

# ESTUDO DO EFEITO DE LIPÍDIOS POLI-INSATURADOS NA INTERAÇÃO E ATIVIDADE PRÓ-OXIDANTE DE CITOCROMO *c* ASSOCIADO A VESÍCULAS QUE MIMETIZAM A MEMBRANA MITOCONDRIAL INTERNA

Jéssica Aparecida da Silva Pereira<sup>1</sup>, Aline de Barros Tirelli<sup>2</sup>; Ingrid Mito de Paula<sup>3</sup>; Cintia Kawai<sup>4</sup>; Kátia Cristina Ugolini Mugnol<sup>5</sup>.

Estudante do Curso de Farmácia; e-mail: jsa\_pereira@hotmail.com<sup>1</sup>

Estudante do Curso de Farmácia; e-mail: alinetirelli@hotmail.com<sup>2</sup>

Mestranda do Programa em Biotecnologia da UMC; e-mail: ingrid@hotmail.com<sup>3</sup>

Pesquisador da UFABC; e-mail: kwcintia@yahoo.com.br<sup>4</sup>

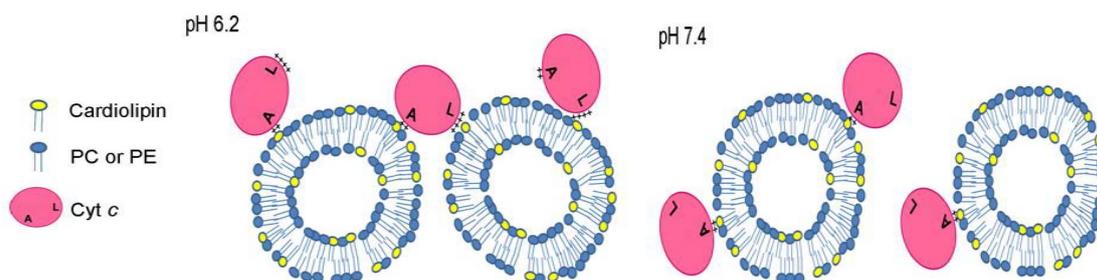
Professor-pesquisador da UMC; e-mail: kcum@uol.com.br<sup>5</sup>

**Área de conhecimento:** Metabolismo e Bioenergética

**Palavras-chave:** Citocromo *c*, Cardioplipina, Lipossomos, Radicais Livres.

## INTRODUÇÃO

O citocromo *c* é uma hemoproteína de peso molecular em torno de 12,4 kDa, localizado na face externa da membrana interna da mitocôndria. Quando ligado à membrana mitocondrial, atua na cadeia transportadora de elétrons entre os complexos III e IV. Além disso, desempenha importante papel no processo de morte celular programada (apoptose). Esta proteína apresenta dois sítios carregados que podem se ligar à membrana mitocondrial, denominados sítio A e sítio L. Em pH 6,2 ambos os sítios encontram-se protonados, desta forma ambos podem se ligar aos fosfolípidos de membrana. Já em pH 7,4 somente o sítio A se apresenta protonado, portanto, somente este está disponível para se ligar à membrana e desempenhar as funções da proteína nesta condição, como é possível se observar na figura 1. De acordo com o sítio de ligação que está interagindo com a membrana é possível se observar variações no processo de oxidação dos lipídeos.



**Figura 1.** Esquema da interação do citocromo *c* com lipossomos à esquerda, em pH 6,2 com ambos sítios (A e L) protonados e à direita em pH 7,4 apresentando somente o sítio A protonado.

O processo de apoptose está relacionado ao desprendimento da proteína decorrente da oxidação da cardioplipina presente na membrana. Quando isto ocorre há uma alteração na permeabilidade da mitocôndria promovendo o seu inchamento e liberando o citocromo *c* para o citosol, o que irá desencadear vários eventos que iniciarão a morte programada da célula.

## OBJETIVO

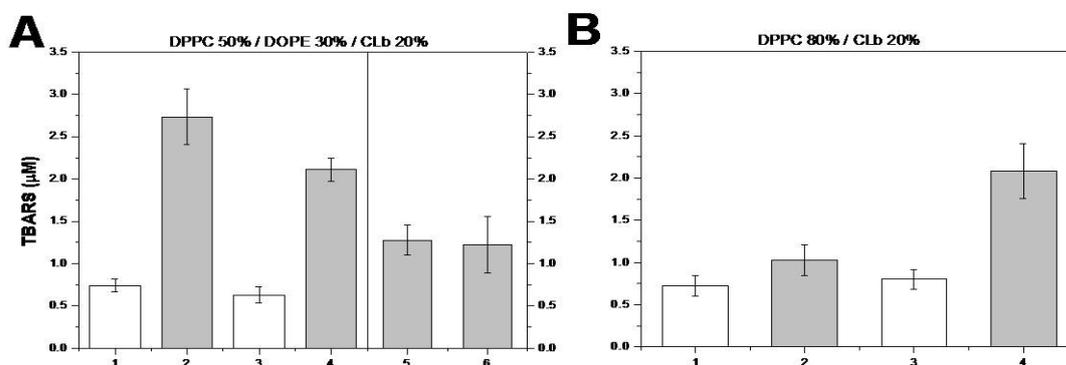
Averiguar o papel dos sítios A e L na atividade pró-oxidante de citocromo *c* em lipossomos constituídos por fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina e cardiolipina bem como o efeito de lipídios poli-insaturados na atividade do citocromo *c* e de sua interação com membrana biológica.

## METODOLOGIA

Avaliou-se a formação de malondialdeído (MDA) de acordo com o protocolo de TBARs de Buege e Aust modificado. Utilizou-se amostras contendo 1 mM de lipossomos previamente passados em extrusor através de membranas com poros de 1 mm e incubadas com 4 mM de citocromo *c* a temperatura ambiente durante 30 minutos, em tampão Hepes nos pHs 7,4 e 6,2. Posteriormente adicionou-se 150 µL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 1% (m/v) em 50 mM NaOH, 15 µL de NaOH 10 M e 75 µL de ácido fosfórico 20% (v/v). Estes foram incubados por 20 minutos, a 85°C. A extração do complexo MDA-TBA foi realizada com 1 mL de n-butanol e a absorbância determinada em 532 nm através de espectrometria eletrônica. O valor de absorbância obtido foi multiplicado pelo fator de diluição 3,33 e então utilizado o  $\epsilon = 1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

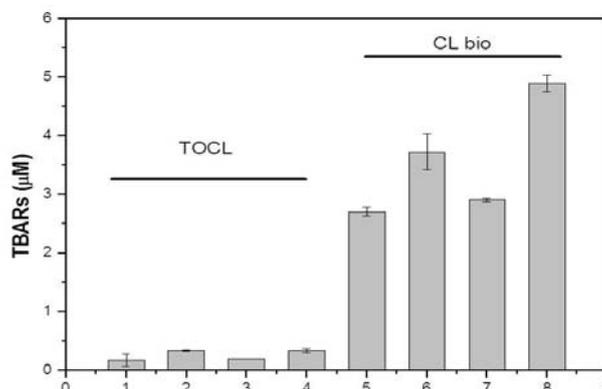
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um dos principais aldeídos gerado com a oxidação lipídica é o malondialdeído (MDA) que pode ser dosado pela reação de espécies reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARs). Vários trabalhos vêm descrevendo a capacidade do citocromo *c* em promover oxidação dos fosfolipídios quando associado a membranas contendo polinsaturações. A Figura 2 mostra o conteúdo de TBARs gerado pela associação de citocromo *c* com lipossomos de 100 nm de diâmetro constituídos de DPPC (fosfatidilcolina dipalmitoil) 50% DOPE (fosfatidiletanolamina dioleoil) 30% e CLb (cardiolipina de coração de boi, polinsaturada) 20% (painel A). Foram testados dois pHs, 6,2 e 7,4, sendo que em ambos houve um aumento significativo do conteúdo de TBARs promovido pela presença de citocromo *c*, maior em pH 6,2 do que em 7,4. É descrito na literatura que em pH 6,2 o citocromo *c* apresenta dois sítios eletrostáticos protonados que podem interagir com membranas, sítios A e L, o que leva a fusão de lipossomos. Essa fusão de vesículas pode ser acompanhada pelo aumento de turbidez do meio.



**Figura 2.** Dosagem de TBARs gerado pela associação de citocromo *c* com lipossomos contendo cardiolipina polinsaturada (CLb). **Painel A:** Lipossomos 100 nm de diâmetro constituídos de DPPC 50% DOPE 30% e CLb 20%. **Painel B:** Lipossomos 1000 nm de diâmetro constituídos de DPPC 80% e CLb 20%. Na ausência (barras brancas) e presença de citocromo *c* nativo (barras 2 e 4) ou citocromo *c* mutante pwt (barras 5 e 6). Experimentos feitos nas seguintes condições: lipossomos 1 mM em tampão Fosfato de Sódio 10 mM pH 6,2 (1, 2, 5) e pH 7,4 (3, 4, 6) incubados por 30 minutos a 25°C.

Quando a associação de citocromo *c* a vesículas de 1000 nm de diâmetro e compostas de DPPC 80% e CLb 20%, em pH 6,2, observa-se menor turbidez do meio em relação a lipossomo composto por DPPC 50% DOPE30% e CLb20%, pois o diâmetro menor das vesículas e a presença de fosfatidiletanolamina favorecem a fusão das mesmas. A dosagem de TBARs mostra que o pH 6,2 desfavorece significativamente a oxidação lipídica pelo citocromo *c* (Figura 2, painel B). Neste caso, o fato de termos uma condição que desfavoreça a fusão de vesículas, o citocromo *c* liga-se a elas somente pelo sítio A ou pelo sítio L, não por ambos simultaneamente como ocorre no processo de fusão. Assim, quando o citocromo *c* liga-se à vesícula pelo sítio L há baixa oxidação lipídica. Esses resultados sugerem que em meio com pH 7,4 o citocromo *c* apresenta somente o sítio A protonado (carregado positivamente) permitindo à proteína se ligar aos lipossomos carregados negativamente (devido a presença de cardiolipina) e, quando essa ligação ocorre com lipossomos contendo lipídios polinsaturados (de origem animal ou vegetal), o citocromo *c* promove a oxidação dos fosfolipídios, elevando o conteúdo de TBARs. Para comparar esses resultados obtidos que mostram que o sítio L do citocromo *c* desfavorece a oxidação lipídica, foi utilizado citocromo *c* recombinante, dito pseudo wild-type (pwt) que apresenta substituição pontual das histidinas 26 e 33 por asparaginas, resíduos de aminoácidos pertencentes ao sítio L. A associação do citocromo *c* recombinante pwt com vesículas de DPPC 50% DOPE 30% e CLb 20%, gerou baixo conteúdo de TBARs e de maneira independente de pH, como observado nas barras 5 e 6 da Figura 2A. A Figura 3 mostra o conteúdo de TBARs gerado pela associação de citocromo *c* com lipossomos de 100 nm de diâmetro constituídos de CLb 100% (barras de 5 a 9) e TOCL (cardiolipina tetraoleoil) 100% (barras de 1 a 4) em pHs 6,2 e 7,4.



**Figura 5 – Dosagem de TBARs em membrana lipídica constituída de CLb 100% e TOCL 100% em pH 6,2 e 7,4, na presença de citocromo *c*.** Experimentos feitos nas seguintes condições: lipossomos 1 mM em tampão HEPES 10 mM pH 6,2 (1,2,5,6) e pH 7,4 (3,4,7,8) incubados por 30 minutos a 25°C na ausência (1,3,5,7) e presença de 4 µM da proteína (2,4,6,8).

Esse resultado mostra que a atividade pró-oxidante de citocromo *c* sobre as vesículas lipídicas depende da presença de polinsaturações na cadeia acil do fosfolipídio, uma vez que a cardiolipina tetraoleoil (TOCL) apresenta somente uma ligação dupla na cadeia acil, o que impediu a formação de TBARs pelo citocromo *c*. Em lipossomos constituídos de CLb, também foi observado que o pH mais ácido desfavoreceu a formação de TBARs pela associação de citocromo *c* na vesícula.

## CONCLUSÕES

Os resultados obtidos até o momento permitem concluir que a composição lipídica interfere na maneira como ocorre a interação do citocromo *c* com os sistemas biomiméticos de membrana utilizados. As formas mutantes demonstraram que a

ausência de resíduos específicos envolvidos nos sítios A e L de interação proteína/membrana mitocondrial interna, alteram a dinâmica de fusão e produção de TBARs frente a diferentes pHs, os quais por sua vez estão diretamente relacionados ao sítio de ligação ativo.

#### **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

DICKERSON, R. & AND TIMKOVICH, R. (1979) Cytochrome *c*. in Dolphin, D. The Porphyrins, **Academic Press**, N. Y. p. 397-547.

KLUCK, R. M., BOSSY W. E., GREEN, D. R. & NEWMAYER, D. D. (1997), The release of cytochrome *c* from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. **Science**, v. 21, n° 275, p. 1132-1136.

NANTES, I. L., ZUCHHI, M. R., NASCIMENTO, O. R. & FALJONI-ALARIO, A. (2001) Effect of heme iron valence state on the conformation of cytochrome *c* and its association with membrane interfaces. A CD and EPR investigation. **J. Biol. Chem**, v.276, p. 153-158.

NANTES. I.L., ZUCCHI, M. R., NASCIMENTO, O. R., FALJONI-ALARIO, A. (2001), **The Journal of Biological Chemistry**, v.276, n°1, p. 153-158.

NICHOLLS, P. (1974) Cytochrome *c* binding to enzymes and membranes. **Biochim. Biophys. Acta** , v.346, p. 261-310.

OSHEROFF, N., BORDEN, D., KOPPENOL, W. H., MARGOLIASH, E. (1980) Electrostatic interactions in cytochrome *c*. The role of interactions between residues 13 and 90 and residues 79 and 47 in stabilizing the heme crevice structure. **J. Biol. Chem**, v. 255, p. 1689-1697.

PINHEIRO , T.J.T, CHENG, H., SEEHOLZER, S.H, RODER, H. (2000) Direct evidence for the cooperative unfolding of cytochrome *c* in lipid membranes from H-(2)H exchange kinetics. **J.Mol.Biol.**, n°303, p. 617-626.

RYTÖMAA, M., MUSTONEN, P. & KINUNNEN, P. K. J. (1992), **J. Biol. Chem.** 267, p.22243-22248.

SZETO, H. H. (2006) Cell-permeable, Mitochondrial-targeted, peptide antioxidants. **AAPS Journal**, 8(2): E277-E283. Disponível em <<http://www.aapsj.org/view.asp?art=aapsj080232>>. Acesso em 03/03/2011.

YANG, J., LIU, X. S., BHALLA, K., KIM, C. N., IBRADO, A. M., CAI, J., PENG, T., JONES, D. P. & WANG, X. (1997) Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome *c* from mitochondria blocked. **Science**, v.21, n° 275, p. 1129-1132.