UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

DANIELA DA CUNHA BATAGLIOLI

Estudo da ligação do citocromo c a um modelo mimético de membrana
mitocondrial contendo mono-hidroperóxido de cardiolipina

Prof^a. Dra. Sayuri Miyamoto

Orientadora

Versão corrigida da Dissertação defendida

São Paulo

Data de depósito na SPG:

08/05/2014

DANIELA DA CUNHA BATAGLIOLI

Estudo da ligação do citocromo c a um modelo mimético de membrana
mitocondrial contendo mono-hidroperóxido de cardiolipina

*Dissertação apresentada no Instituto de
Química da Universidade de São Paulo
Para obtenção do Título de Mestre em
Ciências (Bioquímica)*

Orientadora: Prof^ª. Sayuri Miyamoto

São Paulo

2014

Agradecimentos

A Profª Sayuri Miyamoto pela orientação e pela oportunidade de realizar esta pesquisa.

A Profª Ohara Augusto pela atenção dispensada e pela oportunidade de discussão.

Ao laboratório dos Professores Walter Terra, Clélia Ferreira e Sergio Verjovski pela disponibilidade de equipamentos e espaço para realização de alguns experimentos.

Aos amigos de laboratório Adriano Brito, Lucas Souza, Sílvio Oliveira, especialmente a Patrícia Appolinário e Priscilla Derogis pela amizade, pelos conselhos e discussões, e ao Thiago Mattos pela amizade e pelas discussões e sugestões que foram de fundamental importância.

Aos amigos Andre Pimentel, Walciane da Silva, Christiane Cardoso, Gabriel Braga, Gilliard de Faria e Ivanilde Marcelino pelos bons momentos de descontração.

As técnicas do laboratório Zilda Mendonça e Adriana Wendel.

Agradeço as minhas irmãs Janaina e Izabela por toda a convivência e principalmente pela paciência durante os tempos em que fiz cursinho.

Agradeço de forma muito especial a minha mãe Vera por sempre estar ao meu lado, por nunca ter medido esforços para proporcionar a mim e a minhas irmãs uma educação de qualidade e por ser o meu exemplo de força e superação.

Agradeço a Ticiane Damasceno por todo carinho, atenção e principalmente pela paciência de me ouvir falar sobre o meu trabalho incontáveis vezes e sempre estar pronta para me ajudar.

As agências de fomento CNPq e Fapesp e ao Redoxoma pelo suporte financeiro.

*"A ciência é uma disposição de aceitar os fatos
mesmo quando eles são opostos aos desejos"*

Burrhus Frederic Skinner

Resumo

Cunha, D. **Estudo da ligação do citocromo c a um modelo mimético de membrana mitocondrial contendo mono-hidroperóxido de cardiolipina**. 2014. 86 p. Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo

A interação do citocromo c com a cardiolipina ocorre por interações eletrostáticas e hidrofóbicas. A formação do complexo citocromo c/ cardiolipina promove uma pequena mudança estrutural na proteína, que proporciona atividade peroxidásica ao citocromo c e consequentemente capacidade de oxidar substratos orgânicos, incluindo a cardiolipina. A oxidação da cardiolipina acompanhada da inserção de um grupo peróxido vem sendo relacionada à perda da interação hidrofóbica entre o complexo citocromo c/cardiolipina, que resulta no desligamento do citocromo c da membrana e na sua saída do espaço intermembranas para o citosol, onde essa proteína induz a cascata de apoptose. Neste trabalho foi avaliada a ligação do citocromo c a lipossomos contendo cardiolipina oxidada e a reatividade desta proteína com o mono-hidroperóxido da cardiolipina (TLCL(OOH)₁) presente na membrana. Nossos dados mostraram que ocorre uma diminuição significativa na ligação do citocromo c a membrana oxidadas apenas quando 100% da cardiolipina presente na membrana está na forma de TLCL(OOH)₁, condição que extrapolaria o que seria esperado para o sistema biológico. Análises por SDS-PAGE revelaram que o citocromo c sofre agregação na presença de membranas contendo TLCL(OOH)₁, indicando que a proteína reage com este peróxido. De fato, determinamos a velocidade de reação do citocromo c com o TLCL(OOH)₁ e com hidroperóxido do ácido linoléico, inseridos em membrana contendo cardiolipina ($9,58 \pm 0,16 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ e $6,91 \pm 0,30 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, respectivamente). As velocidades de reação com os peróxidos de lipídio foram pelo menos 10 vezes superiores à velocidade medida com o peróxido de hidrogênio ($5,91 \pm 0,18 \times 10^1 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$). Assim, mostramos que o citocromo c liga-se à membrana contendo hidroperóxido de cardiolipina e que reage com o mesmo promovendo a formação de agregado protéico de alto peso molecular.

Palavras-chave: cardiolipina, citocromo c, hidroperóxido de lipídio

Abstract

Cunha, D. **Studies of the binding cytochrome c to mitochondrial mimetic membrane containing mono-hydroperoxides**. 2014. 86 p. Master Thesis – Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

The interaction of cytochrome c with cardiolipin is promoted by electrostatic and hydrophobic interactions. The cytochrome c / cardiolipin complex formation causes structural changes in the protein that activates cytochrome c peroxidase activity, giving it the ability to oxidize organic substrates, including cardiolipin. The oxidation of cardiolipin coupled with a peroxide group insertion has been related to the loss of hydrophobic interactions between the cytochrome c / cardiolipin complex, resulting in cytochrome c release from the membrane and in its translocation from intermembranes space to cytosol, where this protein induces apoptosis cascade. In this work the binding of cytochrome c to liposomes containing oxidized cardiolipin and its reactivity with the membrane mono-hydroperoxides (TLCL(OOH)₁) were evaluated. Our data showed a significant decrease in cytochrome c binding to oxidized membranes only when 100% of the membrane cardiolipin is in the TLCL(OOH)₁ form, a condition that would extrapolate the expected concentrations that would be found in a biological system. SDS-PAGE analysis revealed that cytochrome c undergoes aggregation in the presence of membranes containing TLCL(OOH)₁, indicating that this protein reacts with the peroxide. In fact, we determined the rate of cytochrome c reaction with TLCL(OOH)₁ and linoleic acid hydroperoxide inserted into cardiolipin containing membranes ($9.58 \pm 0.16 \times 10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ and $6.91 \pm 0.30 \times 10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, respectively). The reaction rates obtained with lipid peroxides were at least 10 times higher than that obtained with hydrogen peroxide ($5.91 \pm 0.18 \times 10^1 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). Thus we show that cytochrome c binds to membrane containing cardiolipin hydroperoxides and reacts with it promoting the formation of high molecular weight protein aggregates.

Keywords: cardiolipin, cytochrome c, lipids hydroperoxide

Lista de Abreviaturas e Siglas

BCA: ácido bicinconínico

CDP-diacilglicerol: citidina di-fosfato diacilglicerol

Cit c: citocromo c

CMP: citidina mono-fosfato

CTP: citidina tri-fosfato

DPPC: dipalmitoil fosfatidilcolina

DTPA: ácido dietilenotriamino penta- acético

ESI: modo negativo de ionização por eletrospray

GPx: glutathione peroxidase

13-HpODE: isômero na posição 13 do hidroperóxido do ácido linoléico

H₂O₂: peróxido de hidrogênio

HEPES: ácido etanosulfônico 4-2-hidroxietil 1-piperazina

HO•: radical hidroxila

HOO•: radical hidroperoxila

HPCL: cromatografia líquida de alta eficiência

KCl: cloreto de potássio

LH: ácido graxo insaturado

L•: radical alquila

LO•: radical alcóxila de lipídio

LOO•: radical peróxila de lipídio

m/z: razão massa carga

¹O₂: oxigênio singlete

O₃: ozônio

PC: fosfatidilcolina

PE: fosfatidiletanolamina

PHGPx: glutational peroxidase de fosfolípido

PI: fosfatidilinositol

PLA2: fosfolipase A2

PPi: pirofosfato

PS: fosfatidilserina

R-OOH: hidroperóxido orgânico

SDS: dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS

TEMED: tetrametiletenodiamina

TLCL: tetralinoleoil cardiolipina

TLCL(OOH)_x: hidroperóxido de cardiolipina

TLCL(OOH)₁: mono-hidroperóxido da tetralinoleoil cardiolipina

TLCL(OOH)₂: di-hidroperóxido da tetralinoleoil cardiolipina

TLCL(OOH)₃: tri-hidroperóxido da tetralinoleoil cardiolipina

TOCL: tetraoleoil cardiolipina

Tris-KCl: tris-hidroximetil aminometano

u.m.a.: unidade de massa atômica

Índice de Figuras

Figura 1. Representação da estrutura molecular (a) Esfingosina; (b) Ceramida. _____	18
Figura 2. Representação da estrutura molecular do ácido fosfatídico. _____	18
Figura 3. Representação da estrutura molecular (a) fosfatidilcolina; (b) fosfatidiletanolamina; (c) fosfatidilserina; (d) fosfatidilinositol. _____	19
Figura 4. Representação do esquema da biossíntese da cardiolipina em eucariotos. ____	20
Figura 5. Representação da estrutura molecular da tetralinoleoil cardiolipina. _____	21
Figura 6. Comparação da sequência primária do citocromo c de várias espécies depositadas no Protein Data Bank (PDB) e alinhadas pelo software BioEdit. ____	23
Figura 7. Representação da estrutura da porfirina do citocromo c. _____	24
Figura 8. Representação da estrutura do grupo heme do citocromo c de coração de boi código de acesso PDB(2B4Z). _____	25
Figura 9. Espectro de absorção na região visível do citocromo c (Fe^{3+}) com as bandas características de excitação dos elétrons no anel porfirínico. _____	25
Figura 10. Estrutura do citocromo c de coração de boi código de acesso PDB(2B4Z). 27	
Figura 11. Representação das reações do ciclo peroxidásico para uma enzima peroxidase _____	30
Figura 12. Representação das etapas do processo de peroxidação lipídica e da catálise na etapa de propagação promovida por metais. _____	32
Figura 13. Esquema do mecanismo proposto por Russel para formação do $^1\text{O}_2$ ou carbonila triplete ($\text{R}=\text{O}^*$) partir de radicais de lipídio. _____	33
Figura 14. (a) Diagrama dos níveis de energia do fotossensibilizador; (b) diagrama dos níveis de energia dos elétrons nos orbitais $\pi\pi^*$ do oxigênio molecular no estado fundamental ($3\Sigma_g$) e do oxigênio singlete nos estados excitados ($1\Delta_g$ e $1\Sigma_g$). ____	34

Figura 15. Representação da reação do tipo "ene" em olefinas e formação de hidroperóxidos alifáticos _____	34
Figura 16. Esquema dos hidroperóxidos do ácido linoléico formados pelos processos (A) peroxidação lipídica e (B) Oxidação por $^1\text{O}_2$ _____	35
Figura 17. Esquema simplificado do destacamento do citocromo c da membrana interna promovida pela oxidação da cardiolipina. _____	38
Figura 18. Esquema da aparelhagem utilizada para a fotooxidação da cardiolipina. ____	41
Figura 19. (A) Cromatograma da análise da TLCL purificada por HPLC (B) Espectro de massas MS da TLCL purificada adquirido no modo ESI. _____	47
Figura 20. Cromatograma das frações retiradas da fotooxidação em função do tempo e analisadas por HPLC. _____	48
Figura 21. Cromatograma do produto da reação de fotooxidação (no tempo final da reação) utilizado para purificação por HPLC. _____	49
Figura 22. Cromatograma dos materiais purificados por HPLC da reação de fotooxidação. _____	50
Figura 23. Espectros de massas dos produtos purificados da reação de fotooxidação.	51
Figura 24. Representação da estrutura molecular dos fosfolipídios utilizados no lipossomo _____	52
Figura 25. Concentração de citocromo c livre no sobrenadante após o ensaio de ligação dessa proteína com lipossomos por 15 minutos a 25°C. _____	54
Figura 26. Concentração de citocromo c livre no sobrenadante com as respectivas porcentagens em relação ao controle (5 μM de citocromo c), obtida após o ensaio de ligação dessa proteína com lipossomos contendo de 15 a 100% do TLCL(OOH) ₁ incubados por 15 minutos a 25°C. _____	55

Figura 27. Concentrações de citocromo c livre no sobrenadante com as respectivas porcentagens em relação ao controle (5 μ M citocromo c), obtidas pela absorbância da banda Soret em 410 nm e pelo método do BCA após incubação das amostras por 15 min (A) e 24 horas (B) e centrifugação na ausência de KCl. _____ 58

Figura 28. Concentrações de citocromo c livre no sobrenadante com as respectivas porcentagens em relação ao controle (5 μ M citocromo c), obtidas pela absorbância da banda Soret em 410 nm e pelo método do BCA após incubação das amostras por 15 minutos (A) e de 24 horas (B) e centrifugação na presença de KCl. ____ 60

Figura 29. Gel redutor das frações do sobrenadante (S) e precipitado (P) das amostras obtidas do ensaio de ligação do citocromo c a lipossomos, após incubação de 15 minutos (A) e 24 horas (B) e centrifugação na ausência de KCl. _____ 64

Figura 30. Gel redutor das frações do sobrenadante (S) e precipitado (P) das amostras obtidas do ensaio de ligação do citocromo c a lipossomos, após incubação de 15 minutos (A) e de 24 horas (B) e centrifugação na presença de KCl. _____ 66

Figura 31. Gel redutor da formação do agregado protéico em função do tempo na presença de lipossomo contendo 100% da cardiolipina oxidada _____ 68

Figura 32. (A) Representação da velocidade inicial determinada pela variação da concentração de resorufina para concentrações crescentes de peróxido. (B) determinação da constante de velocidade de reação (k_1) para cada peróxido utilizado. _____ 71

Figura 33. Gráficos da linearização utilizados para determinação da velocidade de reação do citocromo c com peróxidos. _____ 72

Índice de Tabela

Tabela 1. Proteínas mitocondriais que interagem com a cardiolipina _____	22
Tabela 2. Valores aproximados em porcentagem da distribuição da população de citocromo c com diferentes estados de spin moduladas pela razão L/P. _____	28
Tabela 3. Potenciais de redução de algumas espécies radicalares _____	31
Tabela 4. Composição dos lipossomos do primeiro conjunto _____	43
Tabela 5. Composição dos lipossomos do segundo conjunto _____	43
Tabela 6. Composição dos lipossomos do terceiro conjunto _____	43
Tabela 7. Valores de velocidade de reação do citocromo c com peróxidos _____	73

Lista de Equações

Equação [I]	70
Equação [II]	70
Equação [III]	70
Equação [IV]	70
Equação [V]	70

Sumário

1. Introdução	17
1.1. Fosfolipídios	17
1.2. Cardiolipina	19
1.3. Citocromo c	22
1.4. Interação da cardiolipina com o citocromo c: formação do complexo citocromo c / cardiolipina	26
1.5. Citocromo c e função peroxidase	27
1.6. Oxidação da cardiolipina	30
1.6.1. Formação de hidroperóxidos pela peroxidação lipídica	31
1.6.2. Formação de hidroperóxido pela reação com $^1\text{O}_2$	32
1.7. Complexo citocromo c / cardiolipina e papel na apoptose	36
2. Objetivos	39
3. Materiais e Métodos	40
3.1. Reagentes	40
3.2. Purificação da cardiolipina comercial, extraída de coração de boi, por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – HPLC	40
3.3. Síntese dos hidroperóxidos da tetralinoleoil cardiolipina (TLCL(OOH) _x) por fotooxidação e Purificação por HPLC	41
3.4. Preparação dos lipossomos	43
3.5. Ensaio de ligação do citocromo c aos lipossomos	44

3.6. Comparação da concentração de proteína obtida na quantificação pela absorbância da banda Soret e pelo método do ácido bicinonínico (BCA)	44
3.7. Eletroforese de proteína em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE)	45
3.8. Determinação da velocidade de reação do citocromo c com peróxidos de lipídios	46
4. Resultados e Discussão	47
4.1. Análise da purificação da cardiolipina comercial	47
4.2. Síntese e purificação dos hidroperóxidos da tetralinoleoil cardiolipina (TLCL(OOH) _x)	48
4.3. Ligação do citocromo c a lipossomos de diferentes composições	52
4.3.1. Ensaio de ligação do citocromo c a lipossomos contendo dipalmitoil fosfatidilcolina (DPPC), tetraoleoil cardiolipina (TOCL 18:1) e tetralinoleoil cardiolipina (TLCL 18:2)	52
4.3.2. Ensaio de ligação do citocromo c a lipossomos contendo TLCL(OOH) ₁	54
4.4. Ensaio de ligação do citocromo c a lipossomos em função do tempo de incubação	56
4.4.1. Quantificação de proteína livre no ensaio de ligação por absorbância da banda Soret e pelo método do BCA	56
4.4.2. Análise do citocromo c por SDS-PAGE no sobrenadante e no precipitado dos ensaios de ligação	61
4.4.3. Proposta de mecanismo para formação de agregados do citocromo c na presença de peróxido de cardiolipina	68

4.5. Determinação da velocidade de reação do citocromo c com hidroperóxidos no complexo citocromo c / cardiolipina	69
5. Conclusão	75
6. Perspectivas Futuras	78
7. Referências Bibliográficas	79

1. Introdução

Lipídios compõem uma classe de biomoléculas formada por um grupo heterogêneo de compostos, cuja propriedade comum é a solubilidade em solventes orgânicos e a insolubilidade em água. Podem ser incluídos neste grupo diferentes compostos, tais como ácidos graxos, gliceróis (reserva energética), fosfolipídios, glicolipídios, esteróis (constituintes de membrana), entre outros (Fahy et al., 2005, 2009). As funções biológicas dessa classe de compostos são tão diversas quanto a sua reatividade química.

1.1. Fosfolipídios

Os fosfolipídios estão presentes nos organismos simples, como as arqueobactérias e bactérias, e até em eucariotos mais complexos, compondo as membranas celulares e as membranas das organelas. As membranas fosfolipídicas formam uma barreira semipermeável na célula e atuam como suporte para o ancoramento de diversas proteínas responsáveis por várias funções, tais como sinalização celular, replicação do DNA, secreção, transporte de íons e de moléculas polares entre os meios intra e extracelular, entre outras. Essas membranas também estão envolvidas na compartimentalização do citoplasma (Dowhan, 1997). Os fosfolipídios de membrana podem ser divididos em dois grupos: os glicerofosfolipídios e os esfingolipídios.

Os esfingolipídios são compostos formados por um esqueleto de esfingosina, um amino álcool alifático, apresentando uma insaturação na posição C4 (Figura 1a). A inserção de um ácido graxo nessa estrutura por uma ligação amida forma a ceramida (Figura 1b). Os esfingolipídios participam da sinalização intra e extracelular, da regulação intracelular da

homeostase de cálcio e do crescimento e da morte da célula, dentre outros processos (Merrill Jr et al., 1997).

Figura 1. Representação da estrutura molecular (a) Esfingosina; (b) Ceramida.

Os glicerofosfolipídios são derivados do glicerol. Esse grupo de compostos possui dois ácidos graxos esterificados nas posições sn-1 e sn-2 e um grupo fosfato ligado na posição sn-3, formando o ácido fosfatídico (Figura 2).

Figura 2. Representação da estrutura molecular do ácido fosfatídico.

O ácido fosfatídico é o precursor para síntese dos diversos fosfolipídios. Nesse processo há enzimas que catalisam a reação do grupo fosfato com diferentes substituintes, moléculas polares, formando uma ligação fosfodiéster, originando uma região hidrofílica que determina o tipo de fosfolipídio formado. Se o grupo substituinte for uma molécula de colina, o tipo de fosfolipídio formado será fosfatidilcolina (PC). Se reagir com uma molécula de etanolamina, serina ou inositol, o tipo formado será fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilserina (PS) ou fosfatidilinositol (PI), respectivamente (Dowhan, 1997; Vance e Vance, 2008) (Figura 3).

Figura 3. Representação da estrutura molecular (a) fosfatidilcolina; (b) fosfatidiletanolamina; (c) fosfatidilserina; (d) fosfatidilinositol.

Os glicerofosfolipídios desempenham papel na sinalização celular, na estrutura e na fluidez das membranas, além de atuar como suporte para a ligação de outras biomoléculas, como colesterol e proteínas (Vance e Vance, 2008).

1.2. Cardiolipina

A cardiolipina é um glicerofosfolipídio atípico, formado por quatro cadeias de ácido graxo esterificadas em dois ácidos fosfatídicos ligados entre si por uma molécula adicional de glicerol (Schlame et al., 2000). Por ter sido primeiramente isolado de células de coração de boi, esse di-fosfatidilglicerol foi chamado de cardiolipina (Pangborn, 1942).

A cardiolipina é sintetizada a partir do ácido fosfatídico, um intermediário comum na síntese dos fosfolipídios. O ácido fosfatídico é sintetizado no retículo endoplasmático e na membrana externa mitocondrial. No entanto, a cardiolipina é o único fosfolipídio cuja etapa final da biossíntese ocorre na matriz mitocondrial. O centro catalítico contendo as enzimas de sua biossíntese está localizado na face matricial da membrana interna mitocondrial (Schlame, 2008; Schlame e Haldar, 1993). Na Figura 4 está apresentado o esquema simplificado da biossíntese da cardiolipina em eucariotos (Schlame et al., 2000).

Figura 4. Representação do esquema da biossíntese da cardiolipina em eucariotos. Após a síntese da citidina di-fosfato diacilglicerol (CDP-diacilglicerol) a partir do ácido fosfatídico, a biossíntese da cardiolipina ocorre em três etapas na membrana interna mitocondrial. Na primeira etapa ocorre a formação de fosfatidil glicerofosfato, com liberação de citidina mono-fosfato (CMP). Na segunda etapa o fosfatidil glicerofosfato é defosforilado, formando fosfatidilglicerol e eliminado fósforo (P_i). Na terceira etapa o fosfatidilglicerol é combinado com CDP-diacilglicerol, formando a cardiolipina e eliminando CMP. CTP (citidina tri-fosfato) PP_i (pirofosfato).

Em eucariotos, a cardiolipina é encontrada predominantemente nas membranas da mitocôndria, constituindo cerca de 25% do total de lipídios da membrana interna e menos de 4% do total de lipídios da membrana externa (Daum, 1985). Essa distribuição leva alguns autores a classificar a cardiolipina como um fosfolipídio exclusivo da membrana interna mitocondrial (Hostetler e Van den Bosch, 1972; Rosca et al., 2011; Schlame et al., 2000). A distribuição da cardiolipina na bicamada lipídica da membrana interna mitocondrial é assimétrica, sendo que aproximadamente 60% está localizada na face matricial e 40% na face do espaço intermembranas (Pope et al., 2008).

Em mamíferos, a cardiolipina encontrada nas mitocôndrias de tecidos de músculo esquelético, de coração, de fígado e de rim apresenta aproximadamente 90% de ácido linoléico (18:2) na composição, sendo esta chamada de tetralinoleoil cardiolipina (TLCL). Esse é um ácido graxo poliinsaturado com 18 carbonos e duas insaturações nas posições C9 e C12 (Figura 5). A cardiolipina encontrada nas mitocôndrias de tecido de cérebro apresenta na composição ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa, como ácido araquidônico (20:4) e ácido docosahexaenóico (22:6) (Daum, 1985; Pope et al., 2008).

Figura 5. Representação da estrutura molecular da tetralinoleoil cardiolipina (TLCL).

Na membrana interna mitocondrial a cardiolipina está envolvida no controle das funções mitocondriais, como fluidez, estabilidade osmótica e bioenergética. A cardiolipina

interage com diversas proteínas mitocondriais, como listado na Tabela 1 (Kim et al., 2004; Pfeiffer et al., 2003; Schlame et al., 2000).

Tabela 1. Proteínas mitocondriais que interagem com a cardiolipina

Proteína	Compartimento Mitocondrial
Transportador ADP-ATP	Membrana interna
Transportador fosfato	
Transportador piruvato	
Transportador carnitina	
Complexo I	
Complexo II	
Complexo III	
Complexo IV (Citocromo c Oxidase)	
Complexo V (ATP sintase)	
Citocromo P450	
Cardiolipina sintetase	
Citocromo c	
Creatina Kinase	
Bid	Membrana externa
Bax	

1.3. Citocromo c

O citocromo c é uma proteína que teve sua sequência determinada por Nakashima et al. (1966) e os primeiros trabalhos sobre sua estrutura foram descritos por Dickerson e Timkovich (1975). Essa proteína apresenta estrutura primária conservada em eucariotos, podendo ser composta, no caso de mamíferos, por 104 de resíduos de aminoácidos (Figura 6), apresentando a massa aproximada de 12 kDa (Voet e Voet, 2004).

Devido ao alto conteúdo de resíduos de lisina e arginina, o citocromo c é uma proteína básica em pH fisiológico, com ponto isoelétrico em pH 10 (Pinheiro, 1994). Na Figura 6 estão destacados 18 resíduos de lisina e 2 de arginina encontrados em citocromo c de mamíferos.

Espécie	Sequência
	0 10 20 30 40
Levedura [<i>S. cerevisiae</i>]	
Girassol [<i>H. annuus</i>]	---MTEFKAGSAKKGATLFKTRCLQCHTVEKGGPHKVGPNLHGIFGRHSG
Inseto [<i>D. melanogaster</i>]	----MGVPAGDVEKGKKLFVQRCQAQCHTVEAGGKHKVGPNLHGLIGRKTG
Camundongo [<i>M. musculus</i>]	-----MGDVEKGKKIFVQKCAQCHTVEKGGKHKVGPNLHGLFGRKTG
Boi [<i>B. taurus</i>]	-----MGDVEKGKKIFVQKCAQCHTVEKGGKHKVGPNLHGLFGRKTG
Homem [<i>H. sapiens</i>]	-----MGDVEKGKKIFIMKCSQCHTVEKGGKHKVGPNLHGLFGRKTG
	50 60 70 80 90
Levedura [<i>S. cerevisiae</i>]	
Girassol [<i>H. annuus</i>]	QAEGYSYTDANIKKNVLWDENNMSEYLTNPKKYIPGTMFAFGGLKKEKDR
Inseto [<i>D. melanogaster</i>]	TTAGYSYSAGNKNKAVIWEENTLYDYLLNPKKYIPGTMVFPGPKKPQER
Camundongo [<i>M. musculus</i>]	QAAGFAYTDANKAKGITWNEDTLFEYLENPKKYIPGTMIFAGLKKPNR
Boi [<i>B. taurus</i>]	QAAGFSYTDANKNGITWGEDTLMEYLENPKKYIPGTMIFAGIKKKGER
Homem [<i>H. sapiens</i>]	QAPGFSYTDANKNGITWGEETLMEYLENPKKYIPGTMIFAGIKKKGER
	100
Levedura [<i>S. cerevisiae</i>]	
Girassol [<i>H. annuus</i>]	NDLITYLKKACE-
Inseto [<i>D. melanogaster</i>]	ADLIAYLKTSTA-
Camundongo [<i>M. musculus</i>]	GDLIAYLKSATK-
Boi [<i>B. taurus</i>]	ADLIAYLKKATNE
Homem [<i>H. sapiens</i>]	EDLIAYLKKATNE

Figura 6. Comparação da sequência primária do citocromo c de várias espécies obtidas no Protein Data Bank (PDB) e alinhadas pelo software BioEdit. Números de identificação das sequências utilizadas: Levedura CAA89576; Girassol AAR30955; Inseto AAA28437; Camundongo CAA25899; Boi NP001039526; Homem NP061820. Estão destacados os resíduos de Lys e Arg encontrados na sequência da proteína de mamíferos.

O citocromo c está localizado na membrana interna mitocondrial, na face voltada para o espaço intermembranas. A função mais descrita dessa proteína é o transporte de elétrons entre os complexos III (citocromo c redutase) e IV (citocromo c oxidase) da cadeia de transporte de elétrons. O envolvimento do citocromo c tem sido descrito em outros processos, tais como: sinalização para início da cascata de apoptose celular, quando essa proteína sai do espaço intermembranas da mitocôndria para o citosol (Ow et al., 2008); oxidação do radical superóxido produzido na mitocôndria a oxigênio molecular quando a proteína se encontra no

estado nativo (Fe^{3+}); ou ainda oxidação na presença de peróxidos de substratos orgânicos, como a cardiolipina, atuando como uma peroxidase (Vladimirov et al., 2006a).

O citocromo c é uma proteína globular que apresenta o heme como grupo prostético, sendo assim classificada como hemeproteína. O grupo heme do citocromo c é formado por uma porfirina, quatro anéis de pirrólicos ligados entre si por ligações metilênicas, com um íon de ferro coordenado com os nitrogênios dos anéis pirrólicos (Figura 7).

Figura 7. Representação da estrutura da porfirina do citocromo c

O grupo prostético do citocromo c é octaetricamente coordenado em seis posições, sendo quatro coordenações estabelecidas com os nitrogênios da porfirina (Figura 7) e duas, denominadas quinta e a sexta posição, coordenadas em axial com os átomos de enxofre e nitrogênio das cadeias laterais da Met 80 e da His 18, respectivamente (Figura 8).

Figura 8. Representação da estrutura do grupo heme do citocromo c de coração de boi código de acesso PDB(2B4Z). Estão em destaque os resíduos Met 80 e His 18 coordenados com o ferro hemínico.

A quinta e a sexta ligação de coordenação são estabelecidas com ligantes campo forte, que mantém o íon de ferro com spin baixo nos dois estados de oxidação (Fe^{2+} e Fe^{3+}) (Mugnol et al., 2008; Pinheiro, 1994). O citocromo c (Fe^{3+}) apresenta algumas bandas de absorção características da excitação dos elétrons no anel porfirínico. Essas bandas são denominadas banda Q, na região de 530 nm; banda Soret, na região de 410 nm; e banda N, na região de 362 nm (Figura 9).

Figura 9. Espectro de absorção na região visível do citocromo c (Fe^{3+}) com as bandas características de excitação dos elétrons no anel porfirínico.

1.4. Interação da cardiolipina com o citocromo c: formação do complexo citocromo c / cardiolipina

Na literatura há estudos que sugerem haver duas populações de citocromo c. Na primeira população, com cerca de 85 % do total de citocromo c da organela, a proteína estaria ligada à membrana por interações eletrostáticas entre a proteína, catiônica, e a membrana mitocondrial composta por cardiolipina, aniônica. Já na segunda população, o citocromo c estaria ligado à membrana através de interações hidrofóbicas, que promovem mudanças estruturais na proteína expondo resíduos hidrofóbicos, que possibilitariam uma penetração parcial da membrana na proteína (Kalanxhi e Wallace, 2007; Ott et al., 2002; Tuominen et al., 2002).

A interação entre o citocromo c e fosfolipídios aniônicos, que tem sido objeto de estudo há décadas, é complexa e envolve múltiplos fatores. Em 1995, Rytomaa e Kinnunen propuseram o primeiro modelo de interação entre o citocromo c e a cardiolipina. A interação ocorreria primeiramente por uma interação eletrostática entre a cardiolipina e uma região da proteína denominada Sítio A (Lys 72 e 73) e, posteriormente, por uma ligação hidrofóbica, denominada lipídio estendida, entre uma cadeia de ácido graxo do fosfolipídio e uma região da proteína denominada Sítio C (Asp 52) (Figura 10) (Kagan et al., 2009; Rytomaa e Kinnunen, 1995). Posteriormente, em 2005, Nantes e colaboradores propuseram a existência de outro sítio de interação eletrostática localizado do lado oposto ao Sítio A. Esse novo sítio foi denominado Sítio L (Lys 22, Lys 25, Lys 27, His 26, His 33) e estaria disponível para ligação à membrana apenas em condições de $\text{pH} < 7,0$ (Figura 10) (Kawai et al., 2005).

Recentemente Sinibaldi et al. (2010) propuseram a existência de um novo sítio de ligação hidrofóbica, denominado Novo Canal Hidrofóbico (Tyr 67, Leu 68, Phe 82, Ile 85, Leu 94) (Figura 10). Esse grupo propôs ainda que a formação desse complexo citocromo c / cardiolipina ocorreria primeiramente por uma interação eletrostática entre a

parte aniônica da cardiolipina e o Sítio A da proteína e, posteriormente, haveria a interação de duas cadeias de ácido graxo da cardiolipina com a proteína, uma interação via Sítio C e outra via o novo canal hidrofóbico.

Figura 10. Estrutura do citocromo c de coração de boi código de acesso PDB(2B4Z). Os sítios de interação com a membrana estão destacados. Sítio A (Lys 72 e 73); Sítio C (Asp 52); Sítio L (Lys 22, Lys 25, Lys 27, His 26, His 33); Novo Canal Hidrofóbico (Tyr 67, Leu 68, Phe 82, Ile 85, Leu 94).

1.5. Citocromo c e função peroxidase

O citocromo c (Fe^{3+}) na forma livre apresenta o ferro hemínico hexacoordenado, não sendo capaz de apresentar atividade peroxidásica. No entanto, uma das características já elucidadas da formação do complexo citocromo c / cardiolipina é que esta promove mudanças na sexta ligação de coordenação da proteína.

Na forma livre, a sexta ligação de coordenação é estabelecida com o átomo de enxofre da Met 80 ($\text{Fe}^{3+}\text{--S}$), um ligante campo forte que mantém o átomo de ferro III com spin baixo, pouco reativo. Na interação com a cardiolipina, são formadas populações de citocromo c com diferentes estados de spin que são dependentes das mudanças ocorridas na sexta posição de coordenação. A coordenação com o átomo de enxofre da Met 80 pode ser substituída pela coordenação com o átomo de nitrogênio da His 33 ou da Lys 79 ($\text{Fe}^{3+}\text{--N}$), mantendo a coordenação com um ligante campo forte e o ferro III no estado de spin baixo. Essa coordenação com a Met 80 também pode ser substituída pela coordenação com uma molécula de água ($\text{Fe}^{3+}\text{--H}_2\text{O}$), trocando assim a coordenação com um ligante campo forte por um ligante campo fraco, o que deixa ferro III com um spin alto, muito reativo. Há também a formação de uma população de citocromo c penta-coordenado em que ocorre a quebra da sexta ligação de coordenação, deixando o ferro hemínico no estado de spin alto, muito reativo (Kagan et al., 2009; Mugnol et al., 2008; Oellerich et al., 2004).

As diferentes populações de citocromo c descritas acima coexistem na interação do citocromo c com membranas contendo fosfolipídios aniônicos, como a cardiolipina, e a distribuição percentual entre elas é dependente da razão lipídio aniônico / proteína (L/P) no sistema. A Tabela 2 apresenta a variação da população de citocromo c com os diferentes estados de spin modulada pela razão L/P. (Oellerich et al., 2004).

Tabela 2. Valores aproximados em porcentagem da distribuição da população de citocromo c com diferentes estados de spin moduladas pela razão L/P. (Oellerich et al., 2004)

L/P	Spin baixo ($\text{Fe}^{3+}\text{--Met}$)	Spin baixo ($\text{Fe}^{3+}\text{--His}$)	Spin alto
10	50	45	5
20	10	65	25
50	< 5	70	30
100	< 5	60	35

Na população de citocromo c penta-coordenado, a quebra da sexta ligação de coordenação permite um pequeno deslocamento dos resíduos 78 a 90 para longe da região do

heme (Pinheiro 1994), promovendo uma pequena mudança na estrutura terciária da proteína com consequente abertura da cavidade do heme, facilitando o acesso de peróxidos (H_2O_2 , peróxidos de lipídios e outros peróxidos orgânicos) ao ferro hemínico, conferindo ao citocromo c atividade peroxidásica (Vladimirov et al., 2006a, 2006b).

Até o presente momento assume-se que a reação do citocromo c penta-coordenado com peróxidos seja similar ao ciclo peroxidásico apresentado por peroxidases clássicas como peroxidase *horseradish* (HRP) e mieloperoxidase (Belikova et al., 2009; Vladimirov et al., 2006b).

As enzimas com heme penta-coordenado reagem com peróxidos formando o Composto 0. O Composto 0 pode seguir dois tipos de mecanismo: (I) clivagem heterolítica do peróxido, resultando no álcool derivado e no Composto I; (II) clivagem homolítica do peróxido, formando uma espécie radicalar e o Composto II.

O Composto I pode ser reduzido por um substrato orgânico por duas vias: i- por uma reação de dois elétrons, regenerando o citocromo c penta coordenado e formando O_2 ; ii- por uma reação de um elétron, formando o Composto II e uma espécie radicalar. O Composto II pode ser reduzido por outra de substrato orgânico por uma reação de um elétron, regenerando o citocromo c penta coordenado (Dunford, 1999). O esquema com as reações envolvidas no ciclo peroxidásico está apresentado Figura 11.

Figura 11. Representação das reações do ciclo peroxidásico para uma enzima peroxidase

1.6. Oxidação da cardiolipina

A cardiolipina presente na membrana mitocondrial está susceptível a processos oxidativos devido ao ácido graxo esterificado no di-fosfatidilglicerol encontrado em maior abundância ser o ácido linoléico, um ácido graxo poliinsaturado. A cardiolipina pode ser oxidada por dois tipos de mecanismos, em um deles é necessária a presença de uma espécie reativa radicalar para iniciar o processo de oxidação conhecido como peroxidação lipídica e, no outro tipo, a oxidação do ácido graxo da cardiolipina ocorre pela reação com o oxigênio singlete, uma espécie excitada do oxigênio molecular (Halliwell e Gutteridge, 2007).

1.6.1. Formação de hidroperóxidos pela peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica se inicia com a abstração de um átomo de hidrogênio bis-alílico da cadeia do ácido graxo poliinsaturado (LH) por um radical livre ($X^\bullet$), gerando um radical centrado no átomo de carbono do ácido graxo ($L^\bullet$). Essa etapa é chamada de iniciação e o potencial de redução para o par $L^\bullet / LH$ é estimado em 0,6 Volts (Buettner, 1993). Assim, a espécie reativa radicalar inicial ($X^\bullet$) deve apresentar um potencial de redução maior que esse valor para que seja possível a abstração do hidrogênio bis-alílico. Na Tabela 3 estão apresentadas algumas espécies com potenciais de redução que as permitem iniciar a peroxidação lipídica.

Tabela 3. Potenciais de redução de algumas espécies radicalares (Buettner, 1993)

Espécies	E° (Volts)
$HO^\bullet / H_2O$	2,31
$RO^\bullet / ROH$	1,6
$HOO^\bullet / HOOH$	1,06
$ROO^\bullet / ROOH$	0,77 a 1,44
$O_3^{\bullet -} / H_2O + O_2$	1,8

Em um ambiente aeróbio, $L^\bullet$ reage rapidamente com O_2 ($k = 3 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) (Wagner et al., 1994), produzindo $LOO^\bullet$. Este radical formado também pode abstrair um hidrogênio bis-alílico de outra molécula de ácido graxo, gerando outro radical ($L^\bullet$) e o produto primário de oxidação $LOOH$. Na presença de metais como Fe^{2+} e Fe^{3+} ainda pode haver a reação desses com $LOOH$, gerando $LOO^\bullet$ ou $LO^\bullet$, respectivamente. Essas etapas são denominadas propagação da peroxidação lipídica.

A última etapa da peroxidação lipídica, a terminação, ocorre pela aniquilação dos radicais formados, gerando produtos não-radicalares. Todas as etapas da peroxidação lipídica estão ilustradas na Figura 12.

Figura 12. Representação das etapas do processo de peroxidação lipídica e da catálise na etapa de propagação promovida por metais.

1.6.2. Formação de hidroperóxido pela reação com $^1\text{O}_2$

O $^1\text{O}_2$ pode ser formado a partir de radicais de lipídio produzidos na peroxidação lipídica (seção 1.6.1) através do mecanismo proposto por Russell (1957) (Miyamoto et al., 2003). A reação entre dois radicais $\text{LOO}\cdot$ forma um intermediário tetraóxido (LOOOOL) que se decompõe gerando cetona ($\text{L}=\text{O}$), álcool ($\text{L}-\text{OH}$) e oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), ou gerando cetona excitada ($\text{L}=\text{O}^*$), álcool ($\text{L}-\text{OH}$) e oxigênio molecular (O_2) (Russell, 1957), como apresentado na Figura 13.

Figura 13. Esquema do mecanismo proposto por Russel para formação do ${}^1\text{O}_2$ ou carbonila triplete ($\text{R}=\text{O}^*$) partir de radicais de lipídio.

O ${}^1\text{O}_2$ também pode ser formado na presença de um fotossensibilizador, luz e oxigênio num processo chamado de fotooxidação. *In vivo*, a riboflavina, a porfirina e derivados são fotossensibilizadores endógenos que interagem com radiação não ionizante, principalmente raios UVA (320-400 nm) (Carbonare e Pathak, 1992). *In vitro*, o azul de metileno pode ser utilizado como um fotossensibilizador que interage com radiação em 664 nm.

Inicialmente o fotossensibilizador no estado fundamental (${}^0\text{S}$) absorve um fóton de energia e é excitado para estado singlete (${}^1\text{S}^*$), que é rapidamente convertido, por uma conversão intersistemas, ao estado excitado triplete (${}^3\text{S}^*$) que apresenta maior tempo de vida, como mostrado na Figura 14a. O fotossensibilizador no estado excitado triplete (${}^3\text{S}^*$) pode seguir duas vias distintas para voltar ao estado fundamental. Na primeira via (i) o fotossensibilizador excitado abstrai um elétron e/ou hidrogênio de algum substrato formando espécies radicalares ($\text{X}\cdot$). Na segunda via (ii) o fotossensibilizador no estado excitado triplete (${}^3\text{S}^*$) transfere energia para o oxigênio molecular no estado fundamental triplete (${}^3\text{O}_2$), resultando na formação do oxigênio excitado, ou seja, na formação do oxigênio singlete (${}^1\text{O}_2$) (Foote, 1991).

O ${}^1\text{O}_2$ é formado em dois estados de excitação, como apresentado na Figura 14b. O estado excitado ${}^1\text{O}_2$ (${}^1\Delta_g$) apresenta uma energia de 22 kcal/mol acima do estado fundamental e

um tempo de meia vida de 10^{-6} segundos, sendo a espécie com importância biológica relevante. O estado excitado $^1\text{O}_2$ ($^1\Sigma_g$) apresenta uma energia de 37 kcal/mol acima do estado fundamental e um tempo de meia vida muito curto de 10^{-11} segundos, decaindo rapidamente para o estado excitado $^1\text{O}_2$ ($^1\Delta_g$) (Foote, 1968).

Figura 14. (a) Diagrama dos níveis de energia do fotossensibilizador; (b) diagrama dos níveis de energia dos elétrons nos orbitais $\pi\pi^*$ do oxigênio molecular no estado fundamental ($^3\Sigma_g$) e do oxigênio singlete nos estados excitados ($^1\Delta_g$ e $^1\Sigma_g$).

O $^1\text{O}_2$ adiciona-se diretamente nos carbonos das duplas ligações do ácido linoléico da cardiolipina por uma reação do tipo “Ene”, análoga à reação que ocorre em olefinas (Foote Denny, 1971; Harding e Goddard, 1980). Nesse tipo de reação, a adição do $^1\text{O}_2$ em um carbono insaturado leva à quebra da dupla ligação e à formação desta em um carbono adjacente, formando o hidroperóxido alílico (Figura 15).

Figura 15. Representação da reação do tipo "ene" em olefinas e formação de hidroperóxidos alifáticos

O processo de peroxidação lipídica no ácido linoléico pode gerar dois isômeros resultantes da adição de oxigênio nas posições C9 e C13 do radical pentadienila formado no

C11 (Figura 16A). O processo de oxidação pelo $^1\text{O}_2$ do ácido linoléico pode gerar uma mistura de quatro isômeros de posição devido ao $^1\text{O}_2$ adicionar-se diretamente ao carbono da dupla ligação (Figura 16B) (Terao e Matsushita, 1977).

Figura 16. Esquema dos hidroperóxidos do ácido linoléico formados pelos processos (A) peroxidação lipídica e (B) Oxidação por $^1\text{O}_2$

A TLCL pode ser oxidada por esses processos em qualquer uma das quatro cadeias do ácido linoléico que a compõe. Sendo assim, pode ser gerada uma enorme e complexa quantidade de produtos com variações na posição da cadeia do ácido graxo oxidado na molécula de cardiolipina e na posição da inserção do grupo peróxido na cadeia do ácido graxo. E, no caso do processo de oxidação por $^1\text{O}_2$, poderia haver a inserção de mais de um grupo peróxido na mesma cadeia de ácido graxo. Até a presente data não foi descrita a caracterização de todos os produtos que poderiam ser formados na oxidação da cardiolipina.

1.7. Complexo citocromo c / cardiolipina e papel na apoptose

A morte programada da célula, apoptose, é essencial para a homeostase tecidual e para a manutenção do sistema imunológico. A desestabilização desse processo pode acarretar num desequilíbrio patofisiológico e até em doenças.

O processo de apoptose pode ser ativado por duas vias: uma extrínseca e uma intrínseca. A via extrínseca é induzida pela interação de ligantes extracelulares específicos a receptores trans-membrana de apoptose. Essa ligação ativa um complexo de indução de apoptose que recruta e ativa as caspases para desencadear uma cascata de enzimas que levam a célula à apoptose. A via intrínseca é ativada na mitocôndria por estímulos que levam à permeabilização da membrana externa mitocondrial com consequente liberação de proteínas, dentre elas o citocromo c, do espaço intermembranas para o citosol. No citosol, o citocromo c inicia a ativação e regulação de enzimas apoptóticas, dentre elas a cascata de caspases e a formação de apoptossomos sinalizando para a morte celular (Ow et al., 2008).

O envolvimento do citocromo c na ativação da cascata apoptótica demonstra que esta proteína desempenha nas células um papel mais amplo do que o transporte de elétrons entre os complexos III e VI da cadeia de transporte de elétrons.

O complexo citocromo c / cardiolipina é formado por interações eletrostáticas e hidrofóbicas entre a cardiolipina e a proteína, como descrito na seção 1.4. Essas interações devem ser desfeitas para que ocorra o destacamento do citocromo c da membrana interna mitocondrial e a saída da proteína para o citosol.

A inserção de um grupo polar, hidroperóxido, em uma ou mais cadeias do ácido linoléico da cardiolipina tem sido descrito como essencial para a perda das interações entre os componentes desse complexo (Shidoji et al., 1999) (Figura 17). A atividade peroxidásica do citocromo c, descrita na seção 1.5, pode utilizar a cardiolipina como substrato, gerando os hidroperóxidos de cardiolipina e radicais de carbono capazes de promover a propagação da peroxidação lipídica (descrita na seção 1.6.1), proporcionando um aumento na formação desse hidroperóxidos. Durante o processo de propagação da peroxidação lipídica ocorre a formação de radicais peroxila de lipídio ($\text{ROO}\bullet$). Dois desses radicais podem reagir entre si formando $^1\text{O}_2$ (seção 1.6.2), que reage com a cardiolipina promovendo ainda mais formação de hidroperóxidos. Se a formação dos hidroperóxidos é essencial para liberação do citocromo c, o mecanismo responsável pela oxidação inicial da cardiolipina é suscetível à regulação dos eventos iniciais da apoptose, no entanto esses mecanismos ainda não são muito elucidados (Kagan et al., 2004).

Nesse contexto, a peroxidação da cardiolipina pode ter duas consequências na liberação do citocromo c para o citosol. Uma delas seria a perda da interação hidrofóbica do complexo citocromo c / cardiolipina, facilitando a dissociação da proteína da membrana pela inserção de um grupo peróxido na cadeia de ácido graxo. Outra consequência seria a permeabilização da membrana externa mitocondrial, promovida pela peroxidação da cardiolipina provavelmente associada com proteínas da família Bcl2, tais como Bax e Bid (Iverson e Orrenius, 2004; Paradies et al., 2009).

Figura 17. Esquema simplificado do destacamento do citocromo c da membrana interna promovida pela oxidação da cardiolipina e a liberação dessa proteína para o citosol. Os números I a V são referentes aos complexos da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial. (Figura adaptada de Kagan et al., 2004 e Iverson e Orrenius 2004)

2. Objetivos

O objetivo principal do trabalho foi investigar alterações na ligação (*binding*) e na reatividade do citocromo c na presença de modelos miméticos de membrana mitocondrial (lipossomos unilamelares) contendo mono-hidroperóxidos de cardiolipina.

Para atingir esse objetivo o trabalho teve como metas a síntese e a purificação do mono-hidroperóxido da tetralinoleoil cardiolipina. O estudo do efeito deste hidroperóxido inserido na membrana sobre a interação do citocromo c. E finalmente, assumindo que a atividade peroxidásica exibida pelo citocromo c quando ligado a membrana siga o mesmo ciclo peroxidásico descrito para a HPR, esse estudo também teve como meta determinar a velocidade de reação da proteína com o TLCL(OOH)₁.

3. Materiais e Métodos

3.1. Reagentes

A cardiolipina extraída de coração de boi, a dipalmitoil fosfatidilcolina (DPPC) e a tetraoleoil cardiolipina (TOCL) foram adquiridas da Avanti Polar Lipids Inc. (Alabaster, AL). O citocromo c de coração de boi, o ácido dietilenotriamonopentaacético (DTPA), o peróxido de hidrogênio, a bis-acrilamida, o formaldeído 37%, o cloreto de prata, o azul de metileno, o bicarbonato de sódio, o fosfato de sódio monobásico, o fosfato de sódio dibásico, o acetato de sódio, o tiosulfato de sódio, o carbonato de sódio, o dodecilsulfato de sódio (SDS), o persulfato de amônio e o HEPES foram adquiridos da Sigma (St.Louis, MO). O reagente Amplex Red[®] foi adquirido da Invitrogen (Eugene Oregon USA). Todos os solventes utilizados grau HPLC foram adquiridos da Mallinckrodt Baker (Phillipsburg,NJ). O tetrametiletenodiamina (TEMED), o marcador de peso molecular (Broad Range), o glicerol e a acrilamida foram obtidos da Bio-Rad (USA).

3.2. Purificação da cardiolipina comercial, extraída de coração de boi, por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – HPLC

A cardiolipina comercial foi purificada para obtenção da TLCL pura. Para a purificação foi utilizada uma coluna C8-Tosoh (150 x 6 mm e 5 µm de tamanho de partícula), fase móvel de formiato de amônio 10 mM em água (A) e metanol (B). O gradiente empregado foi de: até 5 min 94% de B, 25 min 97 % B, 26 min 94% B, até 30 min 94% B. O fluxo utilizado foi de 1 mL/min e a amostra foi monitorada em 205 nm. Após recolher a fração referente à TLCL, o solvente foi rotaevaporado e a amostra foi ressuspensa em metanol. Uma alíquota da TLCL foi analisada por HPLC utilizando a mesma coluna e o mesmo

método cromatográfico descrito para a purificação. A confirmação da massa referente à TLCL foi obtida através da análise no espectrômetro de massas Esquire 300 Plus (Brucker Daltonics) por injeção direta no modo eletrospray negativo (ESI) utilizando as seguintes condições: temperatura da fonte 300°C, nebulizador 12 psi, voltagem do capilar 4000 Volts e voltagem do cone -40 Volts.

3.3. Síntese dos hidroperóxidos da tetralinoleoil cardiolipina (TLCL(OOH)_x) por fotooxidação e Purificação por HPLC

A síntese dos TLCL(OOH)_x foi realizada por fotosensibilização. Foram dissolvidos 50 mg de cardiolipina comercial em 10 mL de clorofórmio. Em seguida foram adicionados 2 µL de uma solução de azul de metileno 100 mM em metanol.

A reação foi realizada em balão (Pyrex[®]) de 100 mL, imerso em banho de gelo. A mistura reacional foi mantida sob constante agitação em atmosfera saturante de oxigênio e irradiada por uma lâmpada de tungstênio (500 Watts) por 1 hora, como esquematizado na Figura 18.

Figura 18. Esquema da aparelhagem utilizada para a fotooxidação da cardiolipina

A formação dos hidroperóxidos foi monitorada por HPLC em fase reversa, utilizando uma coluna C8-Tosoh (150 x 6,0 mm e 5 μ m), com fase móvel de formiato de amônio 25 mM em água (A) e metanol (B). O gradiente empregado foi: 5 min 90% B, 30 min 97% B, 35 min 97% B, 40 min 90% , 50 min 90% B. O fluxo utilizado foi de 1 mL/min e as amostras foram monitoradas em 205 e 235 nm. Após 1 hora de fotooxidação, o solvente da reação foi rotaevaporado e o material foi ressuspensionado em metanol.

A purificação do material obtido após a fotooxidação foi realizada por HPLC, utilizando uma coluna Semi Preparativa C8-Luna (250 x 10 mm e tamanho de partícula de 5 μ m) e fase móvel de formiato de amônio 10 mM (A) e metanol (B). O gradiente utilizado foi: até 5 min 90% B, 20 min 97% B, 26 min 97% B, 27 min 90% B, 35 min 90% B. O fluxo empregado foi de 5 mL/min. As amostras foram monitoradas em 205 e 235 nm. Após a purificação, as frações obtidas foram secas por rotaevaporação e ressuspensionadas em metanol.

Uma alíquota das frações com os hidroperóxidos purificados foi analisada por HPLC utilizando uma coluna C8 Tosoh (150 x 6,0 mm; 5 μ m) e fase móvel de formiato de amônio 10 mM (A) e metanol (B). O gradiente utilizado foi: até 5 min 90% B, 30 min 97% B, 35 min 97% B, 36 min 90% B, 40 min 90% B. O fluxo empregado foi de 1 mL/min e as amostras foram monitoradas em 205 nm. A identificação das frações correspondentes à TLCL, ao mono-hidroperóxido (TLCL(OOH)₁), ao di-hidroperóxido (TLCL(OOH)₂) e ao tri-hidroperóxido (TLCL(OOH)₃) da TLCL foi realizada no espectrômetro de massas Esquire 300 Plus (Brucker Daltonics) por injeção direta no modo eletrospray negativo (ESI) utilizando as seguintes condições: temperatura da fonte 300°C, nebulizador 12 psi, voltagem do capilar 4000 Volts, voltagem do cone -40 Volts.

3.4. Preparação dos lipossomos

Foram preparados três conjuntos de lipossomos, em tampão HEPES 5 mM pH 7,4 com 100 μ M DTPA. Estão descritos na Tabela 4 e na Tabela 6 o primeiro e o terceiro conjunto de lipossomos contendo DPPC, TOCL, TLCL(OOH)₁ com as respectivas concentrações de cada fosfolipídios. Na Tabela 5 está apresentado o segundo conjunto contendo 0,5 mM de DPPC:TOCL (80:20) e diferentes concentrações de 13-HpODE.

Tabela 4. Composição dos lipossomos do primeiro conjunto

[DPPC] μ M	[TOCL] μ M	[TLCL(OOH) ₁] μ M	% TLCL(OOH) ₁ no total de CL	Proporções Fosfolipídeos Totais
1000	0	0	0	100
800	200	0	0	(80 : 20)
800	170	30	15	(80 : 17 : 3)
800	150	50	25	(80 : 15 : 5)
800	140	60	30	(80 : 13 : 7)
800	120	80	40	(80 : 11 : 9)
800	100	100	50	(80: 10 : 10)
800	0	200	100	(80 : 20)

Tabela 5. Composição dos lipossomos do segundo conjunto

[DPPC] μ M	[TOCL] μ M	[13-HpODE] μ M
500	0	0
500	100	0
500	100	10
500	100	20
500	100	30
500	100	40
500	100	50

Tabela 6. Composição dos lipossomos do terceiro conjunto

[DPPC] μ M	[TOCL] μ M	[TLCL(OOH) ₁] μ M
400	90	10
400	80	20
400	70	30
400	60	40
400	50	50

A mistura de cada tipo lipossomo foi seca sob fluxo de nitrogênio seguido de vácuo por 1h. O filme de fosfolipídio formado foi hidratado com tampão HEPES 5 mM pH 7,4 e agitado vigorosamente no vórtex por 1 min. Para obtenção dos lipossomos unilamelares a solução foi submetida a extrusão através de uma membrana de policarbonato com poro de 100 nm por 21 vezes utilizando o Kit LipoFast® (Avestin Inc, Ottawa, Canadá).

3.5. Ensaio de ligação do citocromo c aos lipossomos

Os lipossomos descritos na Tabela 4 foram diluídos para 0,5 mM em tampão Hepes 5 mM pH 7,4 e incubados com 5 μ M de citocromo c a 25°C por 15 min. Foi utilizado como controle uma solução de 5 μ M de citocromo c na ausência de lipossomo.

As incubações e o controle foram centrifugados (Ultracentrífuga Beckman Coulter Optima TLX) a 160000xg por 1 hora a 4°C (Hanske et al., 2012). Imediatamente após o término da centrifugação o citocromo c livre obtido no sobrenadante foi quantificado através a banda Soret (Abs 410 nm) do espectro de absorção. A absorbância medida foi convertida em concentração de citocromo c pela equação de reta obtida por em curva padrão de Abs 410 nm em função da concentração de citocromo c. A análise estatística da ligação do citocromo c foi realizada pelo programa GraphPad Prism (versão 5), utilizando o teste ANOVA.

3.6. Comparação da concentração de proteína obtida na quantificação pela absorbância da banda Soret e pelo método do ácido bicinconínico (BCA)

Os lipossomos de DPPC, DPPC:TOCL (80 : 20, %), DPPC:TOCL:TLCL(OOH)₁ (80 : 15 : 5, %) e DPPC:TLCL(OOH)₁ (80 : 20, %), descritos na Tabela 4 foram diluídos para 0,5 mM e incubados com 5 μ M de citocromo c por 15 minutos e por 24 horas a 25°C. Após os tempos de incubação, as amostras foram centrifugadas a 160000x g por 1 hora a 4°C em

condições de baixa e alta força iônica, ou seja, na ausência e na presença de 250 mM de KCl (Hanske et al., 2012), e tiveram sobrenadante e precipitado separados. É esperado que citocromo c ligado ao lipossomo fique na fração do precipitado enquanto o citocromo c livre fique na fração do sobrenadante.

O sobrenadante foi dividido em duas frações. Em uma das frações a quantificação de proteína foi realizada pelo espectro de absorção do citocromo c utilizando a banda Soret (Abs 410 nm), e na outra foi realizada quantificação por BCA. Para esta quantificação, as amostras foram incubadas com a solução reagente de BCA, chamada de solução de trabalho, na proporção de 1:1 por 1h a 60°C. Após o resfriamento, a absorbância das amostras foi lida em 562 nm. A solução de trabalho é composta por: carbonato de sódio 0,04 g.L⁻¹, tartarato de sódio 0,008 g.L⁻¹, ácido bicinconínico (BCA) 0,02 g.L⁻¹ e sulfato cúprico 0,0008 g.L⁻¹ (Stoscheck, 1990).

A comparação estatística da concentração de proteína obtida pelos dois métodos de quantificação foi realizada no programa GraphPad Prism, utilizando o teste T-student.

3.7. Eletroforese de proteína em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Alíquotas do sobrenadante e do precipitado obtidas a partir das incubações descritas no item 3.6. foram adicionadas a um tampão de amostra composto por Tris-HCl 62 mM pH 6,8, glicerol 10% (v/v), SDS 2% (m/v), β-mercaptoetanol 120 mM e azul de bromofenol 0,001% (m/v). As misturas foram fervidas por 5 min e submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 15%, tampão Tris 1,5 M pH 8,8, SDS, amônio persulfato e TEMED 0,1% (m/v)

(Laemmli, 1970). Foi aplicada uma diferença de potencial de 200 Volts por aproximadamente 35 min. Após a corrida, o gel foi revelado com prata (Blum et al., 1987).

3.8. Determinação da velocidade de reação do citocromo c com peróxidos de lipídios

Para a determinação da velocidade de reação do citocromo c com peróxidos foram utilizados um espectrofluorímetro termostatizado a 25°C e cubeta com caminho óptico de 1 cm. Para os ensaios realizados com H₂O₂ foram incubados 0,5 mM de lipossomo DPPC:TOCL (80:20) com 0,5 µM citocromo c por dois minutos. Posteriormente, foram adicionados 100 µM Amplex Red[®] e 25 µM, 35 µM, 45 µM, 55 µM e 70 µM de H₂O₂. O peróxido de hidrogênio foi quantificado pela absorbância em 240 nm ($\epsilon = 39.4 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$). Imediatamente após a adição do H₂O₂ a velocidade de reação foi monitorada pela formação da resorufina, produto oxidado do Amplex Red[®] com excitação e emissão em 575 nm e 585 nm, respectivamente.

Para os ensaios com 13-HpODE e com o TLCL(OOH)₁ foram adicionados 100 µM de Amplex Red[®] e 0,5 µM de citocromo c a 0,5 mM dos lipossomos de DPPC:TOCL:HpODE e DPPC:TOCL:TLCL(OOH)₁ nas concentrações descritas na Tabela 5 e Tabela 6 (seção 3.4). A velocidade de reação foi monitorada imediatamente após a adição do citocromo c pela formação da resorufina.

4. Resultados e Discussão

4.1. Análise da purificação da cardiolipina comercial

Para evitar uma mistura de diferentes tipos de cardiolipina contendo vários ácidos graxos esterificados, a presença de possíveis contaminantes ou ainda a presença de peróxidos e hidróxidos, a cardiolipina comercial foi purificada por HPLC em fase reversa utilizando uma coluna C8.

A fração referente à tetralinoleoil cardiolipina (TLCL) foi coletada, seca por rotaevaporação e ressuspensa em metanol. Para avaliar a purificação, uma alíquota do material purificado foi analisada por HPLC utilizando o mesmo método cromatográfico descrito para a purificação e teve a massa da TLCL confirmada por espectrometria de massas. A Figura 19A apresenta o cromatograma da TLCL purificada com um único pico com tempo de retenção em 14 min. A purificação foi confirmada por espectrometria de massas que apresentou m/z 1447,5 e m/z 723,1, compatíveis com a massa da TLCL mono carga $[M-H]^-$ e dupla carga $[M-2H]^{2-}$, como apresentado na Figura 19B. A TLCL purificada foi utilizada nos demais ensaios realizados neste trabalho.

Figura 19. (A) Cromatograma da análise da TLCL purificada por HPLC em fase reversa coluna C8, fase móvel formiato de amônio 10 mM e metanol, detecção em 205 nm. (B) Espectro de massas MS da TLCL purificada adquirido no modo ESI⁻ e voltagem do cone -40 Volts.

4.2. Síntese e purificação dos hidroperóxidos da tetralinoleoil cardiolipina (TLCL(OOH)_x)

A síntese dos TLCL(OOH)_x foi realizada pelo processo de fotooxidação mediado pelo oxigênio singlete (¹O₂). Os ácidos linolêicos esterificados na cardiolipina, ácido graxo poliinsaturado com duas duplas ligações, são altamente suscetíveis ao ataque do ¹O₂.

A formação dos hidroperóxidos foi monitorada por HPLC pela injeção de alíquotas retiradas da reação de fotooxidação no tempo inicial, antes da adição do fotosensibilizador azul de metileno, e após 30 e 60 minutos de reação (Figura 20). A reação de fotooxidação foi interrompida após 1h, o solvente foi seco e o material ressuspensionado em metanol.

Figura 20. Cromatograma das frações retiradas da fotooxidação em função do tempo e analisadas por HPLC, coluna C8 e fase móvel de formiato de amônio 25 mM e metanol com detecção em 205 nm.

Os produtos formados na reação de fotooxidação foram purificados por HPLC em uma coluna preparativa C8, sendo coletados separadamente os picos [1] a [4], representados na Figura 21. O material de cada pico coletado foi seco e ressuspensionado em metanol. A análise das frações [1] a [4] purificadas foi realizada por HPLC (Figura 22) para verificar a eficiência da purificação. A identificação da espécie presente em cada fração foi realizada por espectrometria de massas (Figura 23).

Figura 21. Cromatograma do produto da reação de fotooxidação (no tempo final da reação) utilizado para purificação por HPLC, coluna Semi Preparativa C8, fase móvel de formiato de amônio 10 mM e metanol. Detecção em 205 nm.

O cromatograma da Figura 22a referente à fração [1] purificada apresenta um único pico em 29 minutos atribuído à TLCL não oxidada. O espectro de massas demonstrado na Figura 23a apresenta a confirmação da massa da TLCL com m/z 1447,5 e m/z 723,6, referentes à TLCL com mono carga $[M-H]^-$ e dupla carga $[M-2H]^{2-}$, respectivamente.

O cromatograma da Figura 22b referente à fração [2] purificada apresenta um pico em 21 minutos. Pelo espectro de massas dessa fração foi possível identificar um composto com m/z 1479,8 e m/z 739,5 sendo íons mono carga $[M-H]^-$ e dupla carga $[M-H]^{2-}$, respectivamente (Figura 23b). Esses íons podem ser atribuídos a uma reação com 1O_2 , resultando na inserção de 32 u.m.a na TLCL, formando o mono-hidroperóxido (TLCL(OOH)₁). O rendimento da reação de fotooxidação para a síntese do mono-hidroperóxido foi aproximadamente 35%.

Para as frações purificadas [3] e [4] foi realizado o mesmo tipo de análise para identificação dos compostos presentes. A Figura 22c e a Figura 22d apresentam o cromatograma da fração [3], com um pico em 14 minutos, e o cromatograma da fração [4], com pico em 8 minutos. O espectro de massas da fração [3] (Figura 23c) apresentou picos de

m/z 1511,5 e m/z 755,6, íons mono carga $[M-H]^-$ e dupla carga $[M-2H]^{2-}$, respectivamente, que foram atribuídos a duas reações com 1O_2 , resultando na inserção de 64 u.m.a na TLCL, formando o di-hidroperóxido (TLCL(OOH)₂). O espectro de massas da fração [4] (Figura 23d) apresentou picos de m/z 1544 e m/z 772, íons mono carga $[M-H]^-$ e dupla carga $[M-2H]^{2-}$, respectivamente, que foram atribuídos a três reações com 1O_2 , resultando na inserção de 96 u.m.a na TLCL, formando o ao tri-hidroperóxido (TLCL(OOH)₃).

Figura 22. Cromatograma dos materiais purificados por HPLC da reação de fotooxidação. (a) TLCL, (b) TLCL(OOH)₁, (c) TLCL(OOH)₂, (d) TLCL(OOH)₃. Coluna C8, fase móvel de formiato de amônio 10 mM e metanol, com detecção em 205 nm.

Figura 23. Espectros de massas dos produtos purificados da reação de fotooxidação. (a) TLCL, (b) TLCL(OOH)₁, (c) TLCL(OOH)₂, (d) TLCL(OOH)₃. Os espectros de MS foram obtidos no modo ESI⁻ e voltagem do cone – 40 Volts.

Apenas a cardiolipina purificada (TLCL) e o mono-hidroperóxido (TLCL(OOH)₁) sintetizado foram utilizados nos demais ensaios deste trabalho.

4.3. Ligação do citocromo c a lipossomos de diferentes composições

4.3.1. Ensaio de ligação do citocromo c a lipossomos contendo dipalmitoil fosfatidilcolina (DPPC), tetraoleoil cardiolipina (TOCL 18:1) e tetralinoleoil cardiolipina (TLCL 18:2)

Em células de mamíferos, cerca de 90% do ácido graxo esterificado na cardiolipina é o ácido linoléico. Na literatura é descrito que a constante de ligação do citocromo c com TLCL e TOCL é de $(1,6 \pm 0,2) \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ e $(1,7 \pm 1,0) \times 10^9 \text{ M}^{-1}$, respectivamente (Belikova et al., 2006). Para confirmar se não haveria diferença na ligação do citocromo c a lipossomos contendo essas espécies de cardiolipina, foram preparados lipossomos de DPPC:TLCL (80:20) e DPPC:TOCL (80:20) e de DPPC. Os três tipos de lipossomos foram incubados com citocromo c por 15 min. Na Figura 24 está representada a estrutura molecular dos fosfolipídios DPPC (a), TOCL (b) e TLCL(c), utilizados no preparo dos lipossomos.

Figura 24. Representação da estrutura molecular de (a) DPPC (b) TOCL e (c) TLCL

A Figura 25 apresenta a concentração de citocromo c livre obtido no sobrenadante após a centrifugação das incubações contendo lipossomos e do controle (citocromo c na ausência de lipossomo). Não houve diferença estatística ($p > 0,05$) na quantidade de citocromo c obtida na incubação com lipossomo de DPPC quando comparado ao controle, com $(96 \pm 3) \%$ do citocromo c no sobrenadante. Esse resultado ratifica o que é descrito na literatura, em que a interação inicial do citocromo c com a membrana ocorre por uma interação eletrostática. O DPPC é um fosfolípido zwitteriônico, portanto lipossomo com apenas este fosfolípido não apresentariam interação eletrostática com citocromo c em meio fisiológico, uma vez que nesta faixa de pH a proteína apresenta carga líquida positiva e o fosfolípido apresenta carga neutra.

Para as incubações com lipossomo de DPPC:TOCL e de DPPC:TLCL foi determinado que apenas $(6 \pm 1)\%$ e $(7 \pm 2)\%$ do citocromo c estava livre no sobrenadante, respectivamente. Sendo assim, houve uma diminuição significativa ($p < 0,001$) na concentração de citocromo c livre na presença dessas duas espécies de cardiolipina, se comparada à concentração de proteína obtida na incubação contendo lipossomo de DPPC. Esse resultado também confirmou que não há diferença estatística ($p > 0,05$) na ligação do citocromo c a lipossomos contendo TOCL ou TLCL.

Figura 25. Concentração de citocromo c livre no sobrenadante após o ensaio de ligação dessa proteína com lipossomos por 15 minutos a 25°C. A diferença estatística foi simbolizada por *** ($p < 0,001$) em comparação ao controle contendo lipossomo de DPPC.

4.3.2. Ensaio de ligação do citocromo c a lipossomos contendo TLCL(OOH)₁

Para avaliar o efeito que a presença do hidroperóxido promoveria na ligação do citocromo c foram realizados ensaios com proporções crescentes de TLCL(OOH)₁ inseridos na membrana, variando de 15 a 100% do total da cardiolipina presente, como indicado na Tabela 4 (seção 3.4). Como não houve diferença significativa na ligação do citocromo c a lipossomos contendo TOCL e TLCL (Figura 25), foi utilizado o TOCL ao invés de TLCL para compor os 20% de cardiolipina do lipossomo, juntamente com o TLCL(OOH)₁. Essa troca teve como intenção minimizar uma possível propagação do processo de peroxidação lipídica ou de reações de oxidação secundárias nas insaturações do ácido linoléico originadas pela interação do citocromo c com o TLCL(OOH)₁ adicionado.

Comparando a concentração de citocromo c obtida pela absorbância da banda Soret, para a incubação com lipossomo de DPPC:TOCL e para as incubações com lipossomos

contendo de 15 a 50 % do total de cardiolipina na forma de TLCL(OOH)_1 (Tabela 4) não foi observada diferença estatística ($p > 0,05$) na ligação da proteína (Figura 26). No entanto, quando a comparação foi feita entre as incubações com lipossomo contendo cardiolipina não oxidada (DPPC:TOCL) e lipossomo contendo 100% de cardiolipina oxidada, na forma de TLCL(OOH)_1 (DPPC: TLCL(OOH)_1), foi observado que a concentração de citocromo c no sobrenadante é aproximadamente duas vezes maior na incubação com o TLCL(OOH)_1 ($p < 0,01$) (Figura 26).

Figura 26. Concentração de citocromo c livre no sobrenadante com as respectivas porcentagens em relação ao controle ($5\mu\text{M}$ de citocromo c), obtida após o ensaio de ligação dessa proteína com lipossomos contendo de 15 a 100% do TLCL(OOH)_1 incubados por 15 minutos a 25°C . A diferença estatística foi simbolizada por ** ($p < 0,01$) em comparação ao ensaio realizado com lipossomo sem o peróxido.

A literatura tem proposto que a oxidação da cardiolipina, ou seja, que a formação de hidroperóxido pode interferir no complexo citocromo c / cardiolipina por promover a perda da interação hidrofóbica entre a membrana fosfolipídica e a proteína (Kagan et al., 2004; Shidoji et al., 1999). O resultado obtido neste experimento indica que a ligação do

citocromo c para formar o complexo citocromo c / cardiolipina diminui estatisticamente somente na condição em que toda a cardiolipina presente na membrana esteja oxidada, condição esta que não poderia ser extrapolada para o sistema biológico.

4.4. Ensaio de ligação do citocromo c a lipossomos em função do tempo de incubação

4.4.1. Quantificação de proteína livre no ensaio de ligação por absorbância da banda Soret e pelo método do BCA

Nossos resultados mostraram não haver diferença estatística na ligação do citocromo c com os lipossomos de DPPC:TOCL e DPPC:TOCL:TLCL(OOH)₁ quando a proporção do peróxido varia entre 15 e 50 % do total de cardiolipina presente na membrana, como mostrado na seção 4.3.2. Assim, para investigar a ligação do citocromo c em função do tempo foram selecionados os lipossomos com cardiolipina não oxidada (DPPC:TOCL (80:20)), com 25% da cardiolipina oxidada (DPPC:TOCL:TLCL(OOH)₁ (80:15:5)) e com 100% da cardiolipina oxidada (DPPC:TLCL(OOH)₁ (80:20)). Após os tempos de 15 minutos e 24 horas de incubação, as amostras foram centrifugadas em condição de baixa e alta força iônica, ou seja, na ausência e na presença de 250 mM de KCl. A determinação da concentração de proteína no sobrenadante foi realizada pela absorbância da banda Soret do citocromo c e pela quantificação de proteína utilizando o método do BCA. A quantificação de proteína no sobrenadante por um método que não dependesse da integridade da estrutura do heme teve como intuito verificar se haveria no sobrenadante proteína com estrutura comprometida.

O resultado obtido para as incubações de 15 min (Figura 27A) e de 24 horas (Figura 27B) centrifugadas na ausência de KCl confirmaram que não há diferença

significativa ($p > 0,05$) entre a ligação de citocromo c a membranas contendo cardiolipina não oxidada (TOCL) e a membranas contendo 25% da cardiolipina na forma de TLCL(OOH)₁. Esse resultado foi obtido tanto pela determinação da concentração de proteína pela absorbância da banda Soret quanto na quantificação pelo método de BCA.

Para a ligação do citocromo c a lipossomos contendo 100% da cardiolipina presente na membrana na forma de TLCL(OOH)₁ foi observado que a concentração de proteína determinada no sobrenadante pelo método do BCA foi aproximadamente 3 vezes maior do que a determinada pela absorbância da banda Soret no tempo de incubação de 15 minutos (Figura 27A) e aproximadamente 6 vezes maior no tempo de 24 horas de incubação (Figura 27B).

Figura 27. Concentrações de citocromo c livre no sobrenadante com as respectivas porcentagens em relação ao controle ($5\mu\text{M}$ citocromo c), obtidas pela absorbância da banda Soret em 410 nm (colunas em branco) e pelo método do BCA (colunas em quadriculado) após incubação das amostras por 15 min (A) e 24 horas (B) e centrifugação na ausência de KCl. A diferença estatística foi simbolizada por * ($p < 0,05$) na comparação da concentração de proteína obtida pelos dois métodos.

Essa diferença na concentração de proteína determinada pelos dois métodos pode estar associada à presença de uma espécie de citocromo c no sobrenadante que esteja com a estrutura do heme comprometida, ou mesmo de espécies que tenham sofrido modificações

covalentes, que podem alterar a massa total da proteína resultante e causar perturbações locais em sua estrutura, de tal forma que não haja mais absorção da banda Soret.

Com o intuito de romper a interação eletrostática e reverter a ligação recuperando o citocromo c no sobrenadante, foi aumentada a força iônica do meio pela adição de 250 mM de KCl após os tempos de incubação de 15 minutos e 24 horas. Foi observado que não houve diferença estatística ($p > 0,05$) na concentração de proteína determinada no sobrenadante quando comparadas as quantificações realizadas pela absorbância da banda Soret e pelo método do BCA para cada incubação nos tempos de 15 minutos. Para a incubação com lipossomo contendo cardiolipina não oxidada e com lipossomo contendo 25% da cardiolipina na forma de TLCL(OOH)₁ foram recuperados no sobrenadante mais de 85% e 70%, respectivamente, da concentração do citocromo c inicial na forma livre (5 μ M). No entanto, para a incubação contendo 100% da cardiolipina oxidada foi recuperada no sobrenadante menos da metade da concentração do citocromo c inicial (Figura 28A).

Para o tempo de incubação de 24 horas não houve diferença estatística ($p > 0,05$) na concentração de citocromo c recuperado no sobrenadante quando comparadas as quantificações realizadas pelos dois métodos para as incubações com lipossomos contendo cardiolipina não oxidada e 25% da cardiolipina na forma de TLCL(OOH)₁. Para essas incubações as proporções de citocromo c recuperado do sobrenadante foram equivalentes a mais de 70% e 55%, respectivamente. Porém, para a incubação com lipossomo contendo 100% de cardiolipina oxidada, a concentração de proteína determinada pelo método do BCA foi aproximadamente 5 vezes maior do que a obtida utilizando a absorbância da banda Soret, e a concentração de proteína recuperada no sobrenadante também foi inferior à metade da concentração inicial (Figura 28B).

Figura 28. Concentrações de citocromo c livre no sobrenadante com as respectivas porcentagens em relação ao controle (5 μM citocromo c), obtidas pela absorbância da banda Soret em 410 nm (colunas em branco) e pelo método do BCA (colunas em quadriculado) após incubação das amostras por 15 minutos (A) e de 24 horas (B) e centrifugação na presença de KCl. A comparação da concentração de proteína determinada pelos dois métodos para cada conjunto de lipossomo em (A) mostra que não houve diferença estatística ($p > 0,05$). Em (B) a diferença estatística foi simbolizada por * ($p < 0,05$) na comparação da concentração de proteína obtida pelos dois métodos. Para ambos os tempos estudados, houve uma diminuição estatística na concentração de proteína determinada no sobrenadante para as incubações contendo cardiolipina não oxidada, 25% e 100% da cardiolipina oxidada analisando cada método de quantificação separadamente.

A diminuição na concentração de citocromo c livre recuperado no sobrenadante após adição KCl, que foi observada na Figura 28 para ambos os tempos de incubação, indica que uma parcela da proteína estaria presente no precipitado, interagindo com o lipossomo por ligações que não foram rompidas pelo aumento da força iônica do meio. Essa diminuição significativa na concentração de citocromo c recuperado sugere que os hidroperóxidos de cardiolipina reagem com o citocromo c promovendo reações que mantem a proteína presa à membrana. Além disso, a diferença observada na concentração de proteína determinada pelos dois métodos na presença de lipossomo contendo 100% da cardiolipina na forma de TLCL(OOH)₁ pode ocorrer, novamente devido à presença no sobrenadante de uma espécie de citocromo c que esteja com a estrutura do heme comprometida. Essas hipóteses foram investigadas por eletroforese em gel.

4.4.2. Análise do citocromo c por SDS-PAGE no sobrenadante e no precipitado dos ensaios de ligação

A baixa concentração de citocromo c recuperado no sobrenadante após a adição de KCl e a diferença na quantificação de proteína determinada pelos métodos da absorbância da banda Soret e do BCA, descritos na seção 4.4.1., foram investigadas em gel de SDS-PAGE na tentativa de identificar em qual fração, sobrenadante (S) ou precipitado (P) haveria maior predominância do citocromo c e se haveria a presença nessas frações de proteínas com pesos moleculares diferentes do citocromo c nativo (12 kDa). As análises em gel de SDS-PAGE foram realizadas para as incubações de 15 minutos e de 24 horas, após centrifugação das amostras na ausência e na presença de KCl.

Para as amostras contendo lipossomo de DPPC:TOCL (80:20), centrifugadas na ausência de KCl após incubação de 15 minutos e de 24 horas, foi observado que há presença

predominante de citocromo c no precipitado (Figura 29). Enquanto para as amostras contendo esse mesmo tipo de lipossomo, centrifugadas na presença de KCl, a proteína encontra-se predominantemente no sobrenadante (Figura 30). Esses resultados concordam com os obtidos na quantificação de proteína determinada pelos dois métodos de análise descritos na seção 4.4.1, em que para a quantificação de proteína no sobrenadante obtida em condição de baixa força iônica (Figura 27) há menos que 10% do citocromo c no sobrenadante, e a concentração obtida em condição de alta força iônica (Figura 28) há mais que 70 % de citocromo c no sobrenadante.

Para as amostras centrifugadas na condição de baixa força iônica, o gel das incubações com lipossomo contendo 25% da cardiolipina na forma de TLCL(OOH)₁, após 15 minutos (Figura 29A) e 24 horas de incubação (Figura 29B), revelou a existência de um agregado protéico (>180 kDa) no fração do precipitado. Enquanto para as incubações com lipossomo contendo 100% da cardiolipina na forma de TLCL(OOH)₁, a presença do agregado foi observada no sobrenadante e no precipitado para ambos os tempos de incubação (Figura 29). Estes dados indicam que o citocromo c interage com membranas contendo cardiolipina oxidada. E que essa proteína reage com os hidroperóxidos promovendo a formação de agregados protéicos.

Nas incubações de 15 minutos e 24 horas com lipossomos contendo 100% da cardiolipina na forma de TLCL(OOH)₁, o precipitado formado no fundo do tubo assemelhava-se a uma macha translúcida, enquanto para as demais incubações, que continham cardiolipina, o precipitado formado era semelhante a uma macha avermelhada. Essa diferença na coloração do precipitado formado se deve provavelmente à perda da estrutura do heme da proteína.

A presença do agregado protéico no sobrenadante das incubações de 15 minutos (Figura 29A) e 24 horas (Figura 29B) com lipossomo contendo 100% da cardiolipina na

forma de TLCL(OOH)₁ foi provavelmente o motivo da diferença nas concentrações de proteína determinada pelos dois métodos de quantificação descritos na seção 4.4.1, (Figura 27), uma vez que, com a formação de agregado a estrutura do heme pode ter sido comprometida e, conseqüentemente, a determinação de proteína pela absorbância da banda Soret. A quantificação de proteína realizada pelo método do BCA das incubações com lipossomo contendo 100% da cardiolipina na forma de TLCL(OOH)₁ apresentou aproximadamente 35% de proteína no sobrenadante para a incubação de 15 minutos (Figura 27A) e aproximadamente 63% para a incubação de 24 horas (Figura 27B). Essa diferença de proteína determinada em função do tempo de incubação sugere que a agregação pode levar a uma desestabilização ou rompimento da membrana resultando na liberação do agregado para o sobrenadante.

Figura 29. Gel redutor das frações do sobrenadante (S) e precipitado (P) das amostras obtidas do ensaio de ligação do citocromo c a lipossomos, após incubação de 15 minutos (A) e 24 horas (B) e centrifugação na ausência de KCl. O símbolo * indica que a fração retirada da centrifugação foi diluída 5 vezes antes de ser aplicada no gel. O símbolo ** indica uma espécie proteica com peso molecular menor do que a do citocromo c nativo (12 kDa), que pode ocorrer devido à perda do grupo heme da proteína

Para as amostras centrifugadas na condição de alta força iônica, o gel das incubações por 15 minutos na presença de lipossomo contendo 25% e 100% da cardiolipina da membrana na forma de TLCL(OOH)₁ (Figura 30A) mostrou a existência de citocromo c livre no sobrenadante e de agregado apenas na fração do precipitado (Figura 30A).

Em contraste com o resultado obtido para a incubação por 15 minutos com lipossomo contendo 100% da cardiolipina na forma de TLCL(OOH)₁ centrifugada em baixa força iônica, que mostrou a presença de agregado tanto no precipitado quanto no sobrenadante

(Figura 29A), para a incubação com o mesmo tempo e tipo de lipossomo, mas centrifugada em condição de alta força iônica, foi observada a banda de agregado apenas na fração do precipitado (Figura 30A). Essa diferença sugere que na ausência de KCl interações eletrostáticas entre o citocromo c e a cardiolipina oxidada permitem que reação entre essas espécies ainda continue ocorrendo durante o tempo de centrifugação (1h), levando à observação do agregado no sobrenadante. Ao se adicionar KCl antes da centrifugação, ocorre um aumento na força iônica do meio, que favorece o rompimento da interação eletrostática no complexo citocromo c/cardiolipina, interrompendo a reação entre a proteína e o hidroperóxido de cardiolipina, liberando o citocromo c monomérico para o sobrenadante.

Para as amostras centrifugados na presença de KCl, o gel das incubações por 24 horas na presença de lipossomo contendo 25 % da cardiolipina da membrana na forma de TLCL(OOH)₁, mostrou uma banda de citocromo c livre no sobrenadante e a presença de agregado apenas no precipitado (Figura 30B), enquanto para a incubação com lipossomo contendo 100% da cardiolipina na forma de TLCL(OOH)₁ o gel mostrou a presença apenas de agregado tanto no sobrenadante quanto no precipitado . Esse resultado indica que a formação do agregado é dependente da concentração do hidroperóxido e do tempo de reação. Um detalhe importante a ser mencionado é que a presença do agregado no sobrenadante da incubação com lipossomos contendo 100% de cardiolipina oxidada pode explicar a diferença na concentração de proteína no sobrenadante obtida pelos dois métodos de quantificação apresentados na seção 4.4.1 na Figura 28B, devido à perda da absorção do heme da proteína que interfere na quantificação utilizando a banda Soret.

Figura 30. Gel redutor das frações do sobrenadante (S) e precipitado (P) das amostras obtidas do ensaio de ligação do citocromo c a lipossomos, após incubação de 15 minutos (A) e de 24 horas (B) e centrifugação na presença de KCl. O símbolo * indica que a fração retirada da centrifugação foi diluída 5 vezes antes de ser aplicada no gel. O símbolo ** indica uma espécie proteica com peso molecular menor do que a do citocromo c nativo (12 kDa), que pode ocorrer devido a perda do grupo heme da proteína

A presença do agregado protéico no precipitado observado na Figura 30 também justifica a baixa concentração de citocromo c recuperado no sobrenadante mesmo após a adição de KCl, observada na Figura 28 para ambos os tempos de incubação.

Em resumo, os dados dos géis apresentados na Figura 29 e na Figura 30, mostram que a presença de hidroperóxidos de cardiolipina na membrana promove reações que levam à

agregação do citocromo c, formando espécies de alto peso molecular (>180 KDa), e que para as incubações com lipossomos contendo cardiolipina não oxidada o citocromo c liga-se à membrana por interações eletrostáticas que são rompidas pela adição de KCl.

Com o intuito de estudar a cinética de formação desses agregados e também para estudar a formação de possíveis dímeros e trimeros observados em outros estudos envolvendo citocromo c e peróxidos (Kapralov et al., 2011) e citocromo c e aldeídos (Genaro-Mattos et al., 2013), foram realizadas incubações com lipossomos contendo 100% de cardiolipina oxidada (DPPC:TLCL(OOH)₁ (80:20)). Foram retiradas alíquotas em tempos menores que 15 min. Além disso, para comprovar que a formação de agregado não foi induzida durante o processo de centrifugação, as análises dessa cinética foram conduzidas sem essa etapa.

A formação do agregado em função do tempo de incubação está apresentada na Figura 31. Foi possível observar a presença crescente de dímeros e trimeros até os 15 minutos de incubação, tempo em que ainda havia uma banda forte do citocromo c e uma banda fraca na faixa do agregado. Após 24 horas de incubação, observa-se o desaparecimento da banda de citocromo c e o surgimento de uma banda muito forte na região do agregado protéico. Esse resultado sugere que a formação acentuada do agregado protéico ocorre após 15 minutos e que estes não são induzidos pelo processo de centrifugação.

Figura 31. Gel redutor da formação do agregado protéico em função do tempo na presença de lipossomo contendo 100% da cardiolipina oxidada

4.4.3. Proposta de mecanismo para formação de agregados do citocromo c na presença de peróxido de cardiolipina

Ao ligar-se em membrana contendo fosfolípido aniônico, como a cardiolipina, ocorre a formação de várias populações de citocromo c, como descrito na seção 1.4. Dentre essas populações há uma que apresenta o íon de ferro III do heme penta coordenado que é capaz de reagir com peróxidos, formando os Compostos I e II do ciclo peroxidásico, descritos na seção 1.5. Kagan e colaboradores propuseram que os Compostos I e II formados na ligação do citocromo c à membrana contendo cardiolipina, na presença de peróxido de hidrogênio, são capazes de oxidar resíduos de amino ácidos da proteína, especificamente tirosinas, formando radicais tirosilas (Tyr•) e possibilitando a dimerização e oligomerização da proteína (Tyurina et al., 2006). Recentemente esse grupo também mostrou a importância do resíduo de Tyr 67 da proteína para a formação do radical tirosila, pela proximidade desse resíduo do grupo heme da proteína, e especulam que a formação do agregado protéico ocorra devido à

formação de ligações cruzadas di-tirosinas geradas pela recombinação de radicais tirosilas imobilizados na proteína (Kapralov et al., 2011).

Especulação semelhante pode ser feita para a formação dos agregados observados neste trabalho, uma vez que os nossos dados indicam que o citocromo c ancora-se a membranas contendo cardiolipina oxidada e reage com os hidroperóxidos, formando agregados protéicos.

4.5. Determinação da velocidade de reação do citocromo c com hidroperóxidos no complexo citocromo c / cardiolipina

Para a confirmação da reação entre o citocromo c e o mono-hidroperóxido da cardiolipina, observada nos géis de SDS-PAGE pela formação de agregados protéicos, foram determinadas as velocidades de reação do citocromo c com TLCL(OOH)₁ e com 13-HpODE inseridos em lipossomos contendo DPPC:TOCL. As velocidades de reação do citocromo c com os dois peróxidos de lipídio inseridos na membrana foram comparadas com a velocidade de reação dessa proteína com H₂O₂ em solução.

O cálculo da constante de reação do citocromo c com os peróxidos foi realizado adotando o modelo utilizado anteriormente por Belikova et al. (2006), que determinou a velocidade de reação do citocromo c no complexo citocromo c / cardiolipina com o H₂O₂ e com diversos peróxidos orgânicos, inclusive 13-HpODE.

Para determinação da constante de reação, Belikova e colaboradores assumiram como pressuposto que o citocromo c comporta-se como uma peroxidase. Assim, as reações representadas na Equação [I], Equação [II] e na Equação [III] foram utilizadas no cálculo da constante de velocidade de reação (k_1). Inicialmente o peróxido (R-OOH) reage com a

proteína via oxidação por dois elétrons, formando o Composto I e o álcool correspondente (Equação [I]). O Composto I reage com um doador de elétrons (AR) via oxidação por um elétron, formando o Composto II e o radical correspondente do doador de elétrons (AR•) (Equação [II]). O citocromo c retorna ao estado inicial por outra reação de oxidação via um elétron entre o Composto II e o doador de elétrons (AR), gerando outro radical (AR•) (Equação [III]).

Ainda nesse trabalho citado, a reação entre o citocromo c e os peróxidos foi monitorada pelo aumento da fluorescência da resorufina. Dois Amplex Red radicalares (AR•) formados na Equação [II] e na Equação [III] reagem gerando uma molécula de resorufina e regenerando uma molécula de Amplex Red (Gorris e Walt, 2009). Outra consideração feita foi que a reação do citocromo c com peróxidos é irreversível, assim a velocidade inicial (v_0) medida experimentalmente pela variação de fluorescência foi definida como $-d[\text{AR}]/dt$. Pela manipulação da Equação [I], da Equação [II] e da Equação [III] foi obtida a Equação [IV]. Assumindo que k_2 é aproximadamente dez vezes maior que k_3 , foi possível a simplificação da Equação [IV] e obtenção da Equação [V] (Belikova et al., 2009; Dunford, 1999).

$$\frac{2[\text{cit c}]_0}{v_0} = \frac{(k_2+k_3)}{k_2 \cdot k_3} \frac{1}{[\text{AR}]} + \frac{1}{k_1[\text{R-OOH}]} \quad \text{Equação [IV]}$$

$$\frac{2[\text{cit c}]_0}{v_0} = \frac{1}{k_3[\text{AR}]} + \frac{1}{k_1[\text{R-OOH}]} \quad \text{Equação [V]}$$

Assim a velocidade inicial (V_0) medida pela variação da concentração de resorufina para cada concentração de peróxido foi determinada como representado na Figura 32A. Para a determinação de k_1 , os dados obtidos dessa maneira foram utilizados na Equação [V] como representado na Figura 32B.

Figura 32. (A) Representação da velocidade inicial determinada pela variação da concentração de resorufina para concentrações crescentes de peróxido. (B) determinação da constante de velocidade de reação (k_1) para cada peróxido utilizado.

Neste trabalho a concentração de peróxido considerada na Equação [V] para determinação da constante de velocidade de reação do citocromo c com 13-HpODE e com $TLCL(OOH)_1$ inseridos na membrana foi metade da utilizada na preparação dos respectivos lipossomos, descritos na Tabela 5 e na Tabela 6. Foi considerado que ao formar o lipossomo houve uma distribuição uniforme do peróxido entre as faces externa e interna da membrana. Sendo assim, apenas metade da concentração total de peróxido adicionada estaria disponível para reação com o citocromo c.

Utilizando a Equação [V] foi possível obter uma reta em que o inverso do coeficiente angular é igual à constante de velocidade de reação (k_1). Os dados obtidos para cada peróxido (A) H_2O_2 , (B) 13-HpODE e (C) $TLCL(OOH)_1$, apresentados na Figura 33, são representativos dos resultados obtidos para os ensaios realizados em triplicata para cada peróxido. Os valores das constantes de reação apresentados na

Tabela 7 são a média dos valores das constantes obtidas, considerando-se os desvios de linearização para cada ensaio.

Figura 33. Gráficos da linearização utilizados para determinação da velocidade de reação do citocromo c com (A) H_2O_2 , (B) 13-HpODE e (C) TLCL(OOH)_1 .

Tabela 7. Valores de velocidade de reação do citocromo c com peróxidos

Peróxido	Determinado	Belikova et al. 2009
	$k \text{ (M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1})$	
H_2O_2	$(5,91 \pm 0,18) \times 10^1$	$2,09 \times 10^1$
13-HpODE	$(6,91 \pm 0,30) \times 10^2$	$5,20 \times 10^4$
TLCL(OOH)_1	$(9,58 \pm 0,16) \times 10^2$	*****

A constante de velocidade de reação do citocromo c determinada neste trabalho com TLCL(OOH)_1 e para 13-HpODE foram muito próximas. Ambas apresentam uma ordem de grandeza maior que a constante determinada com H_2O_2 .

A constante obtida com H_2O_2 foi aproximadamente o dobro da determinada por Belikova et al. (2009). Essa diferença pode ter ocorrido devido às diferentes temperaturas utilizadas nos ensaios. A temperatura utilizada neste trabalho foi de 25° C, enquanto a utilizada pelo outro grupo foi 37°C (essa temperatura não é informada no artigo de referência, mas foi obtida através de um email enviado pela Profª Ohara Augusto à autora do artigo solicitando esta informação).

A velocidade de reação com 13-HpODE obtida está duas ordens de grandeza menor que a determinada por Belikova et al. (2009). Essa diferença tão significativa nas velocidades de reação com 13-HpODE quando este está inserido na membrana, modelo utilizado neste trabalho, ou quando o hidroperóxido foi adicionado a uma incubação contendo lipossomos de DPPC:TOCL e citocromo c, determinado por Belikova et al.(2009), pode ser atribuída a dois fatores: primeiro à diferença na temperatura em que os ensaios foram realizados e segundo à inserção do peróxido na membrana, que pode ter dificultado o seu acesso ao heme da proteína, uma vez que o citocromo c necessita ligar-se à membrana para que haja uma

pequena mudança estrutural, expondo a cavidade do heme para que a reação ocorra. Acreditamos que o segundo fator contribua de forma mais acentuada para essa diferença tão significativa, uma vez que com H_2O_2 a diferença na temperatura não alterou a ordem de grandeza da constante de reação.

Determinamos neste trabalho a velocidade de reação do citocromo c com o peróxido da cardiolipina ($\text{TLCL}(\text{OOH})_1$) quando este está inserido na membrana. Assim como já havia sido observado por Belikova, a velocidade de reação do citocromo c com peróxidos de lipídios pode ser de 10 a 1000 vezes superior à velocidade de reação desta proteína com peróxido de hidrogênio. Portanto, esses dados sugerem que uma vez formados na membrana mitocondrial os hidroperóxidos de cardiolipina podem reagir com o citocromo c ancorado à membrana, levando à agregação da proteína. No entanto é importante mencionar que *in vivo* hidroperóxidos de lipídios são reparados por sistemas de defesa da célula. Nas células há enzimas, como as da família da glutathione peroxidase (GPx), que são capazes de reduzir uma variedade de peróxidos tanto orgânicos como inorgânicos. No citosol e nas mitocôndrias são encontradas especificamente as glutathionas de fosfolípidios (PHGPx), que são capazes de reduzir hidroperóxidos de fosfolípidios. Outra rota possível para redução dos hidroperóxidos de fosfolípidios é a ação conjunta das GPx com as fosfolipases (PLA2). A PLA2 cliva a ligação éster do ácido graxo que foi oxidado, liberando o hidroperóxido de lipídio que será reduzido pela ação das enzimas da família GPx. Desta forma, em condições normais os hidroperóxidos de cardiolipina provavelmente são reduzidos a hidróxidos e/ou clivados gerando lisocardiolipinas e hidróxidos / hidroperóxidos de ácidos graxos, evitando que estes iniciem reações indesejáveis levando, por exemplo à formação de agregados do citocromo c.

5. Conclusão

Neste trabalho foi possível realizar a síntese e a purificação dos hidroperóxidos da tetralinoleoil cardiolipina. Mono-hidroperóxidos (adição de 32 u.m.a), di-hidroperóxidos (adição 64 u.m.a) e tri-hidroperóxidos (adição de 96 u.m.a) foram isolados e identificados por espectrometria de massas. O mono-hidroperóxido foi utilizado nos ensaios de ligação com o citocromo c e de reatividade dessa proteína.

A ligação (*binding*) do citocromo c a lipossomos contendo TLCL e TOCL não apresentou diferença estatística, indicando que a proteína interage igualmente com ambas espécies moleculares da cardiolipina. Também não foi observada diferença estatística na ligação desta proteína a lipossomos que continham de 15 a 50 % do total de cardiolipina como mono-hidroperóxido. Por outro lado, houve uma diminuição significativa na ligação da proteína à membrana na condição em que 100% da cardiolipina no lipossomo estava na forma de TLCL(OOH)₁, observada pelo aumento da concentração de citocromo c livre no sobrenadante determinada pela quantificação da banda Soret.

Diferenças na determinação da concentração de citocromo c livre pela absorbância da banda Soret e por BCA foram observadas principalmente na presença de lipossomos contendo 100% da cardiolipina na forma de TLCL(OOH)₁. Análises por SDS-PAGE das frações correspondentes ao sobrenadante obtido após centrifugação destas incubações revelaram que o citocromo c presente no sobrenadante estava na forma de agregado protéico. Portanto a diferença na concentração de proteína determinada pelos dois métodos pode ser atribuída à formação do agregado, que provavelmente compromete a estrutura da proteína podendo causar alterações no espectro de absorção do grupo heme e, conseqüentemente, na absorção da banda Soret. Agregados de citocromo c também foram observados no precipitado obtido

após centrifugação das incubações com lipossomos contendo 25% e 100% da cardiolipina na forma de TLCL(OOH)₁ nos tempos de 15 minutos e 24 horas. Em tempos menores que 15 minutos de incubação foi observada a formação de dímeros e trímeros em ensaios que não foram centrifugados.

Analisando em conjunto, os dados obtidos pela medida de citocromo c livre e pelos ensaios de SDS-PAGE mostram que a presença de hidroperóxidos de cardiolipina não promove uma menor ligação do citocromo c à membrana em concentrações que poderiam ser esperadas fisiologicamente (inferiores a 50%). Ao contrário, a presença de hidroperóxido de cardiolipina na membrana promove a formação de agregados protéicos.

A agregação do citocromo c observada na presença de lipossomos contendo hidroperóxido de cardiolipina pode ser atribuída à reação entre essas duas espécies. As constantes de velocidade para as reações do citocromo c com TLCL(OOH)₁, 13-HpODE e H₂O₂ foram determinadas e comparadas com as constantes descritas na literatura. As constantes de velocidade determinadas com TLCL(OOH)₁ e com 13-HpODE inseridos na membrana apresentaram a mesma ordem de grandeza, sendo pelo menos 10 vezes superiores à constante determinada com o H₂O₂. No entanto a constante descrita na literatura para a reação do citocromo c com 13-HpODE em solução é duas ordens de grandeza maior. Essa diferença tão significativa nas velocidades de reação quando o peróxido está inserido na membrana ou em solução sugere que a inserção do peróxido na membrana pode dificultar seu acesso ao heme da proteína, uma vez que o citocromo c necessita ligar-se à membrana para que haja uma pequena mudança estrutural que expõe a cavidade do heme, possibilitando que a reação ocorra.

Em resumo, os resultados obtidos neste trabalho foram os primeiros deste grupo no âmbito de entender a complexa interação do citocromo c à membranas na presença de peróxido de lipídio, especificamente do hidroperóxido da cardiolipina. Nossos resultados

sugerem que o citocromo c liga-se a membrana contendo hidroperóxidos e a reação com os mesmos promove a sua agregação. No entanto, o modelo *in vitro* utilizado neste trabalho não contempla a complexa maquinaria antioxidante que há em uma célula. Assim o aprofundamento desse estudo em um sistema que se aproxime mais do sistema biológico é de extremo interesse para que possamos entender melhor o papel do peróxido de lipídio, em particular do peróxido da cardiolipina, na ligação do citocromo c à membrana.

6. Perspectivas Futuras

Para melhores esclarecimentos sobre o papel do hidroperóxido de cardiolipina na interação com o citocromo c, esse grupo tem como planos para prosseguimento dessa linha de pesquisa:

1. Análises de sequenciamento do citocromo c modificado na presença de hidroperóxidos de cardiolipina.
2. Estudo da ligação (*binding*) do citocromo c com hidróxidos da cardiolipina.
3. Estudo da integridade da membrana mimética utilizando, por exemplo, ensaio de integridade de membrana monitorado com sondas fluorescente.
4. Estudo a distribuição dos peróxidos de cardiolipina na estruturado lipossomo, um mimético de membrana.
5. Estudo da interação do citocromo c com a cardiolipina em modelos mais complexos, por exemplo, utilizando mitoplastos ou mitocôndrias isoladas.
6. Busca e identificação de produtos oxidados da cardiolipina em sistema que simule os estágios iniciais da apoptose.

7. Referências Bibliográficas

- Belikova, N., Vladimirov, Y., Osipov, A., Kapralov, A., Tyurin, V., Potapovich, M., Basova, L., Peterson, J., Kurnikov, I., and Kagan, V. (2006). Peroxidase activity and structural transitions of cytochrome c bound to cardiolipin-containing membranes. *Biochemistry* 45, 4998–5009.
- Belikova, N.A., Tyurina, Y.Y., Borisenko, G., Tyurin, V., Arias, A.K.S., Yanamala, N., Furtmueller, P.G., Klein-Seetharaman, J., Obinger, C., and Kagan, V.E. (2009). Heterolytic Reduction of Fatty Acid Hydroperoxides by Cytochrome c/Cardiolipin Complexes: Antioxidant Function in Mitochondria. *Journal of the American Chemical Society* 131, 11288.
- Blum, H., Beier, H., and Gross, H.. (1987). Improved silver staining of plant-proteins, rna and dna in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8, 93–99.
- Buettner, G.R. (1993). The Pecking Order of Free Radicals and Antioxidants: Lipid Peroxidation, α -Tocopherol, and Ascorbate. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 300, 535 – 543.
- Carbonare, M., and Pathak, M.. (1992). Skin photosensitizing agents and the role of reactive oxygen species in photoaging. *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology* 14, 105–124.
- Daum, G. (1985). Lipids of Mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta* 822, 1–42.
- Dickerson, R.E., and Timkovich, R. (1975). Cytochromes c. In *The Enzymes*. P.D. Boyer, ed. (Academic Press), pp. 397 – 547.
- Dowhan, W. (1997). Molecular basis for membrane phospholipid diversity: Why are there so many lipids. *Annual Review of Biochemistry* 66, 199–232.
- Dunford, H.B. (1999). *Heme peroxidases* (John Wiley).
- Fahy, E., Subramaniam, S., Brown, H., Glass, C., Merrill, A., Murphy, R., Raetz, C., Russell, D., Seyama, Y., Shaw, W., et al. (2005). A comprehensive classification system for lipids. *Journal of Lipid Research* 46, 839–861.
- Fahy, E., Subramaniam, S., Murphy, R.C., Nishijima, M., Raetz, C.R.H., Shimizu, T., Spener, F., van Meer, G., Wakelam, M.J.O., and Dennis, E.A. (2009). Update of the LIPID MAPS comprehensive classification system for lipids. *Journal of Lipid Research* 50, S9–S14.

- Foote, C.. (1968). Mechanisms of photosensitized oxidation - there are several different types of photosensitized oxidation which may be important in biological systems. *Science* 162, 963–&.
- Foote, C.. (1991). Definition of type-i and type-ii photosensitized oxidation. *Photochemistry and Photobiology* 54, 659.
- Foote, C., and Denny, R.. (1971). Chemistry of singlet oxygen. Electronic effects on rate and products of reaction with olefins. *Journal of the American Chemical Society* 93, 5162.
- Genaro-Mattos, T.C., Appolinário, P.P., Mugnol, K.C.U., Bloch Jr., C., Nantes, I.L., Di Mascio, P., and Miyamoto, S. (2013). Covalent Binding and Anchoring of Cytochrome c to Mitochondrial Mimetic Membranes Promoted by Cholesterol Carboxyaldehyde. *Chemical Research in Toxicology* 26, 1536–1544.
- Gorris, H.H., and Walt, D.R. (2009). Mechanistic Aspects of Horseradish Peroxidase Elucidated through Single-Molecule Studies. *Journal of the American Chemical Society* 131, 6277–6282.
- Halliwell, B., and Gutteridge, J. (2007). *Free Radicals in Biology and Medicine* (OUP Oxford).
- Hanske, J., Toffey, J.R., Morenz, A.M., Bonilla, A.J., Schiavoni, K.H., and Pletneva, E.V. (2012). Conformational properties of cardiolipin-bound cytochrome c. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109, 125–130.
- Harding, L.B., and Goddard, W.A. (1980). The mechanism of the ene reaction of singlet oxygen with olefins. *Journal of the American Chemical Society* 102, 439–449.
- Hostetler, K.Y., and Van den Bosch, H. (1972). Subcellular and submitochondrial localization of biosynthesis of cardiolipin and phospholipids in rat liver. *Biochimica et Biophysica Acta* 260, 380–386.
- Iverson, S., and Orrenius, S. (2004). The cardiolipin-cytochrome c interaction and the mitochondrial regulation of apoptosis. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 423, 37–46.
- Kagan, V.E., Borisenko, G.G., Tyurina, Y.Y., Tyurin, V.A., Jiang, J., Potapovich, A.I., Kini, V., Amoscato, A.A., and Fujii, Y. (2004). Oxidative lipidomics of apoptosis: redox catalytic interactions of cytochrome c with cardiolipin and phosphatidylserine. *Free Radical Biology and Medicine* 37, 1963 – 1985.
- Kagan, V.E., Bayir, H.A., Belikova, N.A., Kapralov, O., Tyurina, Y.Y., Tyurin, V.A., Jiang, J., Stoyanovsky, D.A., Wipf, P., Kochanek, P.M., et al. (2009). Cytochrome c/cardiolipin relations in mitochondria: a kiss of death. *Free Radical Biology and Medicine* 46, 1439–1453.

- Kalanxhi, E., and Wallace, C.J.A. (2007). Cytochrome c impaled: investigation of the extended lipid anchorage of a soluble protein to mitochondrial membrane models. *Biochemical Journal* 407, 179–187.
- Kapralov, A.A., Yanamala, N., Tyurina, Y.Y., Castro, L., Samhan-Arias, A., Vladimirov, Y.A., Maeda, A., Weitz, A.A., Peterson, J., Mylnikov, D., et al. (2011). Topography of tyrosine residues and their involvement in peroxidation of polyunsaturated cardiolipin in cytochrome c/cardiolipin peroxidase complexes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1808, 2147 – 2155.
- Kawai, C., Prado, F., Nunes, G., Di Mascio, P., Carmona-Ribeiro, A., and Nantes, I. (2005). pH-dependent interaction of cytochrome c with mitochondrial mimetic membranes - The role of an array of positively charged amino acids. *Journal of Biological Chemistry* 280, 34709–34717.
- Kim, T.-H., Zhao, Y., Ding, W.-X., Shin, J.N., He, X., Seo, Y.-W., Chen, J., Rabinowich, H., Amoscato, A.A., and Yin, X.-M. (2004). Bid-Cardiolipin Interaction at Mitochondrial Contact Site Contributes to Mitochondrial Cristae Reorganization and Cytochrome c Release. *Molecular Biology of the Cell* 15, 3061–3072.
- Laemmli, U.. (1970). Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage-t4. *Nature* 227, 680–&.
- Merrill Jr, A.H., E.-M. Schmelz, Dillehay, D.L., Spiegel, S., Shayman, J.A., Schroeder, J.J., Riley, R.T., Voss, K.A., and Wang, E. (1997). Sphingolipids—The Enigmatic Lipid Class: Biochemistry, Physiology, and Pathophysiology. *Toxicology and Applied Pharmacology* 142, 208 – 225.
- Miyamoto, S., Martinez, G., Medeiros, M., and Di Mascio, P. (2003). Singlet molecular oxygen generated from lipid hydroperoxides by the Russell mechanism: Studies using O-18-labeled linoleic acid hydroperoxide and monomol light emission measurements. *Journal of the American Chemical Society* 125, 6172–6179.
- Mugnol, K.C.U., Ando, R.A., Nagayasu, R.Y., Faljoni-Alario, A., Brochsztain, S., Santos, P.S., Nascimento, O.R., and Nantes, I.L. (2008). Spectroscopic, structural, and functional characterization of the alternative low-spin state of horse heart cytochrome c. *Biophysical Journal* 94, 4066–4077.
- Nakashima, T., Higa, H., Matsubara, H., Benson, A., and Yasunobu, K.T. (1966). Amino acid sequence of bovine heart cytochrome c. *Journal of Biological Chemistry* 241, 1166–&.

- Oellerich, S., Lecomte, S., Paternostre, M., Heimburg, T., and Hildebrandt, P. (2004). Peripheral and integral binding of cytochrome c to phospholipids vesicles. *Journal of Physical Chemistry B* 108, 3871–3878.
- Ott, M., Robertson, J., Gogvadze, V., Zhivotovsky, B., and Orrenius, S. (2002). Cytochrome c release from mitochondria proceeds by a two-step process. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 1259–1263.
- Ow, Y.-L.P., Green, D.R., Hao, Z., and Mak, T.W. (2008). Cytochrome c: functions beyond respiration. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9, 532–542.
- Pangborn, M.C. (1942). Isolation and purification of a serologically active phospholipid from beef heart. *Journal of Biological Chemistry* 143, 247–256.
- Paradies, G., Petrosillo, G., Paradies, V., and Ruggiero, F.M. (2009). Role of cardiolipin peroxidation and Ca²⁺ in mitochondrial dysfunction and disease. *Cell Calcium* 45, 643 – 650.
- Pfeiffer, K., Gohil, V., Stuart, R., Hunte, C., Brandt, U., Greenberg, M., and Schagger, H. (2003). Cardiolipin stabilizes respiratory chain supercomplexes. *Journal of Biological Chemistry* 278, 52873–52880.
- Pinheiro, T.. J. (1994). The interaction of horse heart cytochrome -c with phospholipid bilayers - structural and dynamic effects. *Biochimie* 76, 489–500.
- Pope, S., Land, J.M., and Heales, S.J.R. (2008). Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in neurodegeneration; cardiolipin a critical target? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1777, 794 – 799.
- Rosca, M., Minkler, P., and Hoppel, C.L. (2011). Cardiac mitochondria in heart failure: Normal cardiolipin profile and increased threonine phosphorylation of complex. *Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics* 1807, 1373–1382.
- Russell, G.. (1957). Deuterium-isotope effects in the autoxidation of aralkyl hydrocarbons - Mechanism of the interaction of peroxy radicals. *Journal of the American Chemical Society* 79, 3871–3877.
- Rytomaa, M., and Kinnunen, P. (1995). Reversibility of the binding of cytochrome c to liposomes implications for lipid - protein interactions. *Journal of Biological Chemistry* 270, 3197–3202.
- Schlame, M. (2008). Thematic Review Series: Glycerolipids. Cardiolipin synthesis for the assembly of bacterial and mitochondrial membranes. *Journal of Lipid Research* 49, 1607–1620.

- Schlame, M., and Haldar, D. (1993). Cardiolipin is synthesized on the matrix side of the inner membrane in rat liver mitochondria. *Journal of Biological Chemistry* 268, 74–79.
- Schlame, M., Rua, D., and Greenberg, M.L. (2000). The biosynthesis and functional role of cardiolipin. *Progress in Lipid Research* 39, 257 – 288.
- Shidoji, Y., Hayashi, K., Komura, S., Ohishi, N., and Yagi, K. (1999). Loss of molecular interaction between cytochrome c and cardiolipin due to lipid peroxidation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 264, 343–347.
- Sinibaldi, F., Howes, B.D., Piro, M.C., Polticelli, F., Bombelli, C., Ferri, T., Coletta, M., Smulevich, G., and Santucci, R. (2010). Extended cardiolipin anchorage to cytochrome c: a model for protein-mitochondrial membrane binding. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 15, 689–700.
- Stoscheck, C.M. (1990). Quantitation of protein. In *Guide to Protein Purification*, M.P. Deutscher, ed. (Academic Press), pp. 50 – 68.
- Terao, J., and Matsushita, S. (1977). Products formed by photosensitized oxidation of unsaturated fatty-acid esters. *Journal of the American Oil Chemists Society* 54, 234–238.
- Tuominen, E., Wallace, C., and Kinnunen, P. (2002). Phospholipid-cytochrome c interaction - Evidence for the extended lipid anchorage. *Journal of Biological Chemistry* 277, 8822–8826.
- Tyurina, Y.Y., Kini, V., Tyurin, V.A., Vlasova, I.I., Jiang, J., Kapralov, A.A., Belikova, N.A., Yalowich, J.C., Kurnikov, I.V., and Kagan, V.E. (2006). Mechanisms of Cardiolipin Oxidation by Cytochrome c: Relevance to Pro- and Antiapoptotic Functions of Etoposide. *Molecular Pharmacology* 70, 706–717.
- Vance, D.E., and Vance, J.E. (2008). Chapter 8 - Phospholipid biosynthesis in eukaryotes. In *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes (Fifth Edition)*, D.E. Vance, and J.E. Vance, eds. (San Diego: Elsevier), pp. 213 – VI.
- Vladimirov, Y.A., Proskurnina, E.V., Izmailov, D.Y., Novikov, A.A., Brusnichkin, A.V., Osipov, A.N., and Kagan, V.E. (2006a). Mechanism of activation of cytochrome c peroxidase activity by cardiolipin. *Biochemistry-Moscow* 71, 989–997.
- Vladimirov, Y.A., Proskurnina, E.V., Izmailov, D.Y., Novikov, A.A., Brusnichkin, A.V., Osipov, A.N., and Kagan, V.E. (2006b). Cardiolipin activates cytochrome c peroxidase activity since it facilitates H₂O₂ access to heme. *Biochemistry (Moscow)* 71, 998–1005.

Voet, D., and Voet, J.G. (2004). Biochemistry.

Wagner, B.A., Buettner, G.R., and Burns, C.P. (1994). Free Radical-Mediated Lipid Peroxidation in Cells: Oxidizability Is a Function of Cell Lipid bis-Allylic Hydrogen Content. Biochemistry 33, 4449–4453.

SÚMULA CURRICULAR

DADOS PESSOAIS

Nome: Daniela da Cunha Bataglioli

Local e data de nascimento: Pedreira / SP, 25 de agosto de 1984.

EDUCAÇÃO

ETEC João Belarminio, Amparo / SP, 2002

Ensino Médio

Universidade de São Paulo, São Paulo / SP, 2011

Bacharelado em Química

OCUPAÇÃO

Bolsista de Iniciação Científica, PIBIT – CNPq, 2009 -2010

Bolsista de Iniciação Científica, apoio técnico CNPq nível médio, 2010 – 2011

Bolsista de Mestrado, CNPq, 2012-2014

PUBLICAÇÕES

ARTIGOS ACEITOS PARA PUBLICAÇÃO

Derogis, Priscilla B. M. C. ; Freitas, Florêncio P. ; Marques, Anna S. F.; **Cunha, Daniela** ; Appolinário, Patricia P. ; De Paula, Fernando ; Lourenço, Tiago c. ; Murgu, Michael ; Di Mascio, Paolo ; Medeiros, Marisa H. G. ; Miyamoto, Sayuri . The Development of a Specific and Sensitive LC-MS-Based Method for the Detection and Quantification of Hydroperoxy and Hydroxydocosahexaenoic Acids as a Tool for Lipidomic Analysis. Plos One ^{JCR}, v. 8, p. 77561, 2013.

Miyamoto, Sayuri; Nantes, Iseli L.; Faria, Priscila A.; **Cunha, Daniela**; Ronsein, Graziella E.; Medeiros, Marisa H. G.; Di Mascio, Paolo. Cytochrome c-promoted cardiolipin oxidation generates singlet molecular oxygen. *Photochemical & Photobiological Sciences* ^{JCR}, v. 11, p. 1536, 2012.

RESUMOS EM CONGRESSOS

Cunha, D. ; Genaro-Mattos, T. C. ; Miyamoto, Sayuri. Binding and Peroxidase activity of cytochrome c in presence of liposomes containing cardiolipin hydroperoxide. In: Antioxidants and Redox Process in Health – Bilateral Meeting Brazil Japan - Satellite Meeting of 6 ICPH and VIII Meeting of the SFRBM - South America. São Paulo, 2013.

Cunha, D. ; Genaro-Mattos, T. C. ; Miyamoto, Sayuri . Peroxidase activity induced by cardiolipin hydroperoxides in cytochrome c-cardiolipin complex. In: XLII Annual Meeting of SBBq, 2013, Foz do Iguaçu 2013. v. P-T015.

Derogis, P.B.M.C. Freitas, F. P. ; Marques, A. S. F. ; **Cunha, D.** ; Appolinário, P.P. ; Paula, F. ; Lourenco, T. T. ; Murgu, M. ; Di Mascio, P. ; Medeiros, M. H. G. ; Miyamoto, S. . Quantification of hydroperoxy- and hydroxydocosahexaenoic acid as tool for oxy-lipidomic analysis. In: XLII Annual Meeting of SBBq, 2013, Foz do Iguaçu. Livro de Resumos, 2013. p. T056.

Cunha, D. ; Derogis ; Yamaguiti, T. H. ; Miyamoto, S. . Analysis of cardiolipin and cardiolipin hydroperoxides by HPLC-MS/MS. In: Free Radicals in Brazil, 2011, Sao Pedro. Program Book Proceedings, 2011. p. 142-143.