utilizando a 18:0/20:4-glicerofosfocolina comercial, por acção da fosfolipase D é adequado, dado que as posições relativas dos ácidos gordos não foram alteradas pela metodologia utilizada.

3.2 - Caracterização física de modelos fosfolipídicos representativos do folheto interno do sarcolema cardíaco

A organização molecular dos lípidos e proteínas nas biomembranas resulta essencialmente do efeito hidrofóbico conduzido de modo irreversível por aumento de entropia das moléculas de água. Esta organização é mantida pelas interacções de van der Waals entre as regiões apolares dos constituintes membranares e interacções electrostáticas (ião-ião, ião-dipolo e dipolo-dipolo que inclui as pontes de hidrogénio) entre as regiões polares ou regiões polares e a água envolvente (Houslay e Stanley, 1982). O aumento da entropia em sistemas longe do equilíbrio (como os sistemas membranares) cria de modo irreversível a ordem e a complexidade observável nos sistemas vivos (Prigogine *et al.*, 1972). A ausência de ligações rígidas entre a maioria das moléculas e a organização dinâmica do sistema membranar são essenciais para o seu normal funcionamento. Contudo, são estas características que as tornam excepcionalmente sensíveis a alterações químicas e físicas do meio que as rodeia, *e. g.*, temperatura, pH, estado de hidratação, força iónica e concentração de iões divalentes.

De acordo com os estudos prévios (apresentados no Capítulo I), o sarcolema isolado de miócitos de ratos recém-nascidos tem sido caracterizado de uma maneira mais exaustiva e sistemática, pelo que a sua composição foi usada no presente trabalho como referência representativa do sarcolema cardíaco. Apesar de nos cardiomiócitos de ratos recém-nascidos o sistema de túbulos-T estar ausente e o retículo sarcoplasmático estar pouco desenvolvido, as regiões de justaposição do sarcolema com o retículo sarcoplasmático, correspondentes às fendas diádicas estão presentes. As diferenças a nível quantitativo devem-se apenas a diferenças no estado de desenvolvimento e organização de organitos e estruturas envolvidos no fenómeno de contracção.

Apesar do sarcolema ser essencialmente constituído por lípidos e proteínas, a matriz estrutural resulta da organização supramolecular dos fosfolípidos. Adicionalmente, a monocamada interna do sarcolema parece desempenhar um papel fundamental nos eventos subjacentes à actividade cardíaca normal e patológica (Philipson *et al.*, 1980a; Post e Langer, 1992b). Neste sentido procurou-se simular o folheto interno do sarcolema utilizando dispersões lipídicas preparadas com as suas classes fosfolipídicas mais representativas: fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina e fosfatidilserina, utilizando a espécie mais abundante (Figura 23).

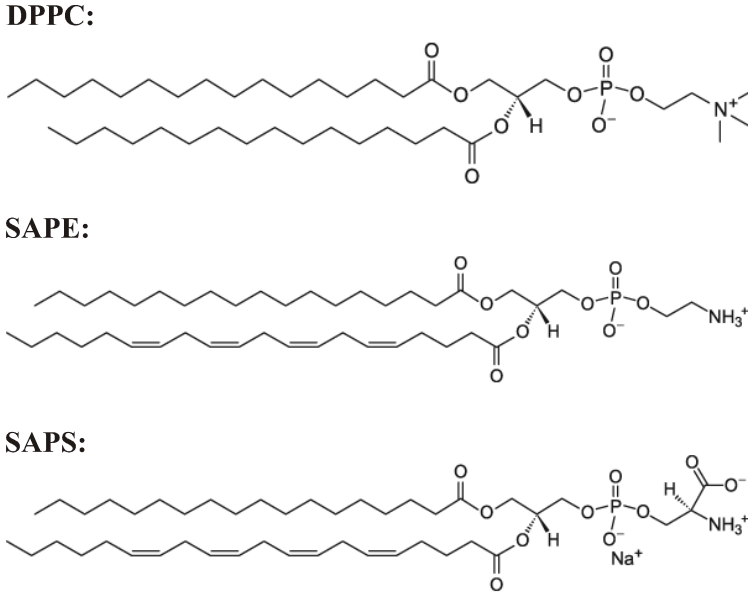


Figura 23 – Estrutura das espécies fosfolipídicas mais abundantes no folheto interno do sarcolema de acordo com os estudos de Matos *et al.* (1990).
DPPC: 16:0/16:0-glicerofosfocolina; SAPE: 18:0/20:4-glicerofosfoetanolamina;
SAPS: 18:0/20:4-glicerofosfoserina.

As dispersões lipídicas estudadas são constituídas por misturas ternárias, com composições representativas do folheto interno do sarcolema cardíaco assimétrico e também por misturas representativas da fracção fosfolipídica total do sarcolema (Tabela VIII). Com o estudo da composição fosfolipídica total pretendeu-se simular as condições de perda de assimetria lipídica.

Tabela VIII - Composição das dispersões lipídicas ternárias estudadas, representativas do folheto interno do sarcolema assimétrico e do sarcolema simétrico.

	Folheto interno do sarcolema	
	Assimétrico	**Simétrico**
16:0/16:0-glicerofosfocolina	53,3%	67,1%
18:0/20:4-glicerofosfoetanolamina	33,7%	25,5%
18:0/20:4-glicerofosfoserina (sintetizada)	13,0%	7,4%

Considerando a complexidade dos sistemas ternários de fosfolípidos, iniciou-se o estudo em sistemas binários. Misturas binárias com as espécies de fosfatidilcolina/fosfatidiletanolamina e fosfatidilcolina/fosfatilserina, foram analisadas, mantendo as proporções indicadas na Tabela VIII e substituindo o fosfolípido ausente por 16:0/16:0-glicerofosfocolina.

A racionalização do papel da organização e dinâmica dos lípidos no contexto da actividade do sarcolema cardíaco requer o estudo dos efeitos de concentrações de Ca^{2+} e H^{+} fisiológica e patologicamente relevantes nas propriedades físico-químicas das misturas lipídicas. As concentrações de Ca^{2+} na fenda diádica, em contacto directo com o sarcolema, devem atingir valores superiores a 600 µM durante a sístole, permanecendo acima de 20 µM durante a diástole (Peskoff *et al.*, 1992). No espaço intersticial, o Ca^{2+} disponível para troca é cerca de 500 µmol/kg de tecido, constituindo a fonte extracelular de Ca^{2+}. Na totalidade, o Ca^{2+} disponível para troca no tecido cardíaco é cerca de 1500 µmol/kg. O espaço intersticial está em equilíbrio com o Ca^{2+} vascular, cuja concentração é 1 mM (Langer, 1997).

Para além do interesse imediato do estudo dos efeitos do pH e do Ca^{2+} em membranas modelo, o presente estudo apenas terá significado fisiológico a nível do coração se a fosfatidiletanolamina e a fosfatidilserina se distribuírem simetricamente pelas bicamadas dos lipossomas multilamelares preparados. De acordo com os estudos de Roy *et al.* (1997), ambos os aminofosfolípidos se distribuem de maneira semelhante pelos dois folhetos de lipossomas multilamelares, nas percentagens em estudo.

O comportamento termotrópico dos fosfolípidos está largamente dependente do seu estado de ionização (Cevc *et al.*, 1981; Seddon *et al.*, 1983; van Dijck *et al.*, 1978). Assim, as propriedades das misturas de fosfatidiletanolamina e/ou fosfatidilserina com a fosfatidilcolina deverão ser influenciadas pelo pH, o qual determina a protonação dos grupos polares dos fosfolípidos. Por exemplo, a temperatura das transições de fase apenas é sensível às variações de pH que afectam a ionização (protonação) do grupo polar dos fosfolípidos. De facto, as temperaturas das transições variam para valores de pH próximos dos valores correspondentes às constantes de dissociação protónica dos fosfolípidos (Cevc *et al.*, 1981; Seddon *et al.*, 1983; Träuble e Eibl, 1974; van Dijck *et al.*, 1978). Neste sentido, as temperaturas das transições da fosfatidilcolina e da fosfatidiletanolamina não deverão ser alteradas para a gama de pH em estudo (entre 7,4 e 5,5). A fosfatidilcolina é protonada para valores de pH inferiores a 3 (van Dijck *et al.*, 1978) e as constantes de dissociação protónica dos grupos fosfato e amina da

fosfatidiletanolamina são 1,8 e 9,5, respectivamente (Seddon *et al.*, 1983). Contudo, a temperatura da transição entre fases lamelares da fosfatidilserina varia para valores de pH próximos de 5,5, que corresponde ao valor da desprotonação do grupo carboxílico (Cevc *et al.*, 1981), o qual deverá ser influenciado na gama de pH em estudo.

3.2.1 – Fosfolípidos constituintes puros

Os registos calorimétricos de aquecimento de lipossomas de cada um dos fosfolípidos representativos do sarcolema cardíaco estão representados na Figura 24.

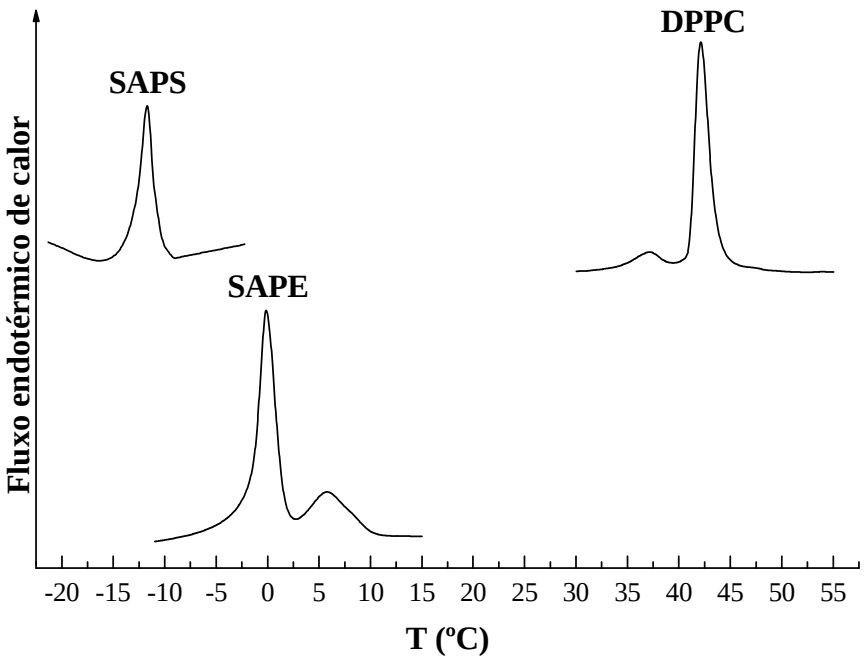


Figura 24 - Registos calorimétricos de dispersões lipídicas de cada um dos fosfolípidos representativos do sarcolema cardíaco. A 16:0/16:0-glicerofosfocolina (DPPC) e a 18:0/20:4--glicerofosfoserina (SAPS) foram dispersas numa solução de Hepes 5 mM e Mes 5 mM, e a 18:0/20:4-glicerofosfoetanolamina foi dispersa em água. A velocidade de varrimento foi 10 ºC/minuto.

Os lipossomas de 16:0/16:0-glicerofosfocolina apresentam dois picos. O primeiro, corresponde a uma transição entre fases sólidas ($L_{\beta'} \rightarrow P_{\beta'}$), normalmente designada por pré-transição, que diferem na sua organização bidimensional (Janiak *et al.*, 1976) e que é característico de fosfatidilcolinas com um grupo polar volumoso e cadeias acil longas.

O outro pico, com maior intensidade, corresponde à transição da fase gel para a fase fluída ou líquida-cristalina, ($P_{\beta'} \rightarrow L_{\alpha}$). As respectivas temperaturas e entalpias de transição, apresentadas na Tabela IX, são concordantes com as descritas em estudos prévios (Garidel *et al.*, 1997; Jacobson e Papahadjopoulos, 1975; Janiak *et al.*, 1976).

Tabela IX - Parâmetros termodinâmicos das transições de dispersões aquosas de cada um dos fosfolípidos representativos do sarcolema cardíaco.

LÍPIDO	TRANSIÇÃO	T_o (ºC)	ΔT (ºC)	ΔH (kcal/mol)
16:0/16:0-glicerofosfocolina	$L_{\beta'} \rightarrow P_{\beta'}$	34,6	4,4	0,45
	$P_{\beta'} \rightarrow L_{\alpha}$	41,2	3,1	6,5
18:0/20:4-glicerofosfoetanolamina	$L_{\beta} \rightarrow L_{\alpha}$	-1,5	3,1	6,5
	$L_{\alpha} \rightarrow H_{II}$	3,2	6,5	1,6
18:0/20:4-glicerofosfoserina	$L_{\beta} \rightarrow L_{\alpha}$	-13,0	4,7	5,0

T_o, defenida como a temperatura da transição é a temperatura de intersecção da tangente de declive ascendente do pico, com a linha de base; ΔT, intervalo de temperatura calculado a partir das temperaturas de intersecção das tangentes de declive ascendente e descendente do pico com a linha de base; ΔH, entalpia da transição.

O registo calorimétrico de lipossomas de 18:0/20:4-glicerofosfoetanolamina (Figura 24), dispersos em água, é semelhante ao de outras fosfatidiletanolaminas (Seddon *et al.*, 1983) e típico de um fosfolípido com elevado grau de pureza. Podem observar-se dois picos estreitos, correspondentes a duas transições de fase. Uma, de maior entalpia, deverá corresponder à transição da fase gel (L_{β}) para a fase fluída (L_{α}). A outra, de menor entalpia, corresponderá à transição da fase lamelar para uma fase não-lamelar, eventualmente uma fase hexagonal invertida (H_{II}).

A detecção das transições de fase da 18:0/20:4-glicerofosfoetanolamina dispersa em água não foi directa, uma vez que estas se encontram sobrepostas, na escala da temperatura onde ocorre a transição endotérmica da água. Neste sentido, adicionaram-se volumes crescentes de água à panela de referência do calorímetro para anular a transição da água na amostra. A titulação da dispersão aquosa de 18:0/20:4-glicerofosfoetanolamina com diferentes volumes de água na panela de referência está representada na Figura 25.

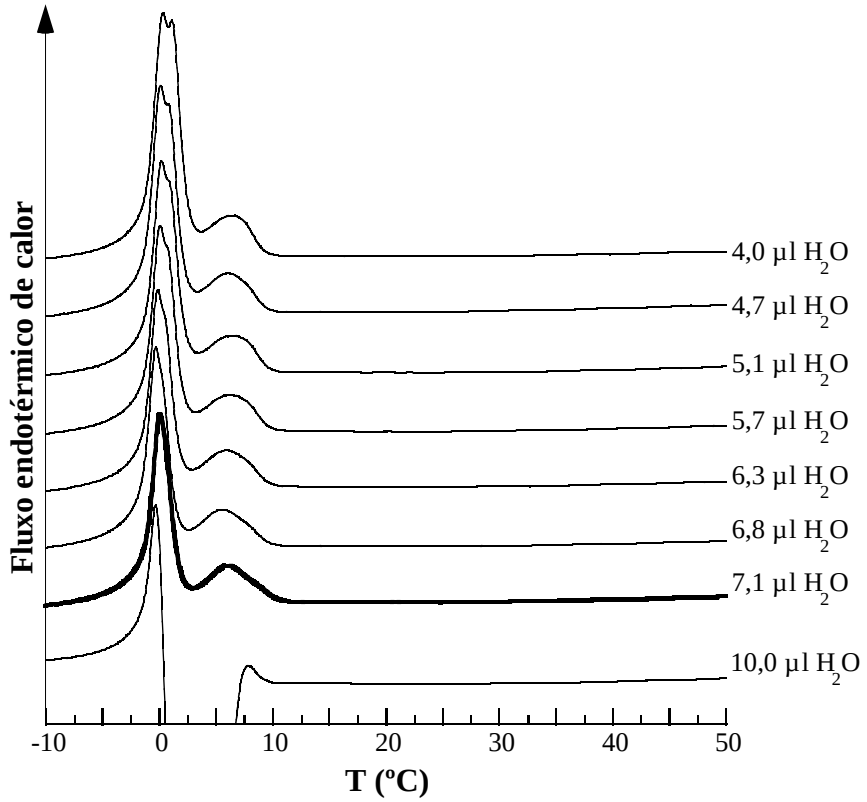


Figura 25 - Registos calorimétricos de 18:0/20:4-glicerofosfoetanolamina dispersa em água, tendo como referência diferentes volumes de água, os quais estão indicados para cada curva. Como as transições endotérmicas do aminofosfolípido e da água estão sobrepostas na escala da temperatura, as transições lipídicas apenas são visualizadas quando o volume de água na referência iguala o volume de água livre na amostra, 7,1 µl.

Quando o comportamento termotrópico das dispersões aquosas de 18:0/20:4--glicerofosfoetanolamina é registado contra 4,0 µl de água na panela de referência, o volume de água de referência é menor que o volume de água que hidrata a amostra, detectando-se um pico suplementar resultante do excesso de água na panela da amostra. À medida que se aumenta o volume de água na referência, o pico relativo à transição da água vai sendo atenuado até desaparecer, quando o volume de água na referência (7,1 µl) é igual ao volume de água livre na amostra. Para um volume de água superior na panela de referência, detecta-se um pico largo exotérmico, característico do excesso de água relativamente à amostra, notando-se ainda, uma pequena influência endotérmica das transições da 18:0/20:4-glicerofosfoetanolamina.

De acordo com a base de dados termodinâmicos de lípidos, LIPIDAT (Caffrey, 1993; Koynova e Caffrey, 1994), as temperaturas das transições de 18:0/20:4--glicerofosfoetanolamina apenas haviam sido detectadas por anisotropia de

fluorescência (Han e Gross, 1992). Segundo este método, a transição da fase gel para a fase líquida-cristalina ocorre a 10 ºC e a transição da fase lamelar para a fase hexagonal invertida a 32 ºC. Estes resultados afastam-se dos resultados aqui apresentados, obtidos por calorimetria diferencial de varrimento (Tabela IX). Contudo, a calorimetria é a metodologia de referência para determinar as temperaturas das transições de fase e as respectivas entalpias.

As entalpias das transições da 18:0/20:4-glicerofosfoetanolamina, nomeadamente da transição da fase gel para a líquida-cristalina, detectadas no presente trabalho são mais elevadas do que o supostamente esperado para um fosfolípido com quatro insaturações *cis* (Tabela IX). No entanto, é possível que o aumento do número de insaturações na cadeia *sn*-2 da fosfatidiletanolamina promova estados conformacionais na fase gel em que as cadeias hidrocarbonadas estejam estreitamente empacotadas, conforme foi descrito para as fosfatidilcolinas por Niebylski e Salem (1994).

O comportamento termotrópico de dispersões aquosas de 18:0/20:4--glicerofosfoserina, sintetizada por transfosfatidilação enzimática, foi também caracterizado (Figura 25). O registo calorimétrico obtido com a 18:0/20:4--glicerofosfoserina sintetizada é característico de uma fosfatidilserina pura (Cevc *et al.*, 1981). Apresenta um pico estreito e afilado centrado a -11,8 ºC, que deverá corresponder à transição endotérmica entre as fases lamelares, gel e líquida-cristalina, que se inicia a cerca de -13 ºC. A entalpia da transição é de cerca de 5,0 kcal/mol.

De maneira semelhante ao que foi descrito para a 18:0/20:4--glicerofosfoetanolamina, o registo da transição da 18:0/20:4-glicerofosfoserina foi realizado por titulação da dispersão lipídica com diferentes volumes de solução aquosa como referência, uma vez que a transição lipídica era parcialmente ocultada pela transição da solução aquosa de hidratação.

3.2.2 – Misturas binárias

3.2.2.1 - Lipossomas de 16:0/16:0-glicerofosfocolina com 33,7% de 18:0/20:4-glicerofosfoetanolamina

Os termogramas calorimétricos obtidos com misturas de 16:0/16:0--glicerofosfocolina e 18:0/20:4-glicerofosfoetanolamina, a pH 7,4, na ausência e na presença de diferentes concentrações de Ca^{2+}, estão representados na Figura 26. As misturas lipídicas foram preparadas com 33,7% de SAPE e 66,3% de DPPC, pelo que apresentam uma fracção molar de fosfatidiletanolamina semelhante ao folheto interno do sarcolema cardíaco assimétrico. Esta mistura tem uma composição próxima das misturas binárias com três elementos básicos (P = 3) que adquirem a energia mínima numa organização supramolecular com arranjos regulares de simetria hexagonal propostas por Virtanen *et al.* (1998).

Nos estudos de calorimetria realizados com esta mistura de fosfolípidos não foram detectados eventos endotérmicos para temperaturas inferiores a 10 ºC, descartando a hipótese de lipossomas constituídos exclusivamente pelo aminofosfolípido e a segregação das espécies lipídicas no plano da membrana.

Na ausência de Ca^{2+}, a mistura apresenta um único pico largo com um máximo a 36,1 ºC, próximo da transição principal do lípido maioritário, a fosfatidilcolina. A transição ocorre ao longo de uma vasta gama de temperatura, cerca de 12 ºC, entre as temperaturas das transições dos fosfolípidos constituintes puros, pelo que corresponde a uma transição endotérmica de pequena cooperatividade. Adicionalmente, a entalpia da transição de fase da mistura decresce de 6,5 kcal/mol, dos fosfolípidos constituintes puros, para 2,5 kcal/mol, sugerindo uma organização supramolecular caracterizada por forças intermoleculares menos intensas do que nos lípidos puros. O pico detectado é assimétrico, apresentando um traçado ascendente de declive menos acentuado, pelo que não se pode descartar a hipótese da coexistência de domínios lipídicos distintos no estado gel. Aliás, a coexistência de diferentes domínios sólidos foi também descrita para outras dispersões aquosas de fosfatidilcolina contendo fosfatidiletanolamina (Lee, 1975; Lentz e Litman, 1978; Shimshick e McConnell, 1973). No entanto, a ocorrência de apenas uma transição sugere que estas espécies lipídicas não deverão ser completamente imiscíveis.

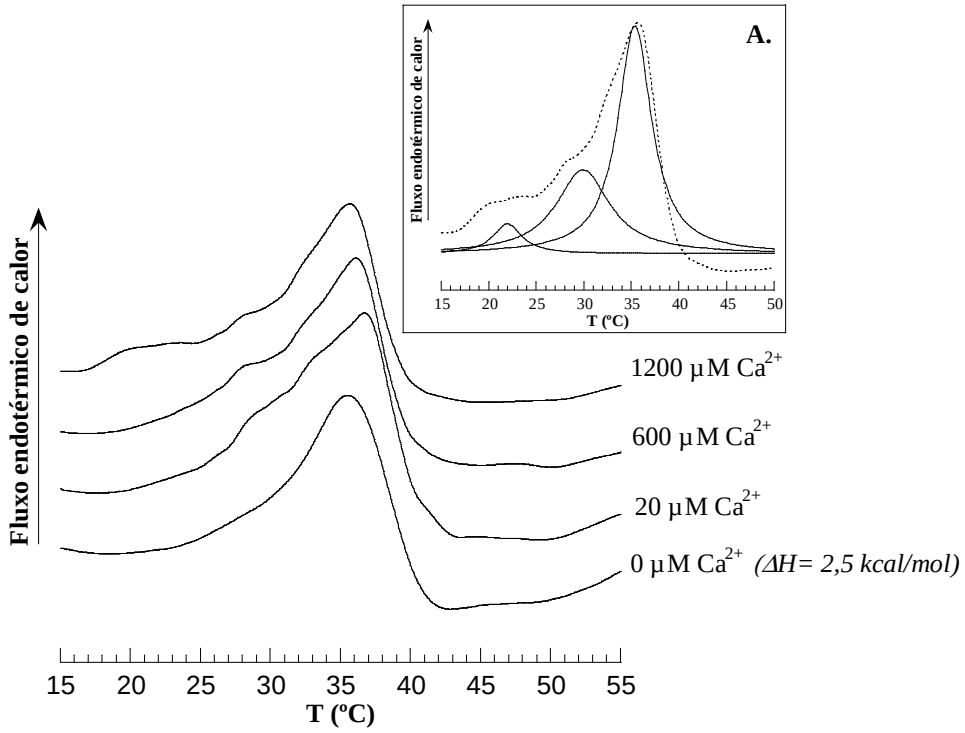


Figura 26 - Registos calorimétricos de aquecimento de dispersões lipídicas de 16:0/16:0--glicerofosfocolina contendo uma fracção de 18:0/20:4-glicerofosfoetanolamina semelhante ao folheto interno do sarcolema cardíaco assimétrico (33,7%) na presença de concentrações significativas de Ca^{2+}, a pH 7,4.
A. O processamento e análise do registo calorimétrico a 1200 µM de Ca^{2+}, através do ajuste de funções não-lineares com o programa OriginLab OriginPro 8, permitiram resolver o sinal nos seus picos constituintes.

A composição e a miscibilidade dos lípidos de uma mistura é reflectida no traçado da transição de fases do registo calorimétrico, tendo-se constatado que a imiscibilidade dos componentes de uma mistura se reflecte normalmente pela evidência de mais do que um pico (ou transição) (Lentz e Litman, 1978; Mabrey e Sturtevant, 1976). Contudo, o comportamento termotrópico de um sistema binário só poderá ser bem definido após a construção de um diagrama de fases (Dudda *et al.*, 1996), em que se representa as temperaturas das transições em função da composição da mistura, que requer o estudo de uma ampla gama de misturas sem relevância biológica, pelo que se afasta do âmbito do presente trabalho.

A baixa cooperatividade da transição observada deverá reflectir as diferenças entre grupos polares e ácidos gordos dos fosfolípidos evidentes na divergência entre as temperaturas das transições dos fosfolípidos puros.

A adição de Ca^{2+} não altera de modo significativo a transição de fase detectada na mistura binária descrita. Contudo, com o aumento da concentração deste ião divalente detectam-se, no traçado ascendente do pico principal, pequenos eventos endotérmicos sugerindo transições adicionais (Figura 26). Para concentrações de 20 a 600 µM de Ca^{2+} detecta-se um ombro com um máximo a cerca de 28 ºC que deverá corresponder a uma transição de pequena entalpia. Estes dados sugerem que a transição emergente deverá corresponder a domínios de DPPC mais ricos em aminofosfolípido. Na presença 1200 µM de Ca^{2+} detecta-se ainda um ombro adicional a temperatura inferior, relativamente ao outro já descrito, sugerindo a presença de domínios lipídicos ainda mais ricos em fosfatidiletanolamina. Estes dados sugerem que o Ca^{2+} acentua a heterogeneidade no plano da membrana com segregação das espécies lipídicas em diferentes domínios, provavelmente através de uma interacção preferencial com a 18:0/20:4-glicerofosfoetanolamina.

A capacidade do Ca^{2+} para induzir a segregação lipídica, nomeadamente, a formação de estruturas não-lamelares em lipossomas de fosfatidiletanolamina insaturada, ainda que com predominância das estruturas lamelares, foi descrita por outros (Cullis e de Kruiyff, 1976; Stollery e Vail, 1977). Adicionalmente, concentrações de 2 a 4 mM de Ca^{2+} promovem a fusão de vesículas unilamelares pequenas de fosfatidiletanolamina, desde que o grupo fosfato do fosfolípido se encontre ionizado (Stollery e Vail, 1977). Aparentemente, a interacção do grupo fosfato ionizado com o catião é proporcionada pela conformação da fosfatidiletanolamina com o grupo polar orientado segundo o plano da membrana (Hauser *et al.*, 1981). Todavia, o grupo polar da fosfatidilcolina também apresenta uma orientação semelhante, mas na presença de 5 mM de Ca^{2+} apenas 1% deste fosfolípido interage com o catião (Hauser *et al.*, 1977), sugerindo diferenças significativas no grau de hidratação dos grupos polares destes fosfolípidos.

Apesar de a calorimetria diferencial de varrimento permitir um estudo termodinâmico das transições de fase das dispersões lipídicas, não fornece informação acerca da fluidez dentro cada fase. Assim, a fluidez membranar das misturas fosfolipídicas foi caracterizada por polarização de fluorescência, *P*, do DPH (Figura 27). A ordem e dinâmica das cadeias acil fosfolipídicas, proporcional à fluidez membranar avaliada pela sonda, são drasticamente alteradas pela transição entre fases lamelares (Lentz *et al.*, 1976a).

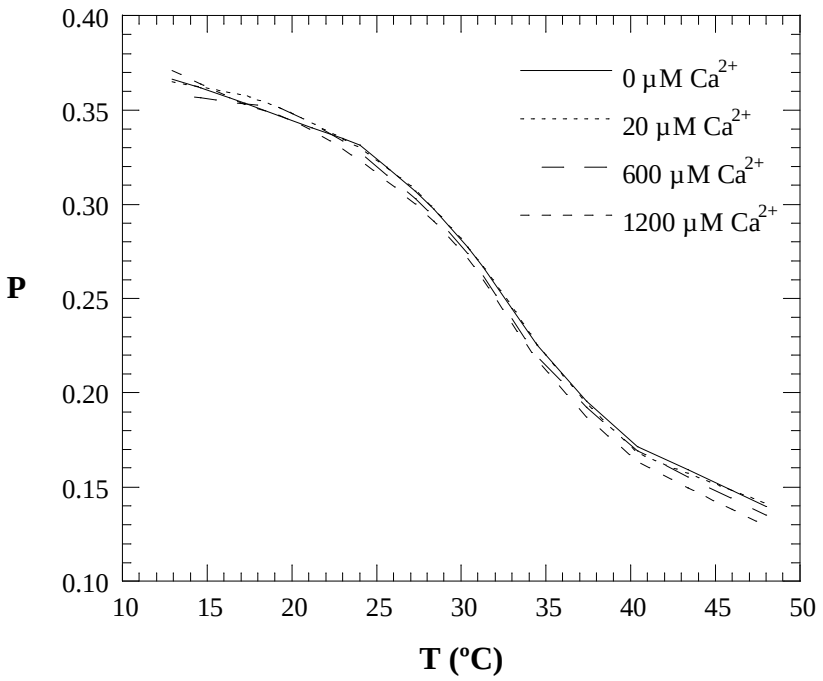


Figura 27 - Polarização de fluorescência do DPH em função da temperatura de dispersões lipídicas de 16:0/16:0-glicerofosfocolina contendo uma fracção de 18:0/20:4--glicerofosfoetanolamina semelhante ao folheto interno do sarcolema cardíaco assimétrico (33,7%) na presença de concentrações significativas de Ca^{2+}, a pH 7,4.

A polarização de fluorescência de DPH nas misturas lipídicas decresce intensamente com o aumento da temperatura, entre 26 e 40 ºC, isto é ao longo de 14 ºC. Este comportamento termotrópico é característico de uma transição entre duas fases lamelares, da fase gel para a líquida cristalina, de uma mistura fosfolipídica (Lentz *et al.*, 1976b) com pequena cooperatividade, que ocorre em concordância com a transição de fase de maior entalpia detectada por calorimetria. Aparentemente, o Ca^{2+} não induz qualquer alteração na dinâmica da membrana que possa ser detectada por polarização de fluorescência de DPH.

Conforme foi descrito anteriormente (Shinitzky e Barenholz, 1978), a polarização de fluorescência de misturas não ideais representa a transição global da mistura, devido ao facto do DPH partilhar na região mais hidrofóbica da membrana de um modo semelhante nas diferentes fases. Portanto, estes resultados apoiam que a transição de fase principal detectada por calorimetria corresponda à transição entre duas fases lamelares. No entanto, a polarização de fluorescência de DPH não fornece informação adicional quanto à coexistência de diferentes fases sólidas no plano da membrana nem à natureza das transições de menor entalpia.

O comportamento termotrópico de dispersões de 16:0/16:0-gliocerofosfocolina contendo 18:0/20:4-glicerofosfoetanolamina numa fracção semelhante ao folheto interno do sarcolema assimétrico, foi também estudado em função da concentração dos iões H^+. Os termogramas calorimétricos para valores de pH 7,4; 6,5 e 5,5, estão representados na Figura 28.

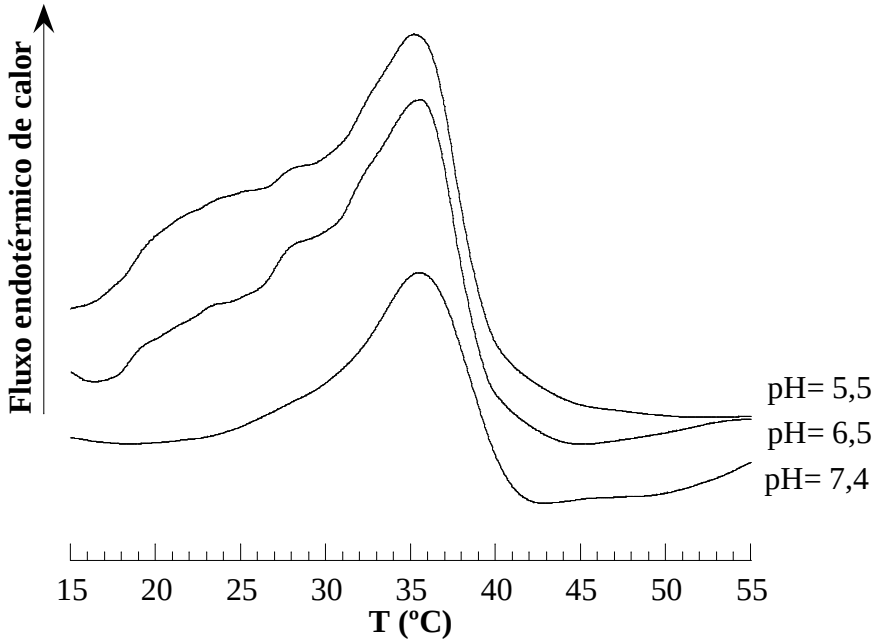


Figura 28 - Registos calorimétricos de aquecimento de lipossomas de 16:0/16:0--glicerofosfocolina com 33,7% de 18:0/20:4-glicerofosfoetanolamina (semelhante ao sarcolema assimétrico) dispersos em pH 7,4; 6,5 e 5,5.

Na ausência de Ca^{2+}, a acidificação do meio até pH 5,5 induz ou acentua a segregação das espécies lipídicas em diferentes domínios, dado que se detectam novos eventos endotérmicos sob a forma de ombros no traçado ascendente do pico, mais próximos da temperatura da transição da 18:0/20:4-glicerofosfoetanolamina pura, sugerindo domínios mais ricos em aminofosfolípidos (Figura 28).

O efeito dos iões H^+ parece ser semelhante ao efeito induzido pelo Ca^{2+} nas dispersões a pH 7,4. Note-se no entanto que, os iões H^+ são aparentemente mais efectivos, pois a pH 6,5 encontram-se num valor de concentração sub-micromolar, induzindo um efeito semelhante ao que foi observado e descrito anteriormente, para a presente mistura em 1200 µM de Ca^{2+} e pH 7,4.

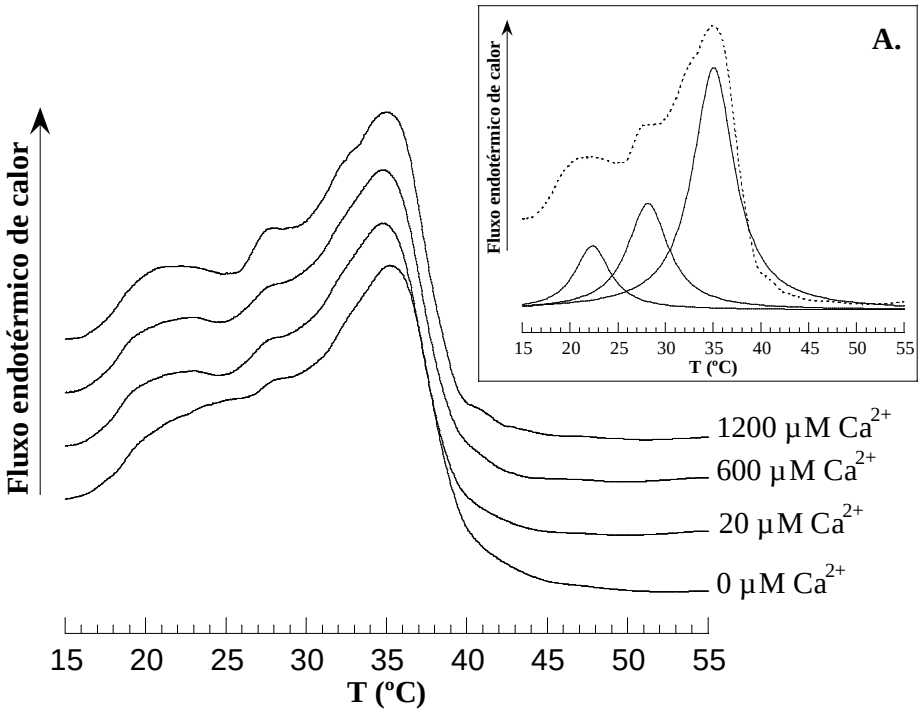


Figura 29 - Registos calorimétricos de aquecimento de dispersões lipídicas de 16:0/16:0--glicerofosfocolina contendo uma fracção de 18:0/20:4-glicerofosfoetanolamina semelhante ao folheto interno do sarcolema cardíaco assimétrico (33,7%) na presença de concentrações significativas de Ca^{2+}, a pH 5,5.
A. O processamento e análise do registo calorimétrico a 1200 µM de Ca^{2+}, através do ajuste de funções não-lineares com o programa OriginLab OriginPro 8, permitiram resolver o sinal nos seus picos constituintes.

Na presença de Ca^{2+}, existe um aumento do efeito induzido pelos iões H^+ (Figura 29). A pH 5,5, o efeito de ambos os iões no comportamento termotrópico destas misturas lipídicas parece somar-se mutuamente. À medida que a concentração de Ca^{2+} aumenta detecta-se uma maior individualização dos ombros, os quais se tornam mais estreitos e afilados, podendo-se já falar mesmo em novos picos (Figura 29). Os resultados indicam que ambos os catiões, Ca^{2+} e H^+, diminuem a solubilidade da 18:0/20:4-glicerofosfoetanolamina na matriz de 16:0/16:0-glicerofosfocolina, promovendo a segregação em diferentes domínios, sem alterar significativamente o pico da transição principal da mistura.

3.2.2.2 - Lipossomas de 16:0/16:0-glicerofosfocolina com 25,5% de 18:0/20:4-glicerofosfoetanolamina

Os termogramas calorimétricos das dispersões de 16:0/16:0-glicerofosfocolina contendo 18:0/20:4-glicerofosfoetanolamina, numa percentagem semelhante à existente no sarcolema simétrico, em diferentes concentrações de Ca^{2+}, a pH 7,4 e 5,5, estão representados nas Figuras 30 e 31 respectivamente. As misturas foram preparadas com 74,5% de DPPC e 25,5% SAPE, correspondendo à fracção de fosfatidiletanolamina existente em cada um dos folhetos da membrana em condições de perda total de assimetria lipídica. Portanto, a perda de assimetria traduz-se num decréscimo da percentagem de etanolaminas na mistura binária.

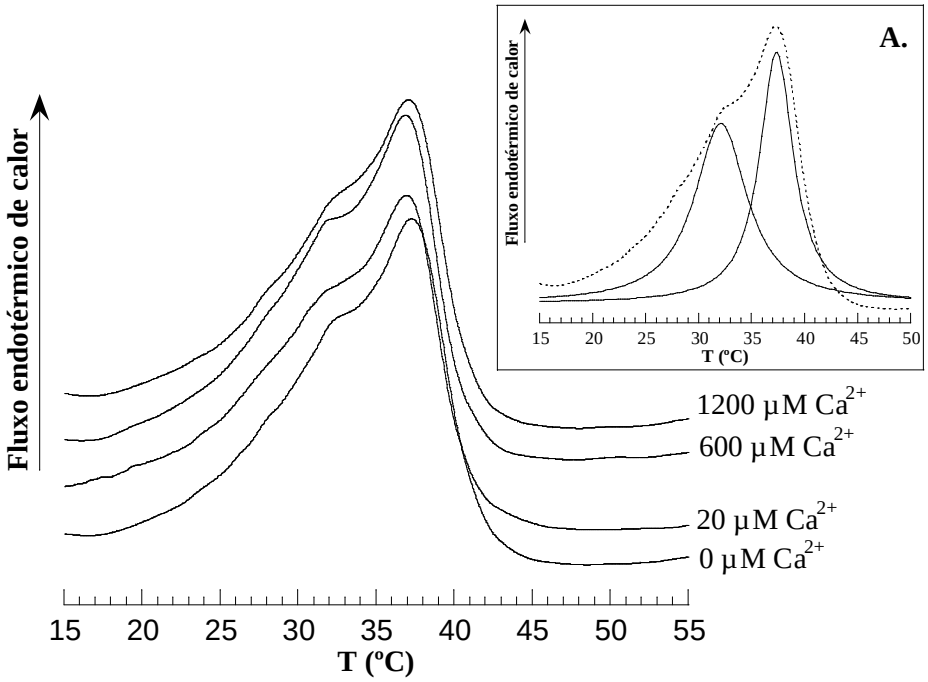


Figura 30 - Registos calorimétricos de aquecimento de dispersões lipídicas de 16:0/16:0--glicerofosfocolina contendo uma fracção de 18:0/20:4-glicerofosfoetanolamina semelhante a cada folheto do sarcolema cardíaco simétrico (25,5%) na presença de concentrações significativas de Ca^{2+}, a pH 7,4.
A. O processamento e análise do registo calorimétrico a 1200 µM de Ca^{2+}, através do ajuste de funções não-lineares com o programa OriginLab OriginPro 8, permitiram resolver o sinal nos seus picos constituintes.

Ao contrário das misturas de DPPC com 33,7% de SAPE (composição semelhante à existente no sarcolema assimétrico), o comportamento termotrópico destas misturas não é alterado por acção dos catiões Ca^{2+} e H^{+} quer em concentrações fisiológicas (Figura 30) quer em concentrações patológicas extremas, pH 5,5 até 7,5 mM de Ca^{2+} (Figura 31).

Na ausência de Ca^{2+}, detecta-se uma larga transição endotérmica com um máximo a 37 ºC e um ombro centrado a 32 ºC. De facto, o traçado calorimétrico pode ser perfeitamente descrito pela soma de duas transições endotérmicas independentes como mostra a Figura 30-A obtida pela desconvulsão dos picos. Estes dados sugerem que coexistem no plano da membrana diferentes domínios suficientemente estáveis para apresentarem transições de fase a temperaturas distintas e não sofrerem alterações significativas pela acidificação nem pelo aumento da concentração de cálcio. Este comportamento termotrópico é semelhante ao observado em misturas de DPPC com 33,7% de SAPE, descrito anteriormente, na presença de 600 µM de Ca^{2+} e pH 7,4.

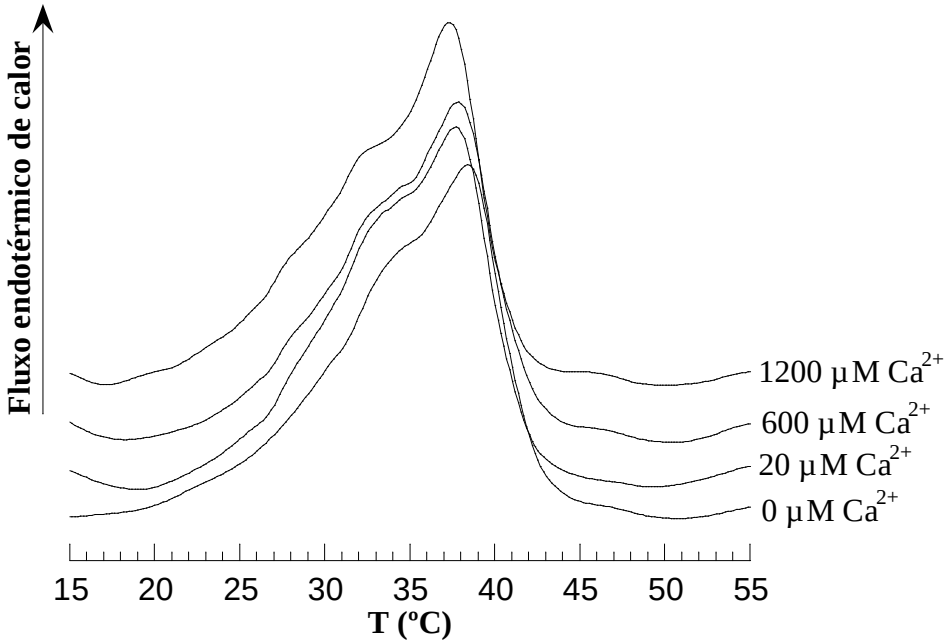


Figura 31 - Registos calorimétricos de aquecimento de dispersões lipídicas de 16:0/16:0--glicerofosfocolina contendo uma fracção de 18:0/20:4-glicerofosfoetanolamina semelhante a cada folheto do sarcolema cardíaco simétrico (25,5%) na presença de concentrações significativas de Ca^{2+}, a pH 5,5.

A detecção de dois picos endotérmicos para estas misturas sugere que na presente proporção (74,5% de DPPC e 25,5% SAPE) os fosfolípidos apresentam uma miscibilidade limitada, ou mesmo imiscibilidade, em pelo menos uma das fases da mistura, tal como foi observado para vesículas unilamelares de 14:0/14:0--glicerofosfocolina contendo 14:0/14:0-glicerofosfoetanolamina (Lentz e Litman, 1978).

O comportamento termotrópico das misturas não é alterado pela presença de Ca^{2+} nem pelo aumento da concentração do catião H^{+}, sugerindo que só depende das proporções dos fosfolípidos constituintes da mistura. A origem do pico centrado a 32 ºC, para além do pico principal a 37 ºC, nas misturas contendo 25,5% de fosfatidiletanolamina deverá ser diferente da origem das transições secundárias detectadas na presença de Ca^{2+} nas misturas com 33,7% de aminofosfolípido. Deve-se salientar que na ausência de Ca^{2+}, a mistura com 25,5% de fosfatidiletanolamina apresenta dois picos endotérmicos sobrepostos, que devem corresponder a transições de domínios lipídicos distintos. No entanto, as misturas com percentagem molar semelhante ao folheto interno do sarcolema assimétrico (33,7% de SAPE) e pH 7,4, apenas apresentam uma única transição, não apresentando evidências de segregação lipídica em domínios diferentes, ainda que a fracção de aminofosfolípido na mistura seja maior. Neste caso, a separação de domínios lipídicos só é induzida, pela presença de Ca^{2+} e/ou decréscimo do pH.

3.2.2.3 - Lipossomas de 16:0/16:0-glicerofosfocolina com 13,0% de 18:0/20:4-glicerofosfoserina

A Figura 32 mostra o comportamento termotrópico de dispersões de 16:0/16:0--glicerofosfocolina contendo 13,0% de 18:0/20:4-glicerofosfoserina, em diferentes concentrações de Ca^{2+}, a pH 7,4. Uma fracção semelhante de fosfatidilserina constitui o folheto interno do sarcolema assimétrico, podendo por si só ser responsável pelo armazenamento do Ca^{2+} implicado na associação excitação-contracção.

Na ausência de Ca^{2+}, detecta-se um único pico endotérmico afilado centrado a 37 ºC e com um elevado grau de simetria. Este pico corresponde a uma transição que ocorre ao longo de 7 a 8 ºC e apresenta uma cooperatividade bastante elevada.

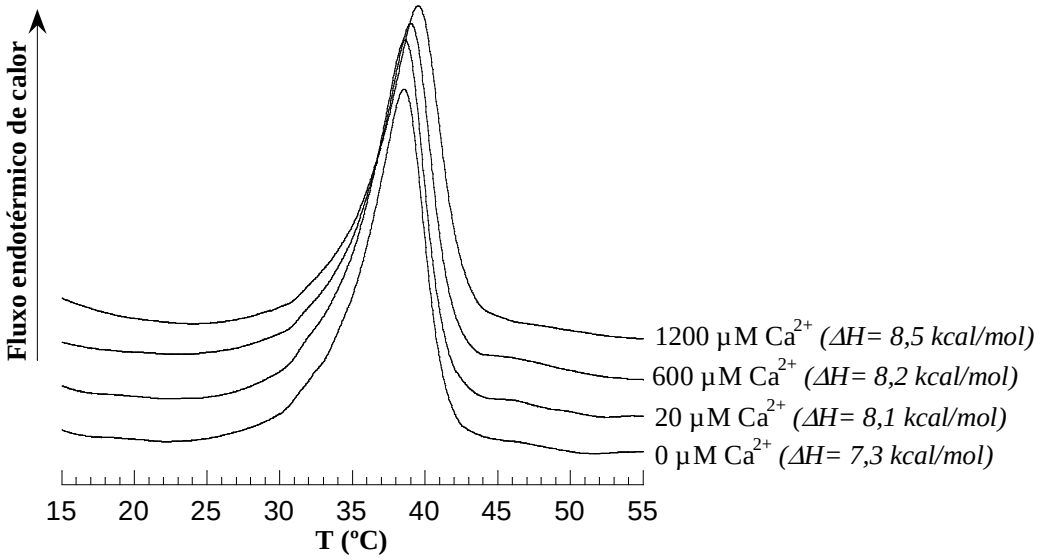


Figura 32 - Registos calorimétricos de aquecimento de dispersões lipídicas de 16:0/16:0--glicerofosfocolina contendo uma fracção de 18:0/20:4-glicerofosfoserina semelhante ao folheto interno do sarcolema cardíaco assimétrico (13,0%) na presença de concentrações significativas de Ca^{2+}, a pH 7,4.

O perfil da transição da mistura assemelha-se ao de transições principais de fosfolípidos puros, nomeadamente da espécie maioritária, a fosfatidilcolina. Os dados mostram que na presença de 13,0% de 18:0/20:4-glicerofosfoserina, a transição principal das dispersões de 16:0/16:0-glicerofosfocolina é deslocada 5 ºC para temperaturas inferiores, simultaneamente com um pequeno aumento da sua extensão e a supressão da pré-transição. Aparentemente, nesta mistura não existe separação lateral de fases ou imiscibilidade dos componentes lipídicos. A elevada simetria do pico da transição parece excluir o seu desdobramento em dois picos separados, correspondentes a duas transições sobrepostas na escala da temperatura. Contrariamente às dispersões binárias contendo 18:0/20:4-glicerofosfoetanolamina, tanto a entalpia como a cooperatividade da transição são elevadas.

A separação lateral de domínios lipídicos em misturas contendo fosfatidilserina, é normalmente induzida pela presença de Ca^{2+} (Cullis e de Kruijff, 1979; Haverstick e Glaser, 1987; van Dijck *et al.*, 1978). No entanto, nestas misturas (87% de DPPC e 13% de SAPS) o termograma calorimétrico descrito na ausência de Ca^{2+} é fielmente reproduzido na presença do catião bivalente. Todavia, o aumento da concentração de Ca^{2+} promove um ligeiro mas progressivo aumento da temperatura a que ocorre a transição e da entalpia da transição (Figura 32), sugerindo que o Ca^{+2} melhora o

empacotamento dos fosfolípidos na mistura. A miscibilidade dos componentes fosfolipídicos da mistura em estudo, na presença de Ca^{2+}, deverá ser garantida pela elevada insaturação da cadeia na posição *sn*-2 do aminofosfolípido. De acordo com os estudos de Tilcock e Cullis (1981) a capacidade dos catiões Ca^{2+} e H^{+} para induzirem a segregação da fosfatidilserina com sequente formação de estruturas não lamelares, está dependente do grau de insaturação do aminofosfolípido constituinte e da fracção presente. Maior insaturação das cadeias acil requer uma maior concentração de Ca^{2+}. Comparando as entalpias das transições das misturas em estudo e dos seus constituintes puros, podemos constatar que a entalpia da transição da mistura é superior a qualquer uma das entalpias das transições dos fosfolípidos constituintes puros. Resultados semelhantes haviam sido obtidos em outras misturas de fosfatidilcolina com aminofosfolípidos (Blume e Ackermann, 1974; van Dijck *et al.*, 1978).

Uma maior entalpia para a transição da mistura traduz uma maior barreira energética entre as duas fases implicadas, relativamente às transições entre fases lamelares dos fosfolípidos constituintes puros. Isto implica que seja necessário fornecer mais energia, na forma de calor, para quebrar as interacções entre as cadeias hidrocarbonadas de fosfolípidos adjacentes na fase gel, e dar origem a uma fase líquida-cristalina, onde os fosfolípidos apresentam maior mobilidade. Assim, os fosfolípidos nas dispersões de 16:0/16:0-glicerofosfocolina contendo 13,0% de 18:0/20:4--glicerofosfoserina apresentam interacções mais fortes entre si, do que nas dispersões de cada uma dessas espécies puras. Este facto deverá ter origem no maior empacotamento entre as cadeias hidrocarbonadas dos fosfolípidos da mistura, que deverá resultar da complementaridade geométrica existente entre as espécies fosfolipídicas constituintes.

Os resultados de polarização de fluorescência do DPH (Figura 33) mostram que a fluidez membranar da mistura decresce abruptamente no intervalo de temperatura coincidente com a transição endotérmica registada por calorimetria. Assim, a transição descrita anteriormente corresponde à transição da mistura entre as fases lamelares gel e líquida-cristalina. Adicionalmente, o aumento da concentração de cálcio não afecta o grau de fluidez, detectado por DPH, das bicamadas lipídicas no estado sólido nem no estado fluído.

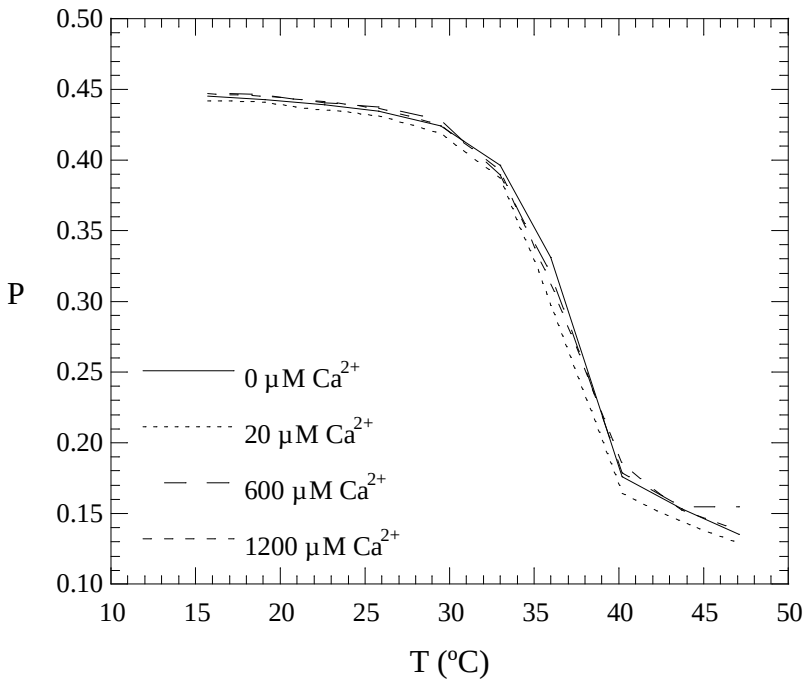


Figura 33 - Polarização de fluorescência do DPH em função da temperatura de dispersões lipídicas de 16:0/16:0-glicerofosfocolina contendo uma fracção de 18:0/20:4-glicerofosfoserina semelhante ao folheto interno do sarcolema cardíaco assimétrico (13,0%) na presença de concentrações significativas de Ca^{2+}, a pH 7,4.

De maneira semelhante ao descrito para o cálcio, o aumento da concentração de iões H^+, até pH 5,5 não provocou alterações no comportamento termotrópico da mistura contendo 13,0% de SAPS (Figura 34).

É de notar que para valores de pH próximos de 5,5 se dá a protonação do grupo carboxílico da fosfatidilserina, promovendo um aumento da temperatura de transição deste fosfolípido à medida que se reduz o pH (Cevc *et al.*, 1981; van Dijck *et al.*, 1978).

As dispersões de 16:0/16:0-glicerofosfocolina contendo 13% de 18:0/20:4--glicerofosfoserina apresentam, uma única transição estável, que não é perturbada pela presença de Ca^{2+} nem por acidificação do meio até pH 5,5 (Figura 35). Estes resultados indicam que a miscibilidade dos fosfolípidos não é perturbada pelos catiões estudados, pelo que os constituintes da mistura devem interagir entre si de tal modo que apresentem uma distribuição regular e estável no plano da membrana. Tal como descrito para pH 7,4, a entalpia das misturas a pH 5,5 aumenta com o aumento da concentração de cálcio (Figura 35).

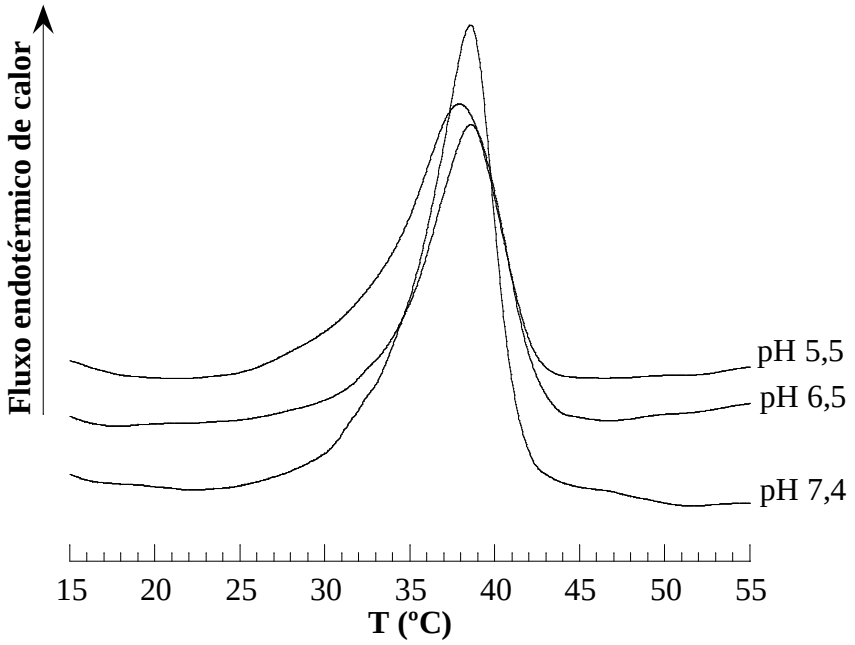


Figura 34 - Registos calorimétricos de aquecimento de lipossomas de 16:0/16:0--glicerofosfocolina com 13,0% de 18:0/20:4-glicerofosfoserina (semelhante ao sarcolema assimétrico) dispersos em pH 7,4; 6,5 e 5,5.

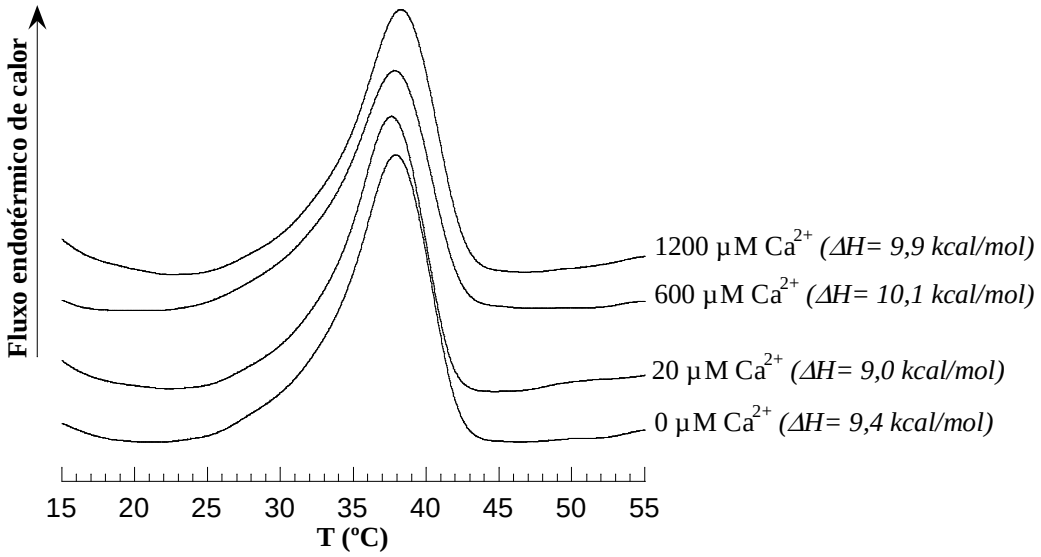


Figura 35 - Registos calorimétricos de aquecimento de dispersões lipídicas de 16:0/16:0--glicerofosfocolina contendo uma fracção de 18:0/20:4-glicerofosfoserina semelhante ao folheto interno do sarcolema cardíaco assimétrico (13,0%) na presença de concentrações significativas de Ca^{2+}, a pH 5,5.

3.2.2.4 - Lipossomas de 16:0/16:0-glicerofosfocolina com 7,4% de 18:0/20:4-glicerofosfoserina

Os termogramas calorimétricos de dispersões de 16:0/16:0-glicerofosfocolina contendo a espécie representativa de fosfatidilserina, a 18:0/20:4-glicerofosfoserina, estão representados na Figura 36 na ausência e na presença de diferentes concentrações de Ca^{2+}, a pH 7,4. As misturas foram preparadas com 92,7% de DPPC e por 7,4% de SAPS, correspondendo à fracção molar de fosfatidilserina existente em cada um dos folhetos do sarcolema em condições de perda de assimetria lipídica.

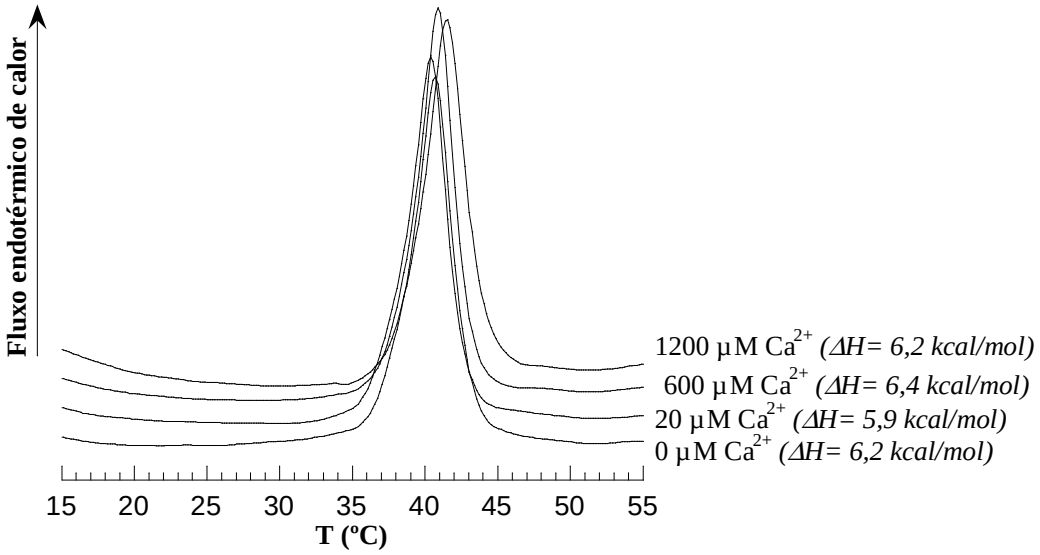


Figura 36 - Registos calorimétricos de aquecimento de dispersões lipídicas de 16:0/16:0--glicerofosfocolina contendo uma fracção de 18:0/20:4-glicerofosfoserina semelhante a cada folheto do sarcolema cardíaco simétrico (7,4%) na presença de concentrações significativas de Ca^{2+}, a pH 7,4.

De maneira semelhante ao que foi observado e descrito para as misturas contendo 13,0% de fosfatidilserina, misturas de DPPC com 7,4% de SAPS apresentam uma transição de fase com elevada cooperatividade, caracterizada por um pico simétrico e afilado, centrado a 40,5 ºC. Adicionalmente, 7,4% de SAPS é suficiente para remover a pré-transição típica de DPPC. Na presente mistura, a fracção de fosfatidilserina é aproximadamente metade daquela existente no folheto interno do sarcolema assimétrico, pelo que a transição da mistura ocorre num intervalo de temperatura menor, cerca de 5 ºC, culminando à mesma temperatura da transição principal da 16:0/16:0--glicerofosfocolina (Figura 36). O valor para a entalpia da transição da mistura é

semelhante ao das entalpias das transições dos fosfolípidos puros, mas menor do que o da mistura contendo 13,0% de fosfatidilserina. Estes dados sugerem que o empacotamento das cadeias hidrocarbonadas dos fosfolípidos da mistura deverá ser próximo ao dos constituintes puros, mas consideravelmente menor relativamente às dispersões que contêm 13,0% de 18:0/20:4-glicerofosfoserina, reflectindo a percentagem molar de aminofosfolípido presente na mistura, para aliviar o estresse no empacotamento da 16:0/16:0-glicerofosfocolina, que é praticamente metade.

Na presença de concentrações crescentes de Ca^{2+}, de 20 a 1200 µM (Figura 36), o comportamento termotrópico da mistura não é perturbado. Aparentemente, a miscibilidade dos fosfolípidos constituintes da mistura não é alterada pela presença de Ca^{2+}.

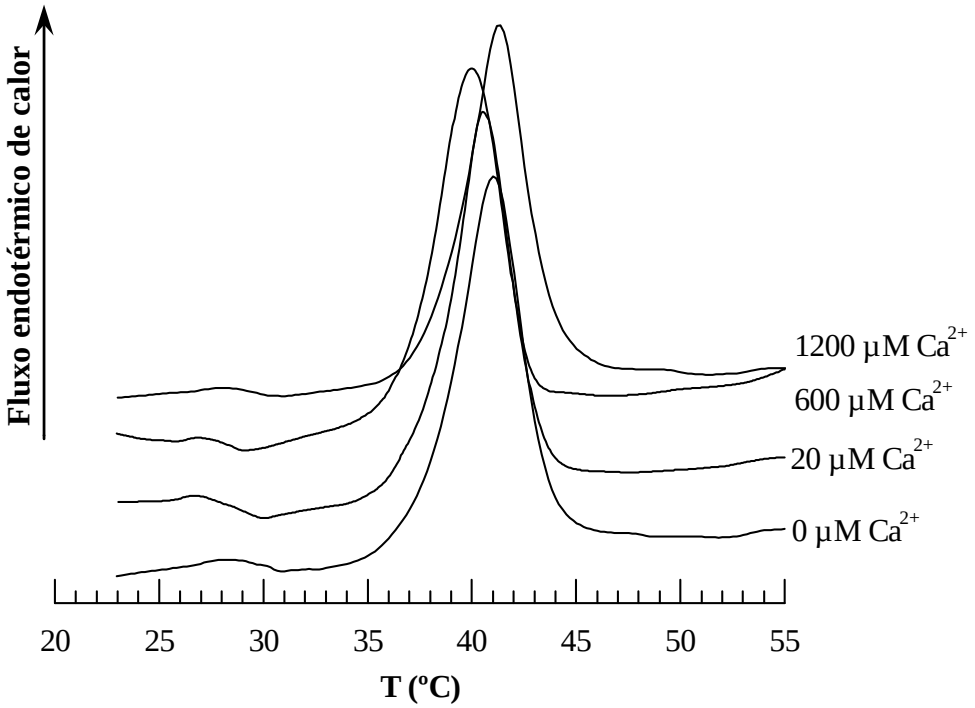


Figura 37 - Registos calorimétricos de aquecimento de dispersões lipídicas de 16:0/16:0--glicerofosfocolina contendo uma fracção de 18:0/20:4-glicerofosfoserina semelhante a cada folheto do sarcolema cardíaco simétrico (7,3%) na presença de concentrações significativas de Ca^{2+}, a pH 5,5.

Quando se aumentou a concentração de H^+ (pH 5,5) detectou-se uma transição principal semelhante e adicionalmente uma outra transição mais pequena, centrada a cerca de 28 ºC (Figura 37). Este comportamento termotrópico não é aparentemente afectado pela presença de Ca^{2+} até 1200 µM. Estes resultados sugerem que os iões H^+

induzem uma separação endotérmica de fases, com composições diferentes de SAPS, no plano da membrana. Considerando que a protonação da fosfatidilserina tem início para valores de pH próximos de 5,5, é possível que a segregação da SAPS em diferentes domínios tenha origem no aparecimento de moléculas de SAPS protonadas, que deverão interagir de maneira diferente com as outras moléculas e sofrer um rearranjo lateral.

3.2.3 – Misturas ternárias

3.2.3.1 - Lipossomas representativos do folheto citoplasmático do sarcolema assimétrico

Os registos calorimétricos de aquecimento de misturas com uma composição fosfolipídica representativa do folheto citoplasmático do sarcolema cardíaco assimétrico, isto é, 53,3% de DPPC, 33,7% de SAPE e 13,0% de SAPS a pH 7,4, na presença de concentrações crescentes de Ca^{2+} estão representados na Figura 38.

Na ausência de Ca^{2+}, a mistura apresenta uma única transição de fase endotérmica com um pico centrado a 30 ºC. A transição ocorre ao longo de um vasto intervalo de temperatura, cerca de 11 ºC, terminando próximo da temperatura fisiológica, 37 ºC. O pico apresenta um elevado grau de simetria, apesar de ser mais rombo do que as transições dos fosfolípidos puros ou mesmo das dispersões binárias de 16:0/16:0--glicerofosfocolina contendo fosfatidilserina. A separação lateral em domínios lipídicos distintos ou imiscibilidade dos constituintes fosfolipídicos não é detectada nesta mistura ternária. Adicionalmente, a entalpia da transição é apenas de 1,7 kcal/mol, consideravelmente menor do que a das transições principais dos fosfolípidos puros ou mesmo das misturas binárias contendo fosfatidilserinas. De facto, este valor de entalpia é semelhante ao das misturas binárias DPPC e SAPE.

Na presença de concentrações de Ca^{2+}, de 20 a 1200 µM, o comportamento termotrópico da mistura em estudo não é perturbado, dado que se detecta uma única transição, semelhante à que foi descrita na ausência de Ca^{2+}(Figura 38). Estes resultados mostram que misturas ternárias representativas do sarcolema assimétrico não são significativamente influenciadas pelo Ca^{+2} na gama de concentrações fisiologicamente relevantes.

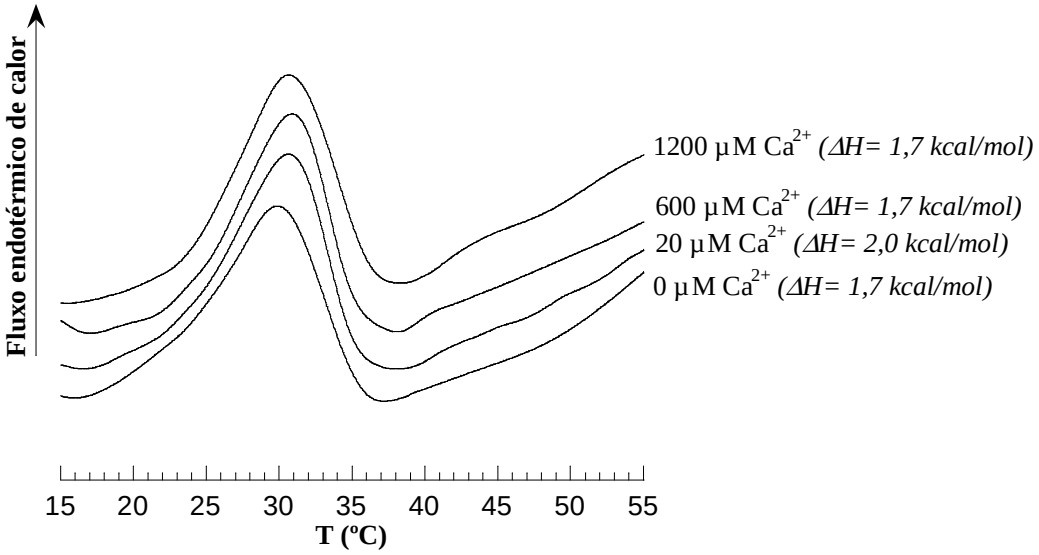


Figura 38 - Registos calorimétricos de aquecimento de dispersões lipídicas representativas do folheto interno do sarcolema cardíaco assimétrico, na presença de concentrações significativas de Ca^{2+}, a pH 7,4.

A polarização de fluorescência do DPH em função da temperatura, das dispersões lipídicas representativas do folheto interno assimétrico está representada na Figura 39. O grau de polarização da sonda é muito elevado ($P > 0,35$) para temperaturas inferiores a 25 ºC, típico de organizações lamelares em fases sólidas (Videira *et al.*, 1996), decrescendo com o aumento da temperatura. Adicionalmente, a fluidez decresce significativamente num intervalo de temperatura coincidente com a transição endotérmica registada por calorimetria. Este comportamento indica que a transição observada para a mistura ocorre entre as fases lamelares gel e líquida-cristalina. A transição ocorre ao longo de um vasto intervalo de temperatura onde deverão coexistir ambos os estados físicos (ou fases) envolvidos. Aparentemente, o Ca^{2+} não induz qualquer alteração no grau de fluídez das membranas quer na fase sólida quer na fase fluída, nem altera a temperatura média da transição.

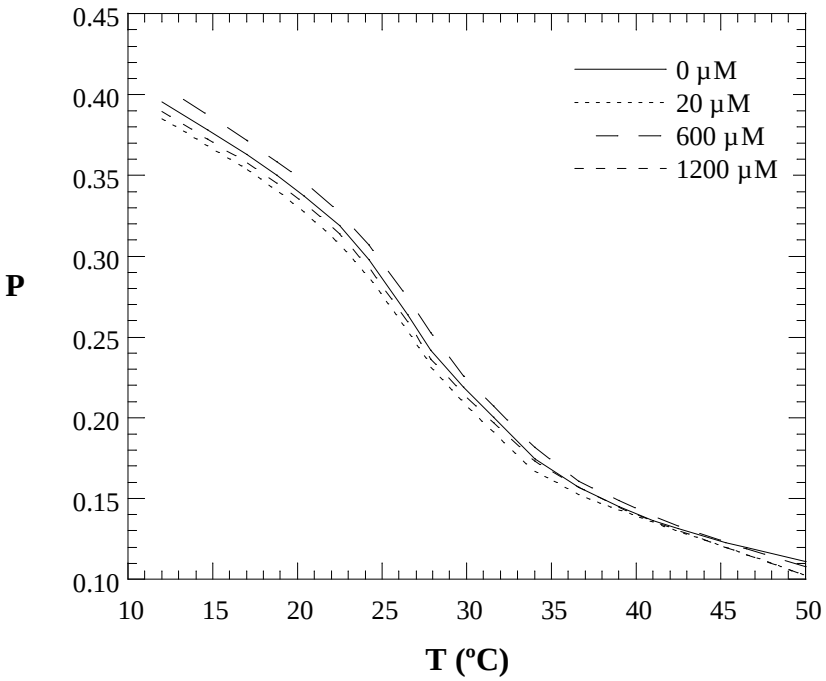


Figura 39 - Polarização de fluorescência do DPH em função da temperatura de dispersões lipídicas representativas do folheto interno do sarcolema cardíaco assimétrico, na presença de concentrações significativas de Ca^{2+}, a pH 7,4.

De maneira semelhante, o aumento da concentração de H^+ também não induz qualquer alteração do perfil termotrópico da mistura nem na miscibilidade dos seus constituintes, como mostram os resultados para pH 6,5 (Figura 40) e pH 5,5 (Figura 41).

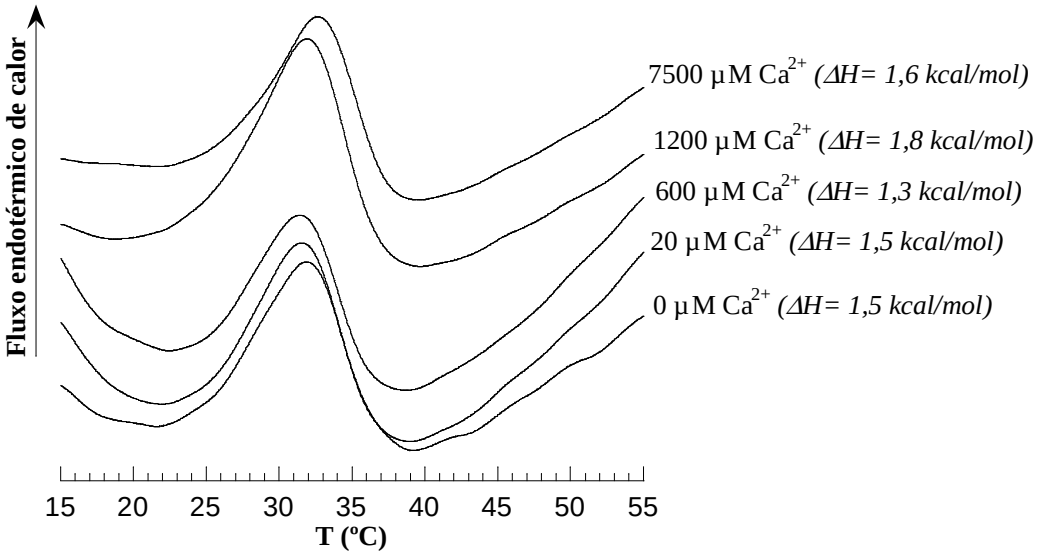


Figura 40 - Registos calorimétricos de aquecimento de dispersões lipídicas representativas do folheto interno do sarcolema cardíaco assimétrico, na presença de concentrações significativas de Ca^{2+}, a pH 6,5.

Em misturas binárias de DPPC contendo 33,7% de SAPE, o Ca^{2+} e a redução do pH promovem e/ou acentuam a separação lateral de domínios, como mostrado anteriormente. Adicionalmente, o Ca^{2+} também é normalmente indicado como indutor da separação lateral de domínios lipídicos em misturas contendo fosfolípidos aniónicos, nomeadamente fosfatidilserina (Haverstick e Glaser, 1987; van Dijck *et al.*, 1978). Em misturas contendo os dois aminofosfolípidos (serina e etanolamina), a segregação lateral da fosfatidilserina promove a formação de estruturas não-lamelares formadas essencialmente pela fosfatidiletanolamina (Hope e Cullis, 1979; Tilcock e Cullis, 1981). No entanto, e apesar da sua complexidade, as dispersões representativas do folheto interno do sarcolema assimétrico apresentam uma única transição, muito estável e reprodutível. Os constituintes fosfolipídicos da mistura conservam a sua miscibilidade mesmo para condições extremas de pH 5,5 e 7,5 mM de Ca^{2+} (Figura 41).

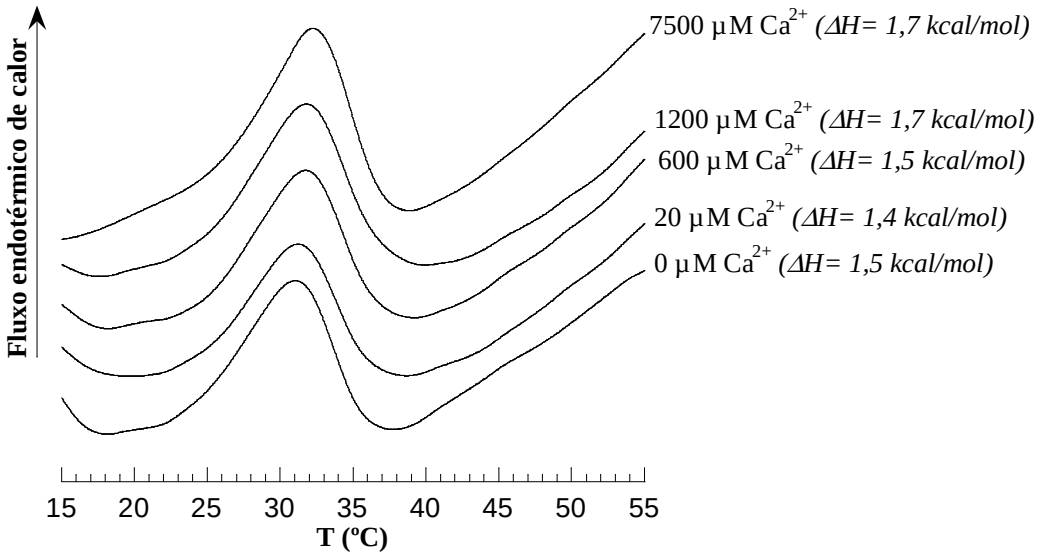


Figura 41 - Registos calorimétricos de aquecimento de dispersões lipídicas representativas do folheto interno do sarcolema cardíaco assimétrico, na presença de concentrações significativas de Ca^{2+}, a pH 5,5.

3.2.3.2 - Lipossomas representativos do sarcolema simétrico

Na Figura 42 está representado o comportamento termotrópico de misturas fosfolipídicas representativas do sarcolema total (67,2% de DPPC, 25,5% SAPE e 7,3% de SAPS), em concentrações crescentes de Ca^{2+} e pH 7,4. Estas fracções lipídicas correspondem à composição de cada folheto do sarcolema em condições de perda de assimetria lipídica.

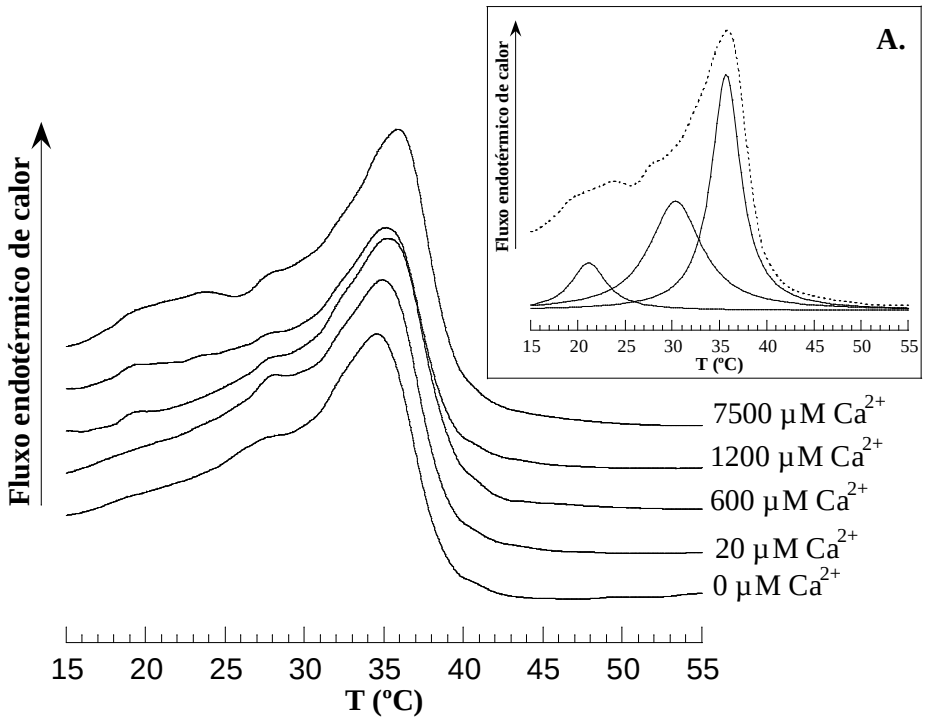


Figura 42 - Registos calorimétricos de aquecimento de dispersões lipídicas representativas do sarcolema cardíaco simétrico, na presença de concentrações significativas de Ca^{2+}, a pH 7,4.
A. O processamento e análise do registo calorimétrico a 7500 µM de Ca^{2+}, através do ajuste de funções não-lineares com o programa OriginLab OriginPro 8, permitiram resolver o sinal nos seus picos constituintes.

Na ausência de Ca^{2+}, a dispersão lipídica apresenta um pico principal centrado a 35 ºC, correspondendo a uma transição de maior entalpia, de onde emerge, no seu traçado ascendente, um outro pico menor sob a forma de ombro, com um máximo a 28 ºC, sugerindo a existência de duas transições sobrepostas. A existência de dois picos deverá resultar da presença de dois domínios lipídicos distintos, com composição fosfolipídicas diferentes. A transição principal, aparentemente mais afilada, apresenta o

pico a temperatura mais próxima da transição principal da fosfatidilcolina pura do que a transição observada nas dispersões representativas do folheto interno do sarcolema assimétrico. A presença da transição de menor entalpia, entre a transição principal e as transições dos aminifosfolípidos puros, sugere que o pico menor corresponde à transição de um domínio lipídico mais rico em aminofosfolípidos.

Concentrações crescentes de Ca^{2+}, entre 20 e 7500 µM, não afectam o perfil termotrópico das transições descritas, contudo emerge um novo pico com um máximo a cerca de 20 ºC (Figura 42). A intensidade desta nova transição aumenta com o aumento da concentração de Ca^{2+}.

Para concentrações superiores de H^{+}, quer a pH 6,5 (Figura 43) quer a pH 5,5 (Figura 44), a mistura apresenta um comportamento idêntico ao que foi descrito anteriormente para pH 7,4, quer na ausência quer para cada uma das concentrações de Ca^{2+} estudadas. Os resultados indicam que o decréscimo do pH até 5,5 não influencia o comportamento termotrópico desta mistura. Pelo contrário, o aumento da concentração de Ca^{2+} acentua a segregação dos lípidos constituintes da mistura em domínios distintos, que se traduzem pelo aparecimento de uma nova transição, correspondendo a domínios lipídicos mais ricos em aminofosfolípidos.

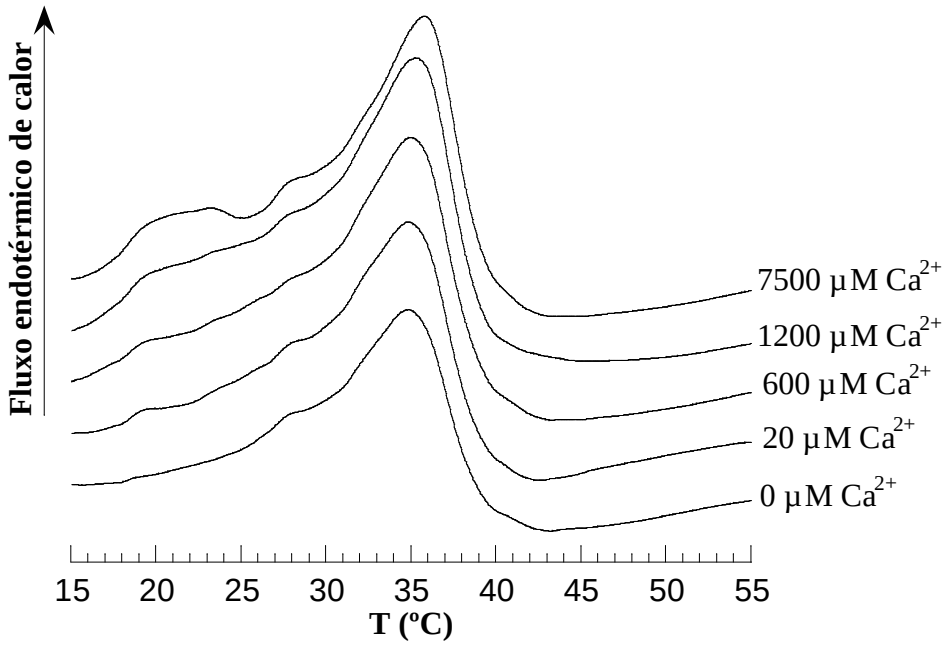


Figura 43 - Registos calorimétricos de aquecimento de dispersões lipídicas representativas do sarcolema cardíaco simétrico, na presença de concentrações significativas de Ca^{2+}, a pH 6,5.

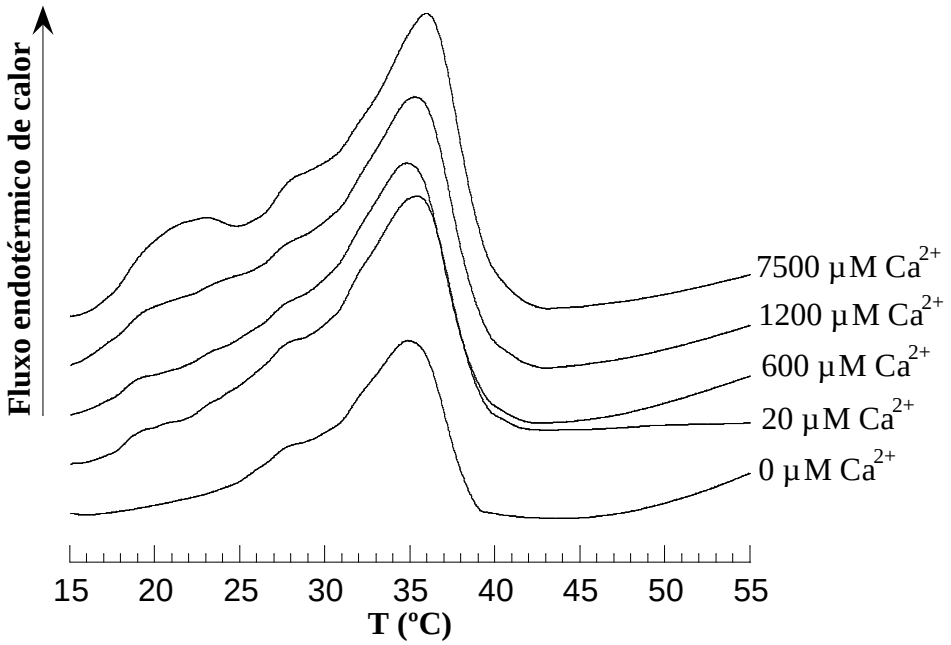


Figura 44 - Registos calorimétricos de aquecimento de dispersões lipídicas representativas do sarcolema cardíaco simétrico, na presença de concentrações significativas de Ca^{2+}, a pH 5,5.

Dos comportamentos termotrópicos de ambas as misturas ternárias na ausência de Ca^{2+}, a pH 7,4, constata-se que as dispersões representativas do folheto interno do sarcolema assimétrico têm apenas uma transição entre fases lamelares, enquanto que as dispersões representativas do sarcolema simétrico apresentam duas transições distintas. Assim, a perda de assimetria deverá traduzir-se num decréscimo significativo da miscibilidade dos fosfolipídicos do sarcolema. É interessante sublinhar que nas misturas representativas do folheto citoplasmático assimétrico a fracção molar de ambos os aminofosfolípidos é maior, mas não se detectam evidências de imiscibilidade ou de segregação lateral das espécies lipídicas em diferentes domínios.

De acordo com os estudos realizados por Virtanen *et al.* (1998), com membranas de eritrócitos, os fosfolípidos de uma monocamada, com uma constituição semelhante ao folheto interno do sarcolema cardíaco, tendem a adoptar uma distribuição lateral regular de simetria hexagonal. Num arranjo regular de simetria hexagonal, as restrições geométricas e as interacções repulsivas mútuas entre fosfolípidos são muito reduzidas, pelo que estes arranjos regulares correspondem a estados de energia mínima com uma tensão de empacotamento mínima. A monocamada interna do sarcolema com uma composição percentual relativa de 53,3:33,7:13,0 de DPPC:SAPE:SAPS é bastante semelhante a uma composição ideal de misturas ternárias (55,6:33,3:11,1) que adoptam

preferencialmente um arranjo regular de simetria hexagonal. Assim, é possível que as misturas fosfolipídicas representativas do folheto interno do sarcolema assimétrico adoptem uma distribuição regular no plano da membrana, a qual é responsável pela miscibilidade dos constituintes fosfolipídicos. Portanto, não admira que nestas misturas se tenha detectado uma única transição entre fases lamelares.

A simulação da perda de assimetria dos fosfolípidos do sarcolema traduze-se em dispersões lipídicas com uma composição percentual relativa de 67,2:25,5:7,3 de DPPC:SAPE:SAPS que se afasta das composições ideais previstas para as misturas ternárias com arranjo regular de simetria hexagonal (Somerharju *et al.*, 1999; Virtanen *et al.*, 1998). Portanto, nas fracções fosfolipídicas das dispersões representativas do sarcolema simétrico, as diferenças geométricas e as interacções repulsivas das classes constituintes da mistura não se complementam nem se compensam num arranjo lateral regular, devido ao estresse no empacotamento dos fosfolípidos. A fim de aliviar esse estresse, maximizando a interacção entre os constituintes fosfolipídicos, formam-se domínios lipídicos distintos com composições diferentes, reflectidas no comportamento termotrópico com várias transições.

A presença Ca^{2+} em concentrações fisiologicamente significativas não afecta o perfil termotrópico das dispersões representativas do folheto interno do sarcolema assimétrico, pelo que a miscibilidade dos constiuintes da mistura não deverá ser alterada pela acção do Ca^{2+}. Note-se que em dispersões binárias de DPPC contendo apenas uma fracção semelhante da espécie de fosfatidiletanolamina (33,7%), o Ca^{2+} induz e/ou acentua a separação lateral de fases, contudo a presença de 13,0% de 18:0/20:4-glicerofosfoserina é suficiente para garantir a miscibilidade dos constituintes na mistura ternária.

De acordo com os estudos realizados por Tilcock e Cullis (1981) em misturas binárias de fosfatidiletanolamina e fosfatidilserina, a estrutura lamelar das dispersões lipídicas era estabilizada se pelo menos 15% da mistura fosse constituída por fosfatidilserina. A capacidade do Ca^{2+} para induzir a segregação da fosfatidilserina, com sequente formação de estruturas não-lamelares, estava largamente dependente do grau de insaturação da fosfatidilserina e da concentração salina, pelo que espécies mais insaturadas e/ou maior concentração salina requeriam uma maior concentração do catião divalente para induzir a segregação lateral lipídica.

O comportamento termotrópico das dispersões representativas do folheto interno do sarcolema assimétrico é também insensível à acidificação do meio até pH 5,5. É

interessante notar que o mesmo foi também observado não só para a mistura binária contendo 13% da espécie de fosfatidilserina, e que apresenta uma única transição de fases, mas também para as dispersões binárias e ternárias contendo uma fracção de fosfatidiletanolamina semelhante ao sarcolema simétrico, as quais se caracterizam por uma miscibilidade limitada dos constituintes. Somente as misturas binárias contendo 33,7% de fosfatidiletanolamina apresentam características termodinâmicas e miscibilidade susceptíveis às alterações de pH estudadas. De acordo os estudos de Tilcock e Cullis (1981), as dispersões de fosfatidiletanolamina contendo 15% de fosfatidilserina a 30 ºC, originam estruturas não-lamelares para valores de pH inferiores a 5,5. Para misturas equimolares a transição só ocorria quando o pH era inferior a 4,0.

A aparente organização supramolecular de misturas lipídicas com uma composição semelhante ao folheto interno do sarcolema deverá resultar da proporção relativa das classes fosfolipídicas e também da cadeias hidrocarbonadas dos seus ácidos gordos dentro de cada classe. No sentido de avaliar a influência de cada um destes factores foram realizados estudos calorimétricos adicionais em misturas ternárias com fracções representativas do folheto interno do sarcolema assimétrico (Figura 45) e simétrico (Figura 46), mas em que as cadeias hidrocarbonadas de todos fosfolípidos são constituídas exclusivamente por ácido palmítico.

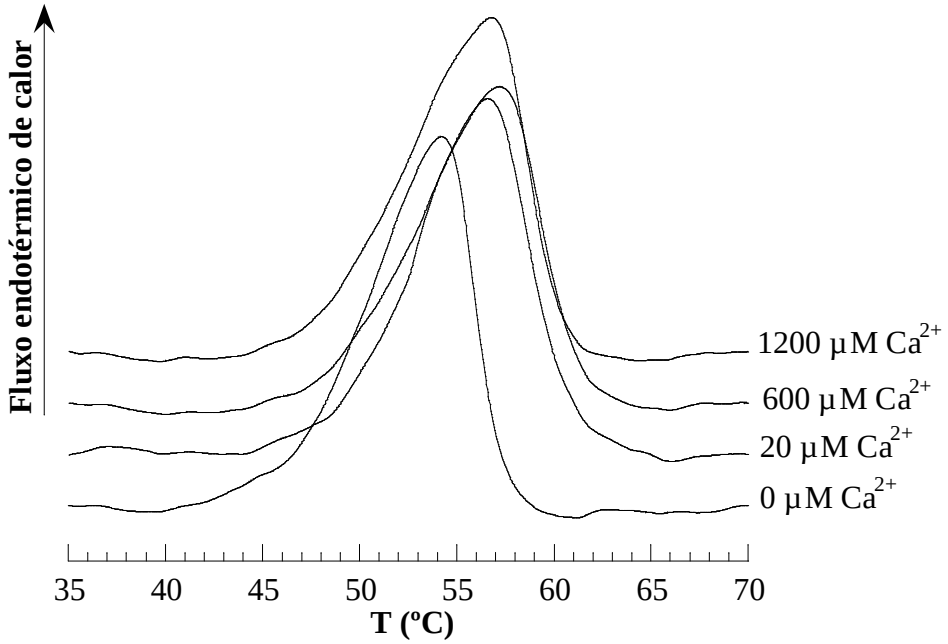


Figura 45 - Registos calorimétricos de aquecimento de dispersões lipídicas constituídas por espécies derivadas exclusivamente de ácido palmítico, cujas fracções eram representativas do folheto interno do sarcolema cardíaco assimétrico, na presença de concentrações significativas de Ca^{2+}, a pH 6,5.

Enquanto que as dispersões com fracções representativas do folheto assimétrico apresentam apenas uma única transição (Figura 45), as fracções representativas do sarcolema simétrico apresentam várias transições, correspondentes a domínios lipídicos distintos (Figura 46).

As misturas com lípidos saturados em proporções do sarcolema assimétrico apresentam apenas uma transição com máximo a 54 ºC, o qual se desvia pronunciadamente para temperaturas superiores com o aumento da concentração do cálcio (Figura 45). Estes resultados sugerem uma interação do cálcio com os aminofosfolípidos que estabiliza a fase sólida da mistura. No entanto, as misturas correspondentes com os aminofosfolípidos insaturados também apresentam uma só transição, mas o cálcio não altera a temperatura da transição, reflectindo a importância das insaturações dos aminofosfolípidos na interação do cálcio com a membrana, como descrito por outros (Tilcock e Cullis, 1981).

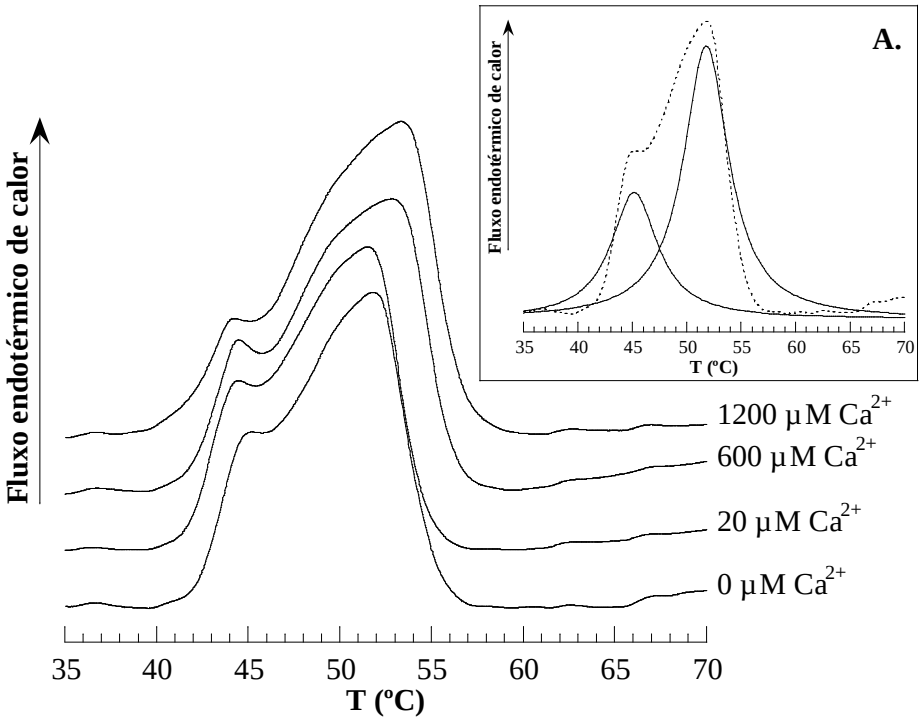


Figura 46 - Registos calorimétricos de aquecimento de dispersões lipídicas constituídas por espécies derivadas exclusivamente de ácido palmítico, cujas fracções eram representativas do sarcolema cardíaco simétrico, na presença de concentrações significativas de Ca^{2+}, a pH 6,5.
A. O processamento e análise do registo calorimétrico na ausência de Ca^{2+}, através do ajuste de funções não-lineares com o programa OriginLab OriginPro 8, permitiram resolver o sinal nos seus picos constituintes.

As misturas com lípidos saturados em proporções do sarcolema simétrico apresentam uma transição principal com máximo a 52 ºC e uma transição adicional a 45 ºC, evidenciando imiscibilidade dos componentes. O aumento da concentração de cálcio acentua a heterogeneidade no plano da membrana dado que pico a 45 ºC torna-se mais evidente (Figura 46).

De maneira semelhante ao que foi descrito nas misturas ternárias com aminofosfolípidos insaturados, a imiscibilidade em misturas com lípidos saturados também só se detecta nas proporções do sarcolema simétrico. Os resultados apresentados indicam que o comportamento termodinâmico da fracção fosfolipídica da monocamada citoplasmática do sarcolema estão defenidas pelas espécies fosfolipídicas constituintes. Contudo, a miscibilidade dos fosfolípidos constituintes está apenas dependente da composição em termos de classes fosfolipídicas, sendo aparentemente independente das espécies constituintes de cada classe.

Estes resultados estão em conformidade com o modelo de Somerharju *et al.* (1999) para a distribuição lateral das classes fosfolipídicas em cada um dos folhetos da membrana, apoiando a ideia de que os fosfolípidos do folheto interno do sarcolema devem adoptar preferencialmente uma distribuição lateral regular, a qual justifica a sua miscibilidade e a estabilidade da estrutura lamelar por eles formada, em condições fisiológicas.

Capítulo 4 Conclusões

O sarcolema constitui uma barreira semi-permeável que contém bombas, trocadores e canais, que controlam os fluxos iónicos envolvidos na associação excitação-contracção. Ao sarcolema é também atribuída a acumulação de Ca^{2+}, maioritariamente ligado aos fosfolípidos aniónicos (Post e Langer, 1992b), os quais se encontram localizados exclusivamente no folheto interno da membrana (Post *et al.*, 1988a). O armazenamento de Ca^{2+} deverá ser significativo na fenda diádica, onde a sua concentração poderá atingir 600 µM durante o ciclo contractivo (Peskoff *et al.*, 1992). De facto, de acordo com os resultados aqui apresentados, a estrutura lamelar formada pelos fosfolípidos representativos do folheto interno do sarcolema assimétrico pode interagir com concentrações elevadas de Ca^{2+}, até pelo menos 1,2 mM Ca^{2+}, sem que a sua integridade e as propriedades termotrópicas sejam aparentemente alteradas.

Contudo, o armazenamento de Ca^{2+} deverá ser uma função específica de algumas membranas como o sarcolema, cuja constituição está adaptada às funções celulares. Por exemplo, uma membrana com um folheto citoplasmático de constituição fosfolipídica semelhante à dos eritrócitos humanos não seria adequada para tal função, devido à sua susceptibilidade ao Ca^{2+}, que altera as suas propriedades, pondo em questão a integridade da sua estrutura lamelar (Hope e Cullis, 1979).

Vários acontecimentos envolvendo directa ou indirectamente o sarcolema têm sido associados à condição patológica de isquemia cardíaca. É o caso do esgotamento de ATP (Post *et al.*, 1993), da redistribuição do Ca^{2+} intracelular, da acidose, da redistribuição lateral e agregação das proteínas transmembranares (Post *et al.*, 1985; Post *et al.*, 1988b) e da extrusão de lípidos do sarcolema, sob a forma de vesículas multilamelares grandes (Post *et al.*, 1988b). Em condições de isquemia prolongada estes eventos resultam na morte celular, marcada pela perda dos constituintes intracelulares que ocorre quando o sarcolema perde a sua integridade, provocando danos irreversíveis no miocárdio.

O presente estudo sugere que o folheto citoplasmático só poderá ser susceptível à influência do Ca^{2+} depois da assimetria lipídica do sarcolema ser perdida, permitindo assim propor uma sequência para os eventos que conduzem à perda de integridade da bicamada lipídica na condição patológica de isquemia/reperfusão. Assim, em primeiro lugar deverá ocorrer o esgotamento da energia necessária para as translocases manterem a composição lipídica de cada folheto do sarcolema, resultando na perda da assimetria lipídica. A alteração da composição fosfolipídica de cada uma das monocamadas do

sarcolema deverá originar um aumento do estresse no empacotamento lipídico, levando à segregação lateral dos constituintes em domínios distintos, com composições diferentes. A acidose intracelular associada à isquemia deverá ter uma influência importante, promovendo a segregação lipídica. O subsequente refluxo de Ca^{2+}, que ocorre durante a reperfusão, deverá induzir um aumento extensivo da segregação lipídica, nomeadamente pela agregação das espécies de fosfatidilserina, permitindo que a fosfatidiletanolamina adopte uma estrutura não-lamelar. Finalmente, isto deverá resultar na extrusão de material lipídico da membrana, com perda de integridade do sarcolema, e consequente libertação do conteúdo celular, que marca a morte da célula. De facto segundo os estudos realizados por Maulik *et al*. (1998) em cardiomiócitos, a redistribuição de fosfatidiletanolamina e fosfatidilserina no sarcolema ocorre após 20 minutos de isquemia, pelo que para períodos de isquemia inferiores deverá ser possível evitar a indução de danos irreversíveis no miocárdio, através da reperfusão, com reatamento do fluxo de Ca^{2+} essencial à função contráctil.

No sarcolema, bem como na maioria das membranas biológicas, a estrutura lamelar é garantida basicamente pelas espécies de fosfatidilcolina, que normalmente constituem a classe mais abundante. Contudo, as espécies de fosfatidilserina, localizadas exclusivamente no folheto citoplasmático e as menos abundantes, devem também ter um papel importante nesse sentido, principalmente quando estão envolvidos catiões que interagem com a membrana, como é o caso do Ca^{2+}e do H^{+}. A fosfatidilserina, devido à sua carga efectiva negativa, é capaz de interagir fortemente com os catiões, pelo que a sua fracção na membrana terá de ser suficiente para garantir a estabilidade da estrutura lamelar em condições fisiológicas.

Note-se que as dispersões binárias estudadas contendo as espécies de fosfatidilcolina e fosfatidilserina apresentam uma estrutura lamelar estável, independente das concentrações de Ca^{2+} e H^{+}. Assim, se a monocamada interna do sarcolema fosse isenta de espécies de fosfatidiletanolamina, as suas propriedades físico-químicas seriam, aparentemente, insensíveis às flutuações fisiológicas e patológicas de Ca^{2+} e H^{+}. O seu carácter dinâmico estaria limitado e a estabilidade incondicional não é adequada à modulação das actividades biológicas.

Por outro lado, as dispersões binárias contendo a espécie de fosfatidiletanolamina, numa fracção representativa do folheto interno do sarcolema assimétrico, são susceptíveis a concentrações micromolares de Ca^{2+} e H^{+}. As espécies de

fosfatidiletanolamina, localizadas maioritariamente no folheto interno, tendem a formar estruturas não-lamelares, pelo que a fosfatidiletanolamina deverá constituir uma ponte para a instabilidade da bicamada. Assim, a fosfatidiletanolamina deverá ser o constituinte fosfolipídico que confere a cada folheto, e à membrana como um todo, o carácter dinâmico.

Curiosamente, a constituição fosfolipídica do folheto externo do sarcolema assimétrico está restringida a fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina. No entanto, neste caso o colesterol e a esfingomielina deverão contribuir significativamente para o alívio da tensão de empacotamento nessa monocamada (Somerharju *et al.*, 2009; Virtanen *et al.*, 1995).

Também o grau de insaturação das cadeias acil das espécies de fosfatidilserina e fosfatidiletanolamina deverá ser muito importante. As misturas ternárias representativas do folheto interno do sarcolema, com uma cadeia de ácido araquidónico nas espécies aminadas, estão no estado fluído à temperatura fisiológica, mas suficientemente próximas da transição de fase de modo a garantirem condições de dinâmica funcional. Segundo os estudos de Cannon *et al.* (2003) a actividade máxima de canais de Ca^{2+} de miócitos cardíacos, reconstituídos em bicamadas fosfolipídicas, coincide com o termo da transição de fase lipídica.

No sarcolema de ratos recém-nascidos o ácido gordo constituinte mais abundante é o ácido araquidónico, com 4 insaturações e no estado adulto, o grau de insaturação acentua-se com o domínio do ácido docosa-hexaenóico, com 6 insaturações.

Por outro lado, as classes fosfolipídicas constituintes das membranas biológicas, coexistem em cada um dos folhetos em fracções críticas como aquelas descritas anteriormente (Tabela V) para os eritrócitos e o sarcolema. Sob estas fracções críticas os constituintes fosfolipídicos devem adoptar preferencialmente uma distribuição lateral regular, em cada um dos folhetos. Esta distribuição deverá conferir à membrana características termodinâmicas próprias, que lhe permitem assegurar as funções na célula a que pertencem, como a modulação da actividade proteica, a regulação da composição lipídica e a manutenção da assimetria lipídica.

Referências

Anderson K., Lai F.A., Liu Q.-Y., Rousseau E., Erickson H.P. e Meissner G., (1989). Structural and Functional Characterization of the Purified Cardiac Ryanodine Receptor-Ca^{2+} Release Channel Complex. *The Journal of Biological Chemistry* 264: 1329-1335.

Ashley R.H. e Williams A.J., (1990). Divalent Cation Activation and Inhibition of Single Calcium Release Channels from Sheep Cardiac Sarcoplasmic Reticulum. *Journal of General Physiology* 95: 981-1005.

Bartlett G.R., (1959). Phosphorus Assay in Column Chromatography. *The Journal of Biological Chemistry* 234: 466-468.

Bastiaanse E.M.L., Atsma D.E., Kuijpers M.M.C. e van der Laarse A., (1994). The Effect of Sarcolemmal Cholesterol Content on Intracellular Calcium Ion Concentration in Cultured Cardiomyocytes. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 313: 58-63.

Bean B.P., (1989). Classes of Calcium Channels in Vertebrate Cells. *Annual Review of Physiology* 51: 367-384.

Bester R. e Lochner A., (1988). Sarcolemmal Phospholipid Fatty Acid Composition and Permeability. *Biochimica et Biophysica Acta* 941: 176-186.

Bligh E.G. e Dyer W.J., (1959). A Rapid Method of Total Lipid Extraction and Purification. *Canadian Journal of Biochemical Physiology* 37: 911-917.

Blume A. e Ackermann T., (1974). A Calorimetric Study of the Lipid Phase Transitions in Aqueous Dispersions of Phosphorylcholine-Phosphorylethanolamine Mixtures. *FEBS Letters* 43: 71-74.

Caffrey M., (1993). *Lipid Thermotropic Phase Transitions. NIST Standard Reference Database 34*. 2.0. National Institute of Standards and Technology.

Callewaert G., (1992). Excitation-Contraction Coupling in Mammalian Cardiac Cells. *Cardiovascular Research* 26: 923-932.

Cannon B., Hermansson M., Gyorke S., Somerharju P., Virtanen J.A. e Cheng K.H., (2003). Regulation of Calcium Channel Activity by Lipid Domain Formation in Planar Lipid Bilayers. *Biophysical Journal* 85: 933-942.

Cevc G., Watts A. e Marsh D., (1981). Titration of the Phase Transition of Phosphatidylserine Bilayer Membranes. Effect of pH, Surface Electrotastics, Ion Biding, and Head-Group Hydration. *Biochemistry* 20: 4955-4965.

Cheng K.H., Ruonala M., Virtanen J. e Somerharju P., (1997). Evidence For Superlattice Arrangements In Fluid Phosphatidylcholine/Phosphatidyl-ethanolamine Bilayers. *Biophysical Journal* 73: 1967-1976.

Cleemann L. e Morad M., (1991). Role of Ca^{2+} Channel in Cardiac Excitation-Contraction Coupling in the Rat: Evidence from Ca^{2+} Trasients and Contraction. *Journal of Physiology (London)* 432: 283-312.

Comfurius P., Bevers E.M. e Zwaal F.A., (1990). Enzymatic Synthesis of Phosphatidylserine on Small Scale by Use of a One-Phase System. *Journal of Lipid Research* 31: 1719-1721.

Comfurius P. e Zwaal R.F.A., (1977). The enzymatic synthesis of phosphatidylserine and purification by CM-cellulose column chromatography. *Biochimica et Biophysica Acta* 488: 36-42.

Courchinoux R., Chanh N.B. e Haget Y., (1988). Use of the "Shape Factors" As an Empirical Method to Determine the Actual Characteristic Temperatures of Binary Phase Diagrams By Differential Scanning Calorimetry. *Termochimica Acta* 128: 45-53.

Cullis P.R. e de Kruijff B., (1979). Lipid Polymorphism and the Functional Roles of Lipids in Biological Membranes. *Biochimica et Biophysica Acta* 559: 399-420.

Cullis P.R. e de Kruiyff B., (1976). 31P NMR Studies of Unsonicated Aqueous Dispersions of Neutral and Acidic Phospholipids. Effects of Phase Transitions, p2H and Divalent Cations on the Motion in the Phosphate Region of the Polar Headgroup. *Biochimica et Biophysica Acta* 436: 523-540.

D'Arrigo P., de Ferra L., Piergianni V., Selva A., Servi S. e Strini A., (1996). Preparative Transformation of Natural Phospholipids Catalysed by Phospholipase D from Streptomyces. *Journal of the Chemical Society. Perkin Transactions* 1: 2651-2656.

Davidson F.M. e Long C., (1958). The Structure of the Naturally Occuring Phosphoglycerides. 4. Action of Cabbage-Leaf Phospholipase D on Ovolecithin and Related Substances. *Biochemical Journal* 69: 458-466.

Dawson R.M.C., (1967). The Formation of Phosphatidylglycerol and Other Phospholipids by the Transferase Activity of Phospholipase D. *Biochemical Journal* 102: 205-210.

Dawson R.M.C. e Hemington N., (1967). Some Properties of Purified Phospholipase D and Especially the Effect of Amphipatic Substances. *Biochemical Journal* 102: 76-86.

Demel R.A., Jansen J.W.C.M., van Dijck P.W.M. e van Deenen L.L.M., (1977). The Preferential Interaction of Cholesterol with Different Classes of Phospholipids. *Biochimica et Biophysica Acta* 465: 1-10.

Diaz C. e Schroit A.J., (1996). Role of Translocases in the Generation of Phosphatidylserine Asymmetry. *Journal of Membrane Biology* 151: 1-9.

du Toit E.F. e Opie L.H., (1993). Role for the Na+/H+ Exchanger in Reperfusion Stunning in Isolated Perfused Rat Heart. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 22: 877-883.

Dudda A., Spiteller G. e Kobelt F., (1996). Lipid Oxidation Products in Ischemic Porcine Heart Tissue. *Chemistry and Physics of Lipids* 82: 39-51.

Eldridge M.D.M., P A

Frenkel, D, (1993). Entropy-driven formation of a superlattice in a hard-sphere binary mixture. *Nature* 365: 35-37.

Exton J.H., (1997). Phospholipase D: Enzymology, Mechanisms of Regulation, and Function. *Physiological Reviews* 77: 303-320.

Fabiato A., (1983). Calcium-Induced Release of Calcium from the Cardiac Sarcoplasmic Reticulum. *American Journal of Physiology* 245: C1-C14.

Fisher K.A., (1976). Analysis of Membrane Halves: Cholesterol. *Proccedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 73: 173-177.

Fiske C.H. e Subbarow Y., (1925). The Colorimetric Determination of Phosphorus. *The Journal of Biological Chemistry* 66: 375-400.

Folch J., Ascoli I., Lees M., Meath J.A. e LeBaron F.N., (1951). Preparation of Lipide Extracts from Brain Tissue. *The Journal of Biological Chemistry* 191: 833-841.

Frank J.S., Mottino G., Reid D., Molday R.S. e Philipson K.D., (1992). Distribution of the Na^{+}-Ca^{2+} Exchanger Protein in Mammalian Cardiac Myocytes: An Immunofluorescence and Immunocolloidal Gold -Labeling Study. *The Journal of Cell Biology* 117: 337-345.

Garidel P., Johann C. e Blume A., (1997). Nonideal Mixing and Phase Separation in Phosphatidylcholine Phosphatidic Acid Mixtures as a Function of Acyl Chain Length and pH. *Biophysical Journal* 72: 2196-2210.

Han X. e Gross R.W., (1992). Nonmonotonic Alterations in the Fluorescence Anisotropy of Polar Head Group Labeled Fluorophores During the Lamellar to Hexagonal Phase Transition of Phospholipids. *Biophysical Journal* 63: 309-316.

Hauser H., Hinckley C.C., Krebs J., Levine B.A., Phillips M.C. e Williams R.J.P., (1977). The Interaction of Ions with Phosphatidylcholine Bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta* 468: 364-377.

Hauser H., Pascher I., Pearson R.H. e Sundell S., (1981). Preferred Conformation and Molecular Packing of Phosphatidylethanolamine and Phosphatidylcholine. *Biochimica et Biophysica Acta* 650: 21-51.

Haverstick D.M. e Glaser M., (1987). Visualization of Ca^{2+}-Induced Phospholipid Domains. *Proccedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84: 4475-4479.

Heller M., (1978). Phospholipase D. *Advances in Lipid Research* 16: 267-326.

Hilgemann D.W., Collins A. e Matsuoka S., (1992). Steady-State and Dynamic Properties of Cardiac Sodium-Calcium Exchange: Secondary Modulation by Cytoplasmic Calcium and ATP. *Journal of General Physiology* 100: 933-961.

Hille B., (1992). *Ionic Channels of Excitable Membranes*. 2. Sinauer Associates Inc.

Hirche F., Schierhorn A., Scherer G. e Ulbrich-Hofmann R., (1997). Enzymatic Introduction of N-Heterocyclic and As-Containing Head Groups into Glycerophospholipids. *Tetrahedron Letters* 38: 1369-1370.

Höhne G.H.W., Hemminger W. e Flammersheim H.-J., (1996). *Differential Scanning Calorimetry: An Introduction for Practitioners*. Springer-Verlag.

Holbrook P.G., Pannell L.K. e Daly J.W., (1991). Phospholipase D-Catalyzed Hydrolysis of Phosphatidylcholine Occurs with P-O Bond Cleavage. *Biochimica et Biophysica Acta* 1084: 155-158.

Hope M.J. e Cullis P.R., (1979). The Bilayer Stability of Inner Monolayer Lipids from the Human Erythrocyte. *FEBS Letters* 107: 323-326.

Houslay M.D. e Stanley K.K., (1982). *Dynamics of Biological Membranes*. Wiley.

Inui M., Saito A. e Fleischer S., (1987). Isolation of the Ryanodine Receptor from Cardiac Sarcoplasmic Reticulum and Identity with the Feet Structures. *The Journal of Biological Chemistry* 262: 15637-15642.

Isenberg G., Etter E.F., Wendt-Gallitelli M.-F., Schiefer A., Carrington W.A., Tuft R.A. e Fay F.S., (1996). Intrasarcomere [Ca2+] Gradients in Ventricular Myocytes

Revealed by High Speed Digital Imaging Microscopy. *Proccedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93: 5413-5418.

Jacobson K. e Papahadjopoulos D., (1975). Phase Transitions and Phase Separations in Phospholipid Membranes Induced by Changes in Temperature, pH, and Concentration of Bivalent Cations. *Biochemistry* 14: 152-161.

Janiak M.J., Small D.M. e Shipley G.G., (1976). Nature of the Thermal Pretrasition of Synthetic Phospholipids: Dimyristoyl- and Dipalmitoyllecithin. *Biochemistry* 15: 4575-4580.

Jorgensen A.O., Shen A.C.-Y., Daly P. e MacLennan D.H., (1982). Localization of Ca^{2+} + Mg^{2+}-ATPase of the Sarcoplasmic Reticulum in Adult Rat Papillary Muscle. *The Journal of Cell Biology* 93: 883-892.

Juneja L.R., Kazuoka T., Goto N., Yamane T. e Shimizu S., (1989). Conversion of Phosphatidylcholine to Phosphatidylserine by Various Phospholipases D in the Presence of L- or D-Serine. *Biochimica et Biophysica Acta* 1003: 277-283.

Juneja L.R., Kazuoka T., Yamane T. e Shimizu S., (1988). Kinetic Evaluation of Conversion of Phosphatidylcholine to Phosphatidylethanolamine by Phospholipase D from Different Sources. *Biochimica et Biophysica Acta* 960: 334-341.

Koynova R. e Caffrey M., (1994). Phases and Phase Transitions of the Hydrated Phosphatidylethanolamines. *Chemistry and Physics of Lipids* 69: 1-34.

Kuwata J.H. e Langer G.A., (1989). Rapid, Non-Perfusion-Limited Calcium Exchange in Cultured Neonatal Myocardial Cells. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 21: 1195-1208.

Lakowicz J.R., (2006). *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 3rd edition.

Langer G.A., (1994). Myocardial Calcium Compartmentation. *Trends in Cardiovascular Medicine* 4: 103-109.

Langer G.A., (1997). *The Myocardium*. 2nd ed. Academic Press.

Langer G.A., Peskoff A. e Post J.A., (1993). How Does the Na+-Ca2+ Exchanger Work in the Intact Cardiac Cell. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 25: 637-639.

Langer G.A. e Rich T.L., (1992). A discrete Na-Ca exchange-dependent Ca compartment in rat ventricular cells. *American Journal of Physiology* 262: C1149-C1153.

Langer G.A., Rich T.L. e Orner F.B., (1990). Ca Exchange Under Non-Perfusion-Limited Conditions in Rat Ventricular Cells: Identification of Subcellular Compartments. *American Journal of Physiology* 259: H592-H602.

Langer G.A., Wang S.Y. e Rich T.L., (1995). Localization of the Na/Ca Exchange-Dependent Ca Compartment in Cultured Neonatal Rat Heart Cells. *American Journal of Physiology* 268: C119-C126.

Lee A.G., (1975). Fluorescence Studies of Chlorophyll a Incorporated into Lipid Mixtures, and the Interpretation of "Phase" Diagrams. *Biochimica et Biophysica Acta* 413: 11-23.

Lentz B.R., (1993). Use of Fluorescent Probes to Monitor Molecular Order and Motions Within Liposome Bilayers. *Chemistry and Physics of Lipids* 64: 99-116.

Lentz B.R., Barenholz Y. e Thompson T.E., (1976a). Fluorescence Depolarization Studies of Phase Transitions and Fluidity in Phospholipid Bilayers. 1. Single Component Phosphatidylcholine Liposomes. *Biochemistry* 15: 4521-4528.

Lentz B.R., Barenholz Y. e Thompson T.E., (1976b). Fluorescence Depolarization Studies of Phase Transitions and Fluidity in Phospholipid Bilayers. 2. Two-Component Phosphatidylcholine Liposomes. *Biochemistry* 15: 4529-4537.

Lentz B.R. e Litman B.J., (1978). Effect of Head Group on Phospholipid Mixing in Small, Unilamellar Vesicles: Mixtures of Dimyristoylphosphatidylcholine and Dimyristoylphosphatidylethanolamine. *Biochemistry* 17: 5537-5543.

Leray C., Pelletier X., Hemmendinger S. e Cazenave J.-P., (1987). Thin-Layer Chromatography of Human Platelet Phospholipid with Fatty Acid Analysis. *Journal of Chromatography* 420: 411-416.

Levi A.J., Brooksby P. e Hancox J.C., (1993). One Hump or Two? The Triggering of Calcium Release from the Sarcoplasmic Reticulum and the Voltage Dependence of Contraction in Mammalian Cardiac Muscle. *Cardiovascular Research* 27: 1743-1757.

Lipsky S.R. e Landowne R.A., (1963). *The Identification of Fatty Acids by Gas Chromatography*. Academic Press.

Liscovitch M., (1996). Phospholipase D: Role in Signal Transduction and Membrane Traffic. *Journal of Lipid Mediators and Cell Signalling* 14: 215-221.

Litman B.J. e Barenholz Y., (1982). *Fluorescent Probe: Diphenylhexatriene*. Academic Press.

Mabrey S. e Sturtevant J.M., (1976). Investigation of Phase Transitions of Lipids and Lipid Mixtures by High Sensitivity Differential Scanning Calorimetry. *Proccedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 73: 3862-3866.

Mansfeld J. e Ulbrich-Hofmann R., (2009). Modulation of phospholipase D activity in vitro. *Biochimica et Biophysica Acta* 1791: 913-926.

Matos M.J., Post J.A., Roelofsen B. e Op den Kamp J.A.F., (1990). Composition and Organization of Sarcolemmal Fatty Acids in Cultured Neonatal Rat Cardiomyocytes. *Cell Biology International Reports* 14: 343-352.

Maulik N., Kagan V.E., Tyurin V.A. e Das D.K., (1998). Redistribution of Phosphatidylethanolamine and Phosphatidylserine Precedes Reperfusion-Induced Apoptosis. *American Journal of Physiology - Heart & Circulatory Physiology* 274: H242-H248.

McNutt N.S. e Fawcett D.W., (1974). *Myocardial Ultrastructure*. John Wiley & Sons, Inc.

Misiorowski R.L. e Wells M.A., (1974). The Activity of Phospholipase A2 in Reversed Micelles of Phosphatidylcholine in Diethyl Ether: Effect of Water and Cations. *Biochemistry* 13: 4921-4927.

Morris A.J., Engebrecht J.A. e Frohman M.A., (1996). Structure and Regulation of Phospholipase D. *Trends in Pharmacological Sciences* 17: 182-185.

Morton R.K., (1953). Transferase Activity of Hydrolytic Enzymes. *Nature* 172: 65-68.

Motulsky H. e Christopoulos A., (2003). *Fitting Models to Biological Data Using Linear and Nonlinear Regression: A Practical Guide to Curve Fitting* GraphPad Software, Inc.

Musters R.J.P., Post J.A. e Verkleij A.J., (1991). The Isolated Neonatal Rat-Cardiomyocyte Used in an *In Vitro* Model for 'Ischemia'. I. A Morphological Study. *Biochimica et Biophysica Acta* 1091: 270-277.

Nakajima J., Nakashima T., Shima Y., Fukuda H. e Yamane T., (1994). A Facile Transphosphatidylation Reaction Using a Culture Supernatant of Actinomycetes Directly as a Phospholipase D Catalyst with a Chelating Agent. *Biotechnology & Bioengineering* 44: 1193-1198.

Niebylski C.D. e Salem N., Jr., (1994). A Calorimetric Investigation of a Series of Mixed-Chain Polyunsaturated Phosphatidylcholines: Effect of sn-2 Chain Length and Degree of Unsaturation. *Biophysical Journal* 67: 2387-2393.

Niggli E. e Lipp P., (1993). Subcellular restricted spaces: significance for cell signalling and excitation-contraction coupling. *Journal of Muscle Research and Cell Motility* 14: 288-291.

Peskoff A., Post J.A. e Langer G.A., (1992). Sarcolemmal Calcium Binding Sites in Heart: II. Mathematical Model for Diffusion of Calcium Released from the Sarcoplasmic Reticulum into the Diadic Region. *Journal of Membrane Biology* 129: 59-69.

Philipson K.D., Bers D.M. e Nishimoto A.Y., (1980a). The role of Phospholipids in the Ca2+ Binding of Isolated Cardiac Sarcolemma. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 12: 1159-1173.

Philipson K.D., Bers D.M., Nishimoto A.Y. e Langer G.A., (1980b). Binding of Ca2+ and Na+ to Sarcolemmal Membranes: Relation to Control of Myocardial Contractility. *American Journal of Physiology* 238: H373-H378.

Post J.A., Clague J.R. e Langer G.A., (1993). Sarcolemmal Phospholipid Asymmetry and Ca Fluxes on Metabolic Inhibition of Neonatal Rat Heart Cells. *American Journal of Physiology* 265: H461-H468.

Post J.A. e Langer G.A., (1992a). Cellular Origin of the Rapidly Exchangeable Calcium Pool in the Cultured Neonatal Rat Heart Cell. *Cell Calcium* 13: 627-634.

Post J.A. e Langer G.A., (1992b). Sarcolemmal Calcium Binding Sites in Heart: I. Molecular Origin in “Gas-Dissected” Sarcolemma. *Journal of Membrane Biology* 129: 49-57.

Post J.A., Langer G.A., Op den Kamp J.A.F. e Verkleij A.J., (1988a). Phospholipid Asymmetry in Cardiac Sarcolemma. Analysis of Intact Cells and Gas-Dissected Membranes. *Biochimica et Biophysica Acta* 943: 256-266.

Post J.A., Leunissen-Bijvelt J., Ruigrok T.J.C. e Verkleij A.J., (1985). Ultrastructural Changes of Sarcolemma and Mitochondria in the Isolated Rabbit Heart During Ischemia and Reperfusion. *Biochimica et Biophysica Acta* 845: 119-123.

Post J.A., Ruigrok T.J.C., Lamers J.M.J., Verdouw P.D. e Verkleij A.J., (1988b). *Myocardial Cell Death and the Possible Role of Sarcolemmal Phospholipids (Based on Morphological Observations)*. Springer-Verlag.

Post J.A., Verkleij A.J. e Langer G.A., (1995). Organization and Function of Sarcolemmal Phospholipids in Control and Ischemic Reperfused Cardiomyocytes. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 27: 749-760.

Prigogine I., Nicolis G. e Babloyant A., (1972). Thermodynamics of Evolution. The Functional Order Maintened Within Living Systems to Defy the Second Law; Nonequilibrium Thermodynamics Describes How Such Systems Come to Terms with Entropy. *Physics Today* 11: 23-28.

Roberts M.F., (1996). Phospholipases - Structural and Functional Motifs for Working at an Interface. *FASEB Journal* 10: 1159-1172.

Roy M.T., Gallardo M. e Estelrich J., (1997). Bilayer Distribution of Phosphatidylserine and Phosphatidylethanolamine in Lipid Vesicles. *Bioconjugate Chemistry* 8: 941-945.

Scheidler P.J. e Steim J.M., (1975). *Differential Scanning Calorimetry of Biological Membranes: Instrumentation*. Plenum Press.

Scheuermann D.W., (1993). The Ultrastructure of Cardiac Muscle in Health and Disease. *Micron* 24: 47-73.

Schroit A.J. e Zwaal R.F.A., (1991). Transbilayer Movement of Phospholipids in Red Cell and Platelet Membranes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1071: 313-329.

Schwartz M.A. e McConnell H.M., (1978). Surface Areas of Lipid Membranes. *Biochemistry* 17: 837-840.

Seddon J.M., Cevc G. e Marsh D., (1983). Calorimetric Studies of the Gel-Fluid (L_β-L_α) and Lamellar-Inverted Hexagonal (L_α-H_{II}) Phase Transitions in Dialkyl- and Diacylphosphatidylethanolamines. *Biochemistry* 22: 1280-1289.

Shimshick E.J. e McConnell H.M., (1973). Lateral Phase Separation in Phospholipid Membranes. *Biochemistry* 12: 2351-2360.

Shinitzky M. e Barenholz Y., (1978). Fluidity Parameters of Lipid Regions Determined by Fluorescence Polarization. *Biochimica et Biophysica Acta* 515: 367-384.

Shukla S.D. e Halenda S.P., (1991). Phospholipase D in Cell Signalling and its Relationship to Phospholipase C. *Life Sciences* 48: 851-866.

Shuto S., Imamura S., Fukukawa K., Sakakibara H. e Murase J.-I., (1987a). A Facile One-Step Synthesis of Phosphatidylhomoserines by Phospholipase D-Catalyzed Transphosphatidylation. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin (Tokyo)* 35: 447-449.

Shuto S., Ueda S., Imamura S., Fukukawa K., Matsuda A. e Ueda T., (1987b). A Facile One-Step Synthesis of 5'-Phosphatidylnucleosides by an Enzymatic Two-Phase Reaction. *Tetrahedron Letters* 28: 199-202.

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

Somerharju P., Virtanen J.A. e Cheng K.H., (1999). Lateral organisation of membrane lipids. The superlattice view. *Biochimica et Biophysica Acta* 1440: 32-48.

Somerharju P., Virtanen J.A., Cheng K.H. e Hermansson M., (2009). The superlattice model of lateral organization of membranes and its implications on membrane lipid homeostasis. *Biochimica et Biophysica Acta* 1788: 12-23.

Somerharju P.J., Virtanen J.A., Eklund K.K., Vainio P. e Kinnunen P.K.J., (1985). 1-Palmitoyl-2-Pyrenedecanoyl Glycerophopholipids as Membranes Probes: Evidence for Regular Distribution in Liquid-Cristalline Phosphatidylcholine Bilayers. *Biochemistry* 24: 2773-2781.

Stern M.D., (1992). Theory of Excitation-Contraction Coupling in Cardiac Muscle. *Biophysical Journal* 63: 497-517.

Stollery J.G. e Vail W.J., (1977). Interactions of Divalent Cations or Basic Proteins with Phosphatidylethanolamine Vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta* 471: 372-390.

Sun X.-H., Protasi F., Takahashi M., Takeshima H., Ferguson D.G. e Franzini-Armstrong C., (1995). Molecular Architecture of Membranes Involved in Excitation-Contraction Coupling of Cardiac Muscle. *The Journal of Cell Biology* 129: 659-671.

Takami M., Hidaka N. e Suzuki Y., (1994). Phospholipase D-Catalyzed Synthesis of Phosphatidyl Aromatic Compounds. *Biosciences Biotechnology and Biochemistry* 58: 2140-2144.

Takami M. e Suzuki Y., (1994). Synthesis of Novel Phosphatidyldihydroxyacetone via Transphosphatidylation Reaction by Phospholipase D. *Biosciences Biotechnology and Biochemistry* 58: 2136-2139.

Testet-Lamant V., Archaimbault B., Durand J. e Rigaud M., (1992). Enzymatic Synthesis of Structural Analogs of PAF-Acether by Phospholipase D-Catalysed Transphosphatidylation. *Biochimica et Biophysica Acta* 1123: 347-350.

Tilcock C.P.S. e Cullis P.R., (1981). The Polymorphic Phase Behaviour of Mixed Phosphatidylserine-Phosphatidylethanolamine Model Sistems as Detected by ^{31}P-NMR. *Biochimica et Biophysica Acta* 641: 189-201.

Trafford A.W., Diaz M.E., O'Neill S.C. e Eisner D.A., (1995). Comparison of Subsarcolemmal and Bulk Calcium Concentration During Spontaneous Calcium

Release in Rat Ventricular Myocytes. *Journal of Physiology (London)* 488: 577-586.

Träuble H. e Eibl H., (1974). Electrotatic Effects on Lipid Phase Transitions: Membrane Structure and Ionic Environment. *Proccedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 71: 214-219.

van der Vusse G.J., van Bilsen M. e Reneman R.S., (1994). Ischemia and Reperfusion Induced Alterations in Membrane Phospholipids: An Overview. *Annals of the New York Academy of Sciences* 723: 1-14.

van Dijck P.W.M., de Kruijff B., Verkleij A.J., van Deenen L.L.M. e de Gier J., (1978). Comparative Studies on the Effects of pH and Ca2+ on Bilayers of Various Negatively Charged Phospholipids and Their Mixtures with Phosphatidylcholine. *Biochimica et Biophysica Acta* 512: 84-96.

Vecchini A., Panagia V., Caligiana P., Binaglia L. e Dhalla N.S., (1997). Molecular Species Composition of Sarcolemmal Membrane Phospholipids in Streptozotocin-Diabetic Rats. *Chemistry and Physics of Lipids* 88: 134.

Vemuri R. e Philipson K.D., (1987). Phospholipid Composition Modulates the Na+-Ca2+ Exchange Activity of Cardiac Sarcolemma in Reconstituted Vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta* 937: 258-268.

Vemuri R. e Philipson K.D., (1989). Influence of Sterols and Phospholipids on Sarcolemmal and Sarcoplasmic Reticular Cation Transporters. *The Journal of Biological Chemistry* 264: 8680-8685.

Vemuri R. e Philipson K.D., (1990). Influence of Phospholipid Fatty Acyl Composition on Sarcolemmal and Sarcoplasmic Reticular Cation Transporters. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 168: 917-922.

Verkleij A.J., Zwaal R.F.A., Roelofsen B., Comfurius P., Kastelijn D. e van Deenen L.L.M., (1973). The Asymmetric Distribution of Phospholipids in the Human Red Cell Membrane. A Combined Study Using Phospholipases and Freeze-Etch Electron Microscopy. *Biochimica et Biophysica Acta* 323: 178-193.

Videira R.A., Antunes-Madeira M.C. e Madeira V.M.C., (1996). Interaction of ethylazinphos with the physical organization of model and native membranes *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* 1281: 65-72.

Videira R.A., Antunes-Madeira M.C. e Madeira V.M.C., (1999). Biophysical Perturbations Induced by Ethylazinphos in Lipid Membranes. *Chemistry and Physics of Lipids* 97: 139-153.

Virtanen J.A., Cheng K.H. e Somerharju P., (1998). Phospholipid Composition of the Mammalian Red Cell Membrane Can be Rationalized by a Superlattice Model. *Proccedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 4964-4969.

Virtanen J.A., Ruonala M., Vauhkonen M. e Somerharju P., (1995). Lateral Organization of Liquid-Crystalline Cholesterol-Dimyristoylphosphatidylcholine Bilayers. Evidence for Domains with Hexagonal and Centered Rectangular Cholesterol Superlattices. *Biochemistry* 34: 11568-11581.

Weglicki W.B., Owens K., Kennett F.F., Kessner A., Harris L. e Wise R.M., (1980). Preparation and Properties of Highly Enriched Cardiac Sarcolemma from Isolated Adult Myocytes. *The Journal of Biological Chemistry* 255: 3605-3609.

Wier W.G., Cannell M.B., Berlin J.R., Marban E. e Lederer W.J., (1987). Cellular and Subcellular Heterogeneity of [Ca2+]i in Single Heart Cells Revealed by Fura-2. *Science* 235: 325-327.

Yang S.F., Freer S. e Benson A.A., (1967). Transphosphatidylation by Phospholipase D. *The Journal of Biological Chemistry* 242: 477-484.

Yu C.-H., Liu S.-Y. e Panagia V., (1996). The Transphosphatidylation Activity of Phospholipase D. *Molecular and Cellular Biochemistry* 157: 101-105.