Existência de Diferentes Estados de Spin dos Íons Fe^{2+} e Fe^{3+} do Citocromo *c* Resultante da Interação com Liposssomos Modelos.

USP/IFSC/SBI

8-2-001404

Maria do Rosário Zucchi

Tese apresentada ao Instituto de Física de São Carlos, da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de doutor em Ciências: Física Aplicada.

Orientador: Prof. Dr. Otaciro Rangel Nascimento

São Carlos
2001

IFSC-USP SERVIÇO DE BIBLIOTECA E INFORMAÇÃO

Zucchi, Maria do Rosário
Existência de Diferentes Estados de Spin Íons Fe^{2+} e Fe^{3+} do Citocromo *c* Resultante da Interação com Lipossomos Modelos / Maria do Rosário Zucchi.--São Carlos, 1993.
82 p.

Tese (Doutorado)--Instituto de Física de São Carlos, 2001.

Orientador: Prof. Dr. Otaciro Rangel Nascimento

1. Citocromo *c*. 2. Ressonância Paramagnética Eletrônica. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Instituto de Física de São Carlos

Caixa Postal 369
13560-970 São Carlos, SP
Av. Trabalhador São-carlense, 400,
13566-590 São Carlos, SP

Fone/Fax 16 273 9777
www.if.sc.usp.br
wladerez@if.sc.usp.br

MEMBROS DA COMISSÃO JULGADORA DA TESE DE DOUTORADO DE MARIA DO ROSÁRIO ZUCCHI APRESENTADA AO INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS, DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, EM 04 DE MAIO DE 2001.

COMISSÃO JULGADORA:

Prof. Dr. Otaciro Rangel Nascimento/IFSC-USP

Prof. Dr. José Pedro Donoso Gonzalez/IFSC-USP

Prof. Dr. Cláudio José Magon/IFSC-USP

Prof. Dr. Marcel Tabak/IQSC/USP

Dr. Ladislau Martin Neto/EMBRAPA

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Otaciro Rangel Nascimento pela orientação neste trabalho, pela sua confiança, pela paciência e pela amizade.

Ao Prof. Dr. José Cláudio Magon, à Profª. Drª. Adelaide Faljoni-Alário e à Profª. Drª. Iseli Lourenço Nantes que contribuíram significativamente para a realização deste trabalho. Às mencionadas três pessoas também agradeço pela amizade e pela ótima convivência.

Ao meu ex-orientador Prof. Dr. Tito José Bonagamba pela amizade e pelos conselhos.

A Derminda Isabel de Moraes, Sueli Dotta, Andressa Patrícia Alves Pinto e Roberto Fukuhara pelo apoio técnico, pela ajuda e pela amizade.

Aos meus companheiros do grupo de Biofísica, Gláucia, Ane, Daiane, Leandro e Ronny e Cristina Nordi. Em especial, a Ednalva Aparecida Vidotto, Antônio José da Costa Filho e Cecília S. Caruzo pelo auxílio e pelas discussões durante todo o trabalho.

Ao Prof. Dr. Richard Garrat e a Carlos Tomich pela ajuda nos cálculos de modelagem. Em especial, a Paulo Henrique C. Godoi pelas discussões e pela ajuda.

Às meninas da Biblioteca, Mara, Betânia e Neuza, que sempre atenderam com a maior boa vontade e competência.

A Wladerez pela ajuda e pela atenção.

Aos técnicos do laboratório de Criogenia, em especial a Aldimar Tadeu J. Constante e a Luciano Lopes Felippe, pela boa vontade em sempre colaborar com o fornecimento do hélio.

A minha amiga Cristiane Barbieri Rodella por ter me abrigado em sua casa nesses últimos meses.

Aos meus amigos de toda hora, Claudia Bonardi, Cristiane, Ednalva, Henrique, Ana Tereza, Nazareno, Eduardo, Cláudia, Fábio, Queite, Roberto, Claudia Pio, Elisa, Prof. Rene, Iná, Lígia, Rosana, Caio e Rodrigo, realmente, por tornar esses anos muito mais agradáveis.

A minha família pelo apoio.

Ao meu marido Fran pelo apoio e pela compreensão.

Ao CNPq e à Fapesp pelo apoio financeiro.

ÍNDICE

	Índice	*i*
	Resumo	*ii*
	Abstract	*iii*
I.	*Introdução*	*1*
II.	*Considerações Teóricas*	*11*
	II.1. Ressonância Paramagnética Eletrônica	*13*
	II.2.Ressonância Paramagnética Eletrônica Pulsada	*19*
	II.3.Dicroísmo Circular Magnético	*24*
III.	*Materiais e Métodos*	*31*
	III.1. As amostras	*31*
	III.2.Descrição dos Equipamentos	*34*
	III.2.1.Espectropolarímetro de MCD	*34*
	III.2.2.Espectrômetro de RPE CW	*34*
	III.2.3.Espectrômetro de RPE Pulsado	*36*
	III.3.Manipulação dos dados	*38*
IV.	*Resultados*	*41*
	IV.1. Ressonância Paramagnética Eletrônica	*41*
	IV.2. Dicroísmo Circular Magnético e Espectroscopia de Absorção Eletrônica	*50*
V.	*Discussão*	*59*
VI.	*Perspectivas*	*71*
	VI.1. RPE Pulsado	*71*
	VI.2. Peroxidação lipídica com t-butil peróxido	*76*
VII.	*Conclusão*	*77*
VIII.	*Referências Bibliográficas*	*78*

RESUMO

A associação lipídio/citocromo *c* é importante e deve ser estudada, pois repercute na atividade peroxidática da proteína abordada e pode contribuir para o processo apoptótico, ou morte programada da célula, e também desempenha um papel significativo na cadeia respiratória.

A natureza e a especificidade da interação do citocromo *c* com bicamadas lipídicas têm sido bastante investigadas ultimamente, mas informações detalhadas e precisas sobre tais assuntos ainda não existem. É aceito que ocorre primeiramente uma interação eletrostática entre a proteína citocromo *c* e as membranas fosfolipídicas. Em seguida, há uma interação hidrofóbica. Entretanto, ainda não é bem compreendido o papel da cadeia fosfolipídica.

A associação do citocromo *c* com membranas lipídicas induz mudanças no estado de spin do átomo de ferro. A interação entre as vesículas carregadas e o citocromo *c* induz mudanças estruturais na proteína, as quais são refletidas no seu centro ativo, ou grupo heme. As mudanças do campo cristalino no sítio do ferro hemínico de forte para fraco são acompanhadas por mudanças do estado de spin de baixo para alto, respectivamente. Neste trabalho, estuda-se sistematicamente a natureza da interação entre o citocromo *c* e a cadeia fosfolipídica. As mudanças estruturais no grupo heme foram correlacionadas com a natureza do lipídio, ou seja, com a carga da cabeça e com o tamanho e o tipo da cadeia fosfolipídica. Foram utilizados treze lipídios diferentes, naturais e sintetizados, com cabeças polares negativas e neutras e com cadeias carbônicas saturadas e insaturadas de diferentes comprimentos. Para tal investigação, utilizamos as técnicas: Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE) Onda Contínua (CW) e Pulsada (PW) e Dicroísmo Circular Magnético (MCD). As técnicas enunciadas avaliam as mudanças de estado de spin e a simetria do citocromo *c* nos seus estados férrico e ferroso. A interação lipoprotéica lipídio/citocromo *c* foi avaliada com lipídios diferentes, inclusive com o lipossomo PCPECL, que mimetiza a membrana interna da mitocôndria nos eucariontes. A partir dos resultados experimentais, sugerimos um modelo para esse tipo de associação.

ABSTRACT

This association lipid/cytochrome c is interesting to study in order to understand the peroxidase activity of this protein, that plays an important role in the respiratory chain and in the apoptosis process or the programmed cell death.

The nature and specificity of the interaction of cytochrome c with lipid bilayers have been major goals in recent studies, but detailed information on that issue is not yet widely available. In this regard, it is generally accepted that the electrostatic interaction is an important factor in the association of cytochrome *c* with phospholipid membranes, followed by a hydrophobic interaction. However, the role played by the phospholipid chain is not well understood.

The association of cytochrome *c* with negative membranes induces a change in the heme iron spin state. The interaction between the charged vesicles and cytochrome *c* leads to structural changes in the active central or heme group. The changing of the crystalline field of the heme iron from strong to weak is accompanied by spin states changes from low to high spin, respectively. These facts concerned us to investigate more systematically the nature of the interaction between cytochrome *c* and the phospholipid chains. The lipid-induced effects in the heme iron crystalline field are correlated to the nature of the charged head group and to the size and type of the phospholipid chain. Thirteen different lipids, nature and synthetic, were used, with negative and neutral polar head group and saturated and unsaturated acyl chains with different length. This work investigates the change of heme iron spin state and symmetry of ferric cytochrome *c* using Continuous Wave (CW) and pulsed (PW) Electron Paramagnetic Resonance (EPR) and Magnetic Circular Dichroism (MCD) techniques. These techniques analyze the spin state change and the symmetry of the iron cytochrome *c* in its ferric and ferrous states. The effect of the different lipids were analyzed, including PCPECL membrane that mimetics the inner mitocondrial membrane in eukaryotes.

I.INTRODUÇÃO

Este trabalho envolve a interação da proteína citocromo *c*, proteína periférica da membrana interna da mitocôndria, com vesículas lipídicas. Para situar o estudo em questão, serão apresentados alguns conceitos: os fosfolipídios, as membranas biológicas, detalhes estruturais do citocromo *c* e a interação lipídio/citocromo *c* como uma revisão bibliográfica.

Os fosfolipídios

Lipídios são compostos extraídos de tecidos biológicos pelo uso de solventes de baixa polaridade como éter, clorofórmio, etc.. Os lipídios possuem várias funções biológicas importantes como reserva energética, hormônios, detergentes biológicos e elementos estruturais de membranas. Nessa categoria, destaca-se o grupo dos fosfolipídios que incluem os glicerofosfolipídios e os fosfoesfingolipídios.

As moléculas de fosfolipídios apresentam basicamente uma cabeça polar, um grupo fosfato e duas cadeias carbônicas (apolares ou hidrofóbicas). A propriedade anfifílica dos fosfolipídios permite que a interação com a água crie interfaces e possibilite a separação dos compartimentos celulares contendo soluções aquosas. As Figuras I.1 e I.2 a seguir ilustram diagramas esquemáticos de fosfolipídios.

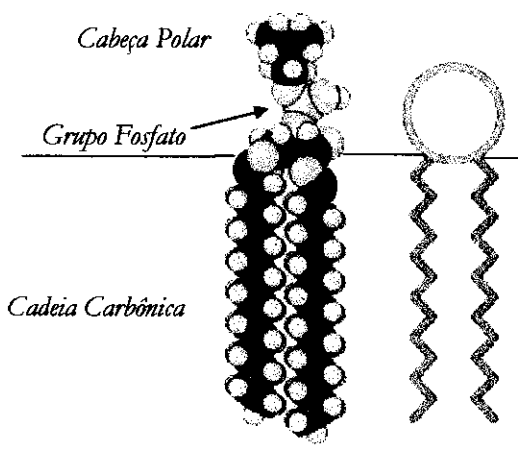


Figura I.1. Representação esquemática de um fosfolipídio.

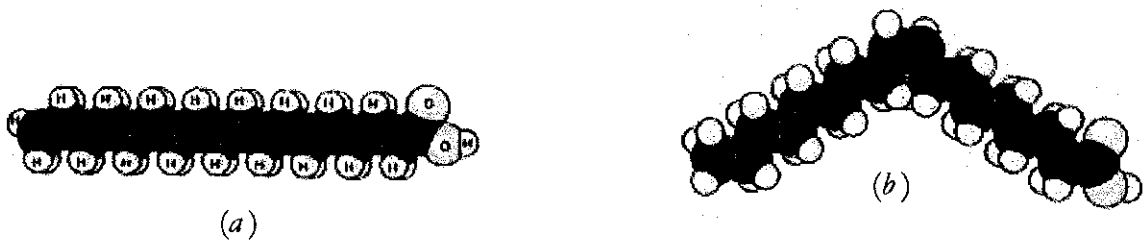


Figura I.2. Representação esquemática (*a*) do ácido esteárico ($CH_3(CH_2)_{16}COOH$) e (*b*) do ácido oléico ($CH_3(CH_2)_7{=}CH_3(CH_2)_7COOH$).

As propriedades dos lipídios têm sido estudadas em dois tipos de sistemas bem definidos: as vesículas lipídicas e as bicamadas de membranas planares. As vesículas lipídicas, ou lipossomos, são compartimentos aquosos envolvidos por uma bicamada lipídica (veja a Figura I.3). Elas são formadas pela suspensão do lipídio, por exemplo a fosfatidilcolina, em meio aquoso que é sonicada, isto é agitada com ultra-som, para obter a dispersão das vesículas fechadas em tamanhos menores e quase uniformes.

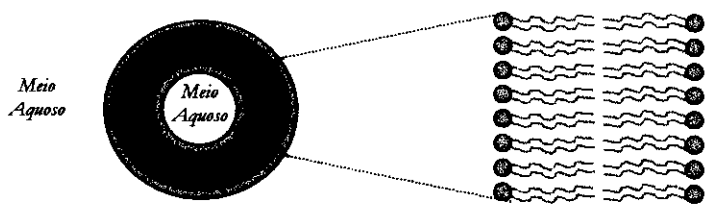


Figura I.3. Representação esquemática de uma vesícula lipídica ou lipossomo.

As membranas

As membranas biológicas possuem como base estrutural uma bicamada de fosfolipídios de diferentes composições. Proteínas diferentes interagem de forma peculiar com as bicamadas lipídicas, formando um *aparelho* biológico de fundamental importância para a vida.

Essas proteínas mediam funções distintas nas membranas, como transporte, comunicação e transdução de energia. As membranas em geral diferem na composição lipídica, a qual reflete a especialização celular.

Algumas proteínas estão apenas associadas à superfície da membrana e podem ser dissociadas por processos relativamente fáceis, como através de uma solução de alta força

iônica. Entretanto, outras proteínas de membrana estão total ou parcialmente inseridas na bicamada lipídica e somente podem ser separadas com o uso de detergentes ou solventes orgânicos. Essa diferença de dissociabilidade tem levado alguns investigadores a classificar as proteínas de membrana como periféricas ou integrais (Figura I.4). Várias de tais proteínas exibem atividades biológicas vitais para a célula, como por exemplo, os citocromos.

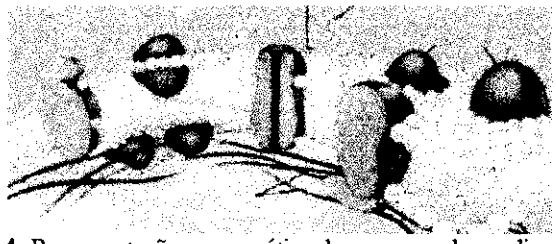


Figura I.4. Representação esquemática de uma membrana lipo-proteica.

Os citocromos

Os citocromos são hemoproteínas constituídas de uma cadeia polipeptídica e uma molécula planar contendo um íon de ferro (grupo prostético) conhecido como grupo heme (Figura I.5). Nos citocromos, o ferro hemínico pode alternar seu estado de oxidação passando do estado reduzido (Fe^{2+}) para o estado oxidado (Fe^{3+}).

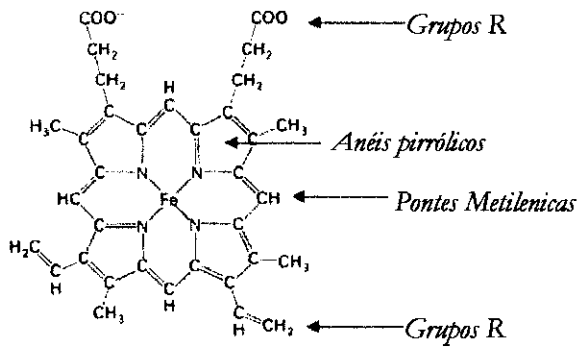


Figura I.5. Grupo heme.

De acordo com os ligantes dos seus anéis pirrólicos (grupos R) e de acordo com o modo como o anel porfirínico se associa à cadeia polipeptídica, os citocromos são classificados em grupos: *a*, *b*, *c* e *f*. Esses grupos possuem estruturas e propriedades distintas. O grupo prostético dos citocromos *b*, c_1, e *c* são ferro porfirinas, comumente chamadas heme. No citocromo *b*, o heme não está ligado covalentemente à proteína, enquanto que, no caso dos citocromos do tipo *c*, o heme está ligado covalentemente à proteína através de pontes tioeter formadas com resíduos do aminoácido cisteína. Os citocromos *a* e a_3 têm um grupo prostético diferente, chamado heme A. A maioria dos citocromos está envolvida na transdução de energia

para produzir ATP através da oxidação de metabólitos ou por fotossíntese e se encontra diretamente associada a sistemas de membranas. Os citocromos *b*, c_1, *c*, *a* e a_3 estão localizados na mitocôndria. As mitocôndrias são organelas que têm como função a produção de energia através da respiração celular (Glicose+O_2 → H_2O+CO_2+ energia em forma de ATP) (Figura I.6).

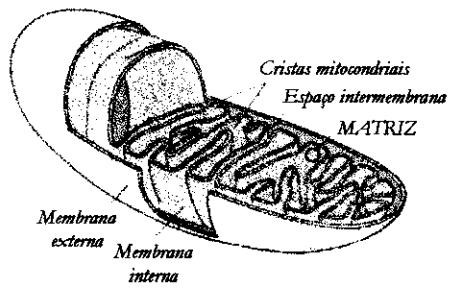


Figura I.6. Diagrama de uma mitocôndria.

Moléculas de ATP são geradas em três estádios do fluxo de elétrons através da cadeia transportadora, do NADH até o O_2. Os três estádios são: 1) entre o NADH e CoQ, 2) entre o citocromo *b* e o citocromo *c* e 3) entre o citocromo *c* e O_2 (Figura I.7).

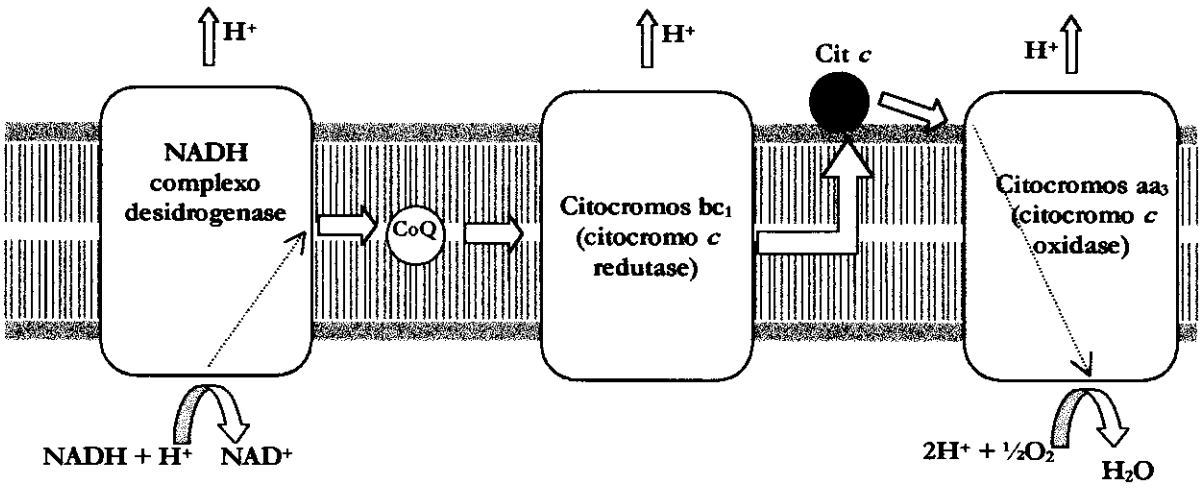


Figura I.7. Diagrama simplificado da cadeia transportadora de elétrons da mitocôndria. Elétrons fluem do complexo NADH desidrogenase através da Coenzima Q para o complexo citocromo b-c_1. O citocromo *c* é uma proteína pequena e solúvel da membrana periférica que carrega elétrons do complexo b-c_1 para o complexo citocromo oxidase a-a_3.

Os citocromos *b*, c_1 e *f* são encontrados nos cloroplastos, que são organelas presentes nas células eucariontes vegetais. Essas organelas atuam na fotossíntese e possuem, como principal pigmento captador de luz, a clorofila. Os citocromos *P450* e *b5* são encontrados na membrana mitocondrial externa e no retículo endoplasmático liso. O retículo endoplasmático é um sistema de membranas com várias funções: produção de lipídios, desintoxicação de substâncias, produção de proteínas, transporte de substâncias, etc..

O citocromo c

Em eucariontes, o citocromo *c* está localizado na intermembrana da mitocôndria e, como já se relatou, atua na cadeia transportadora de elétrons carregando um elétron do complexo citocromo b-c_1 para o complexo citocromo oxidade a-a_3, ambos proteínas integrais de membrana.

O citocromo *c* de coração de cavalo é uma das proteínas mais bem caracterizadas em termos de sua estrutura tanto em estado cristalino (Takano *e col.*, 1973; Bushnell *e col.*, 1990) como em solução (Banci *e col.*, 1997). Esse citocromo é uma hemoproteína contendo uma cadeia polipeptídica simples de 104 aminoácidos. Quanto à estrutura secundária, o citocromo *c* pode ser descrito como sendo composto por três hélices-α maiores e duas hélices-α menores interconectadas pela cadeia polipeptídica envolvendo o heme em um arranjo esférico (Figura I.8). O grupo heme não está completamente protegido pelo arranjo polipeptídico da proteína, sobrando poucos átomos do anel porfirínico expostos ao solvente. Outra característica importante dessa seqüência de aminoácidos é o alto teor de lisinas, o que faz do citocromo *c* uma proteína muito básica, com ponto isoelétrico 10. Em pH neutro, o citocromo *c* posui carga líquida positiva de 8 unidades. A distribuição das cargas positivas aparece em maior parte a partir do resíduo da lisina 19, o que confere `a proteína um momento de dipolo elétrico de 325 e 308 D para a forma oxidada e a forma reduzida, respectivamente. O potencial de redução do citocromo *c* é de +260 mV.

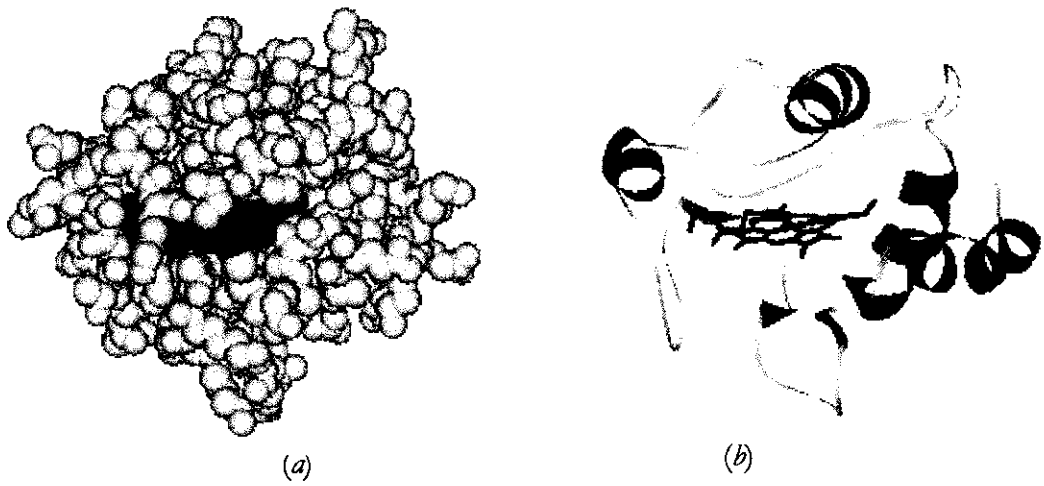


Figura I.8. Representação do citocromo *c* ilustrando (a) representação atômica usando o modelo de esferas e (b) representação por *ribbons*, utilizando-se o programa *LabView*. Em ambas as representações, o grupo heme está ilustrado em azul.

Como todo citocromo do tipo *c*, o citocromo *c* respiratório possui o grupo heme covalentemente ligado à cadeia polipeptídica da proteína através de pontes tioeter com dois resíduos de cisteína 14 e 17. O átomo de ferro está coordenado octaedralmente com os ligantes axiais próximos da histidina 18 e da metionina 80. Esses dois ligantes axiais (o enxofre da metionina 80 e o nitrogênio da histidina 18) formam ligações do tipo ligantes fortes e mantêm o heme em um estado de baixo spin na forma de oxidação Fe^{3+} do citocromo *c* (Feher, 1970) (Figura I.9).

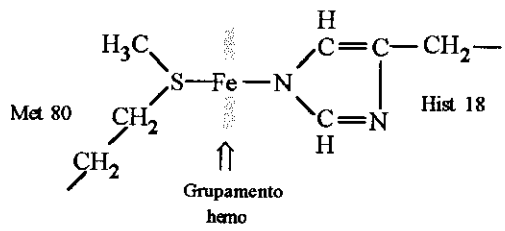


Figura I.9. O átomo de ferro hemínico do citocromo *c* férrico liga-se a um átomo de enxofre de uma metionina e a um átomo de nitrogênio de uma histidina.

A sexta coordenação do átomo de ferro, Fe–S (Met 80), não é considerada particularmente uma ligação estável. De fato, a ligação Fe–S é facilmente quebrada por aumento do pH ou por aumento da temperatura (Wüthrich *e col.*, 1971) ou o enxofre é substituído por ligantes aniônicos, como CN^-, N_3^-, ou imidazol (Sutin & Yandell, 1972). O enfraquecimento da ligação Fe–S constitui o mecanismo chave para a transição do estado de spin baixo para o estado de spin alto do átomo de ferro do heme no citocromo *c*. Quando

ocorre a perda da ligação do ferro hemínico com a metionina 80, um pequeno domínio da seqüência dos resíduos de 78 a 90 move-se, afastando-se do heme. Esse movimento usualmente ocasiona uma abertura e uma conseqüente exposição do heme, o que pode facilitar o transporte de elétrons.

A multiplicidade de funções já caracterizada para o citocromo *c* pode explicar a seqüência altamente conservada, nos diversos seres vivos, da referida proteína, cuja estrutura tridimensional e cuja resolução atômica já são conhecidas há muitos anos (Takano *e col.*, 1973).

O citocromo *c*, diferentemente dos outros componentes da cadeia respiratória, que são proteínas grandes e integrais de membrana, é uma proteína pequena e periférica ligada à face externa da membrana interna da mitocôndria. Por isso, o citocromo *c* é considerado um carreador móvel com múltiplas funções quando em fase aquosa. Sendo uma hemoproteína, o citocromo *c* pode atuar como peroxidase/oxidase. Devido à sua localização (lado externo da membrana interna da mitocôndria), o citocromo *c* pode atravessar a membrana externa e disparar a apoptose no citossol.

Apoptose, ou morte celular programada, é um tipo de *autodestruição celular* que requer energia e síntese protéica para a sua execução. Esse fenômeno está relacionado com a homeostase na regulação fisiológica do tamanho dos tecidos, exercendo um papel oposto ao da mitose. Portanto, consiste em um tipo de morte programada, desejável e necessária, que participa na formação dos órgãos e que persiste em alguns sistemas adultos como a pele e o sistema imunológico.

Diferentemente da necrose, na apoptose não existe liberação do conteúdo celular para o interstício e portanto não se observa inflamação ao redor da célula morta. A necrose representa um fenômeno degenerativo irreversível, causado por uma agressão intensa.

Evidências recentes suportam o conceito de que o crescimento tumoral *in vivo* depende da evasão dos mecanismos homeostáticos de controle que operam via indução de morte celular por apoptose. A indução de apoptose, seja através de mecanismos imunológicos seja por outros mecanismos homeostáticos específicos, parece ser extremamente importante no processo de eliminação de células sofrendo transformação maligna. Danos não reparáveis no DNA (por mutações ou infecções virais) aparentemente iniciam o processo de apoptose. É importante salientar que muitos dos genes que condicionam a proliferação celular (chamados oncogenes e genes supressores de tumores) estão também envolvidos na iniciação do

processo de apoptose. Assim, a apoptose representa um mecanismo de eliminação seletiva de células que poderiam prejudicar o bem estar do organismo.

Resultados de investigações mais recentes (Yang *e col.*, 1997) têm mostrado que o citocromo *c* migra para o meio citossólico e participa do mecanismo apoptótico não como transportador de elétrons mas com ação peroxidática.

A interação lipídio-citocromo c

Estudos do complexo citocromo *c*/membrana vêm sendo realizados com uma variedade de espécies lipídicas e condições experimentais, usando bicamadas lipídicas simples e multicomponentes em filmes de lipídios orientados ou em multicamadas dispersas (Nicholls, 1974; Shipley *e col.*, 1969; Gulik-Krzywicki *e col.*, 1969; Papahadjopoulos *e col.*, 1975; Van Griffith, 1975; Brown & Wüthrich, 1977; Mac Naugtan *e col.*, 1985; Morse & Deamer, 1973; Tessie, 1981; Szebene & Tollin, 1988; Cullis & de Kruijff, 1979). Essas investigações têm demonstrado a natureza dupla da interação entre o citocromo *c* e as membranas lipídicas. Experimentos têm demonstrado que a ligação é iniciada por uma interação eletrostática com a superfície da membrana, seguida por uma interação hidrofóbica entre a proteína e a cadeia carbônica do lipídio no interior da referida membrana (Gulik-Krzywick *e col.*, 1969; Papahadjopoulos *e col.*, 1975; Tessie, 1981; Szebeni & Tollin, 1988; Cullis & de Kruijff, 1979). A ligação do citocromo *c* com os fosfolipídios acídicos, inclusive com a cardiolipina, que é um importante componente da membrana interna da mitocôndria (Daum, 1985), induz mudanças estruturais locais envolvendo imediatamente o ambiente e a coordenação do grupo heme (Vicent & Levin, 1986; Vicente *e col.*, 1987; Hildebrandt & Stockburger, 1986; 1989a,b; Heimburg *e col.*, 1991), como também maiores alterações na conformação do esqueleto estrutural da proteína, inclusive a perda e a desestabilização de sua estrutura (Jori *e col.*, 1974; Muga *e col.*, 1991; Spooner & Watts, 1991a; de Jongh *e col.*, 1992; Heimburg & Marsh, 1993). Correspondentemente, a ligação da membrana com o citocromo *c* pode alterar a estrutura da fase do lipídio, induzindo possivelmente uma estrutura miscelar invertida (Cullis & Kruijff, 1979; de Kruijff & Cullis, 1980; Rietveld *e col.*, 1983; Mustonen *e col.*, 1987; Spooner & Watts, 1991b, 1992; Pinheiro & Watts, 1994a,b). Essa última observação tem dado suporte para a sugestão de que fosfolipídios acídicos podem estar funcionalmente envolvidos na importação

de proteínas para a mitocôndria (Jordi & Kruiff, 1995; Henning & Neupert, 1981; Pfanner *e col.*, 1987; Jordi *e col.*, 1989).

Interações eletrostáticas entre o citocromo *c* e membranas carregadas negativamente são bem documentadas, entretanto o envolvimento de interações hidrofóbicas ainda tem gerado controvérsias. Esse conceito foi originalmente proposto baseado na observação de que o citocromo *c* promove permeabilidade iônica em vesículas fosfolipídicas (Kimelberg & Papahadjopoulos, 1971) e pode tanto induzir mudanças significativas no interior da região hidrofóbica da membrana lipídica (Gulik-Krzwicki *e col.*, 1969) como modificações da temperatura na transição de fase da referida membrana (Papahadjopoulos *e col.*, 1975). Entretanto, tanto há estudos espectroscópicos e de difração de raios-X que discordam da hipótese de penetração da proteína na região hidrofóbica da bicamada lipídica (Van & Griffith, 1975; MacNaughtan *e col.*, 1985) como há também resultados espectroscópicos que indicam que a penetração ocorre (Brown & Wüthrich, 1977; Morse & Deamer, 1973; Tessie, 1981; Szebeni & Tollin, 1988).

Estudos utilizando medidas de cinética por espectroscopia óptica (Szebeni & Tollin, 1988), métodos eletroquímicos (Salamon & Tollin, 1991a,b) e fluorescência (Rytömaa & Kinnunen, 1995) têm sustentado a idéia de que tanto as interações eletrostáticas como as hidrofóbicas podem ocorrer entre o citocromo *c* e a membrana lipídica.

Neste trabalho, objetiva-se estudar sistematicamente a natureza da interação entre o citocromo *c* e a cadeia fosfolipídica. As mudanças estruturais no grupo heme estão sendo correlacionadas com a natureza do lipídio, ou seja, com a carga da cabeça e com o tamanho e o tipo da cadeia fosfolipídica. As técnicas Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE) Onda Contínua (CW) e Pulsada (PW) e Dicroísmo Circular Magnético (MCD) foram utilizadas, pois permitem avaliar as mudanças de estado de spin e a simetria do citocromo *c* nos seus estados férrico e ferroso. A interação lipoprotéica lipídio/citocromo *c* foi estudada com lipídios diferentes, inclusive com o lipossomo PCPECL, que mimetiza a membrana interna da mitocôndria nos eucariontes. A partir dos resultados experimentais, sugerimos um modelo para esse tipo de associação. A associação lipídio/citocromo *c* é importante pois repercute na atividade peroxidática da proteína abordada, a qual desempenha um papel significativo na cadeia respiratória e no fenômeno da apoptose celular.

Este texto está dividido em sete capítulos: I. Introdução, II. Considerações Teóricas, III. Material e Métodos, IV. Resultados, V. Discussão, VI. Perspectivas e VII. Conclusões. No

IFSC-USP

Capítulo II, faz-se uma introdução teórica sobre as técnicas espectroscópicas utilizadas. No Capítulo III, apresentam-se a metodologia da preparação das amostras, a descrição dos equipamentos utilizados e o tratamento dos dados. No Capítulo IV, os resultados são apresentados. Os Capítulos V, VI e VII contêm as discussões dos resultados, as perspectivas e as conclusões do trabalho.

II.CONSIDERAÇÕES TEÓRICAS

O íon ferro em hemoproteínas

Um átomo de ferro possui 26 elétrons, sendo que 18 estão em camadas fechadas e 8 estão na configuração orbital $3d^6\ 4s^2$. Nas hemoproteínas, os átomos de ferro aparecem geralmente no estado Fe^{3+} (férrico) e no estado Fe^{2+} (ferroso) e as configurações orbitais são, respectivamente, $3d^5$ e $3d^6$. A camada 3d consiste de 5 orbitais que podem acomodar no máximo 10 elétrons (dois por cada orbital com spins opostos, como é requerido pelo Princípio de Exclusão de Pauli). A dependência angular das cinco funções de ondas (orbitais) ortogonais em um campo com simetria octaédrica é ilustrada na Figura II.1, a seguir:

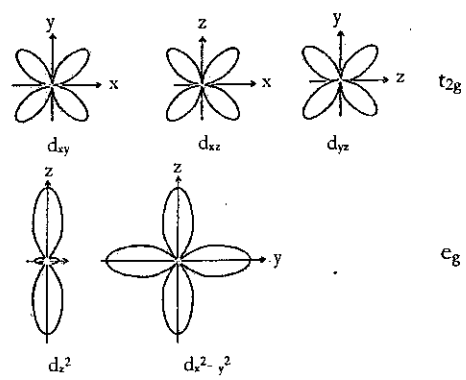


Figura II.1. Dependência angular das funções de onda 3d.

Os orbitais d_{xy}, d_{xz} e d_{yz} são denominados t_{2g} e os orbitais d_{z^2} e $d_{x^2-y^2}$ são chamados e_g. No íon livre, os cinco orbitais apresentam a mesma energia, ou seja, o estado fundamental é pentadegenerado. Na teoria do campo cristalino, os ligantes são substituídos por cargas puntiformes negativas que vão dar origem a um campo elétrico que atua sobre o íon paramagnético. No campo cristalino, o efeito dos ligantes vizinhos não é o mesmo sobre todos os orbitais d e, sendo assim, a degenerescência é levantada, de modo que o desdobramento dos níveis de energia degenerados deverá ser sensível à simetria da vizinhança (Feher, 1969).

No estudo das hemoproteínas, pode-se usar a suposição de que o íon ferro está octaedricamente coordenado a 6 ligantes carregados negativamente. Os orbitais *d*, no centro

desse octaedro, serão desdobrados. Os três orbitais t_{2g} evitam os vértices negativos do octaedro, enquanto os orbitais e_g apontam diretamente para as cargas negativas (Figura II.2).

Nesse caso, a energia Coulombiana de repulsão é grande e os orbitais e_g estarão com uma energia maior. A diferença de energia entre os orbitais t_{2g} e e_g é chamada de parâmetro de campo cristalino Δ. Esse valor depende do composto - em grupos heme é da ordem de 10^4 cm^{-1} (Feher, 1970).

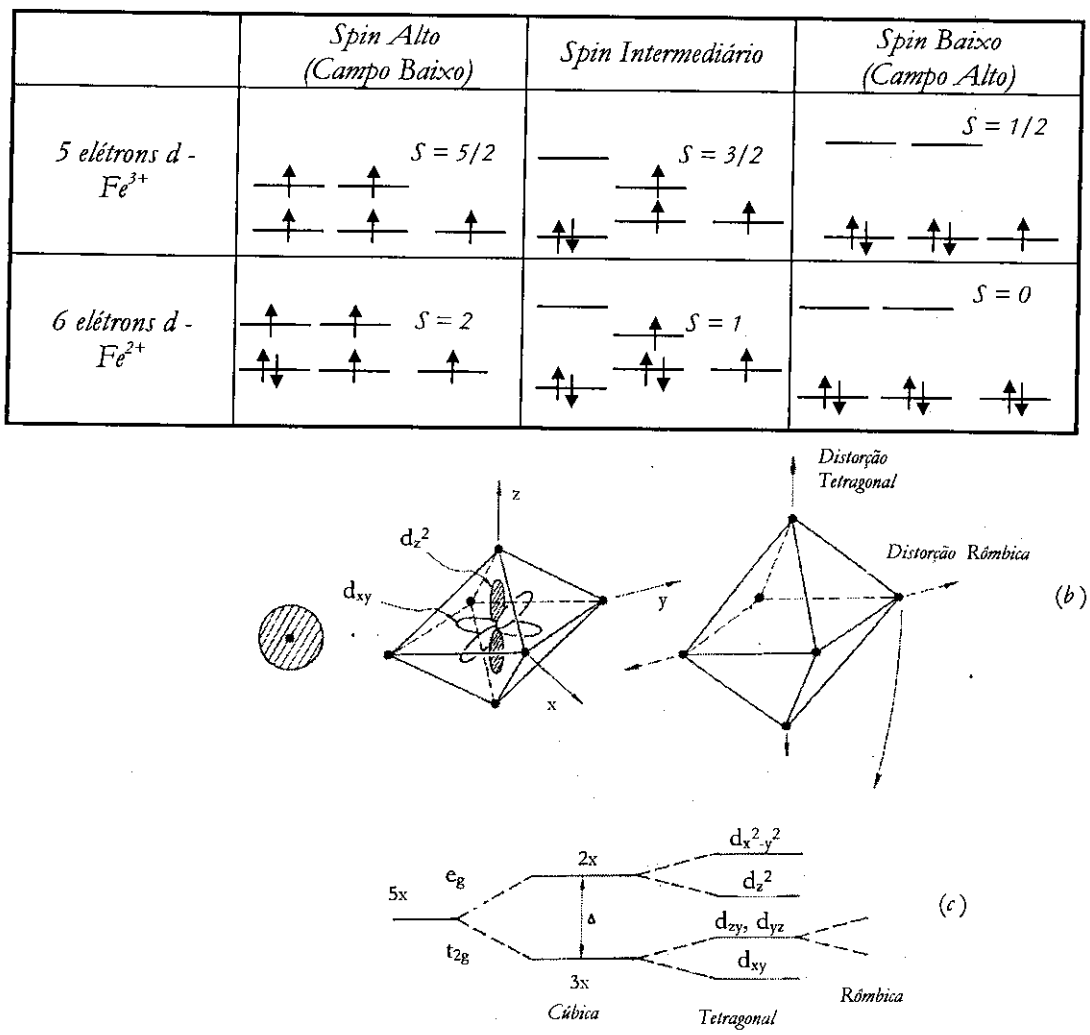


Figura II.2. (a) Possíveis valores de spin ou ocupações dos orbitais *d* pelos elétrons dos íons Fe^{2+} e Fe^{3+}. (b) Efeito do campo cristalino sobre os níveis de energia dos orbitais *d*: íon metálico livre (simetria esférica), geometria octaédrica e geometria octaédrica com distorção tetragonal. (c) Representação esquemática dos níveis de energia.

Dependendo da intensidade do desdobramento do campo cristalino Δ, que levanta a degenerescência dos orbitais, tem-se a configuração de spin baixo ou alto. Assim, ligantes fortes, como o cianeto $(CN)^-$, fornecem uma configuração de spin baixo para o Fe^{3+}e ligantes fracos, como a água, fornecem uma configuração de spin alto para o Fe^{3+}. A Figura II.2.a ilustra as possíveis ocupações dos orbitais *d* pelos elétrons dos íons Fe^{3+} e Fe^{2+}. As Figuras II.2.b e II.2.c ilustram o efeito do campo cristalino Δ e os níveis de energia para cada situação.

II.1. Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica

A Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE) é o fenômeno de absorção de energia pelos elétrons desemparelhados de um átomo, de uma molécula ou de um íon quando se encontram sob exposição a um campo magnético (Pake & Estle, 1973).

A RPE é bastante utilizada em estudos de sistemas biológicos (Feher, 1970; Rojo *e col.*, 1993) como uma ferramenta muito importante na compreensão tanto da estrutura local do centro paramagnético como de mecanismos funcionais.

Entre as espécies paramagnéticas presentes em materiais biológicos, existem as hemoproteínas, que possuem um centro paramagnético composto por um átomo de Fe^{3+}. A técnica de RPE pode ser utilizada na determinação da simetria em que o sítio paramagnético está envolvido e na determinação de radicais produzidos durante reações de oxi-redução e peroxidação de lipídios. Uma desvantagem dessa técnica, em relação ao estudo das hemoproteínas, é a necessidade da utilização de temperaturas criogênicas pois os sinais procedentes do Fe^{3+} necessitam de temperaturas baixas (4 a 12 K, no caso do citocromo *c*) para serem devidamente detectados. A necessidade de utilizar temperaturas baixas é devida ao fato de os tempos de relaxação dos spins do íon de Fe serem muito curtos em temperatura ambiente (Wickman *e col.*, 1965).

A primeira informação que se pode obter de um espectro de RPE de um sistema biológico é a identificação das espécies paramagnéticas contidas nas amostras. A identificação das espécies paramagnéticas é estabelecida por um parâmetro denominado fator *g efetivo*, que é um parâmetro adimensional obtido diretamente do espectro de RPE. Esse parâmetro é

determinado pelo momento angular orbital e pelo momento de spin de um elétron desemparelhado.

O valor do fator g associado ao elétron livre é de 2,0023 e serve de referência para a determinação dos demais valores de g de qualquer centro paramagnético. Em um radical livre orgânico, o elétron não se encontra localizado, apresentando muito pouco momento angular orbital, o que provocará apenas desvios pequenos do valor de g com relação ao do elétron livre devido à contribuição da interação spin-órbita. No caso dos íons de metais de transição, tem-se a presença de campos elétricos ou moleculares, originados por ligantes ou por íons vizinhos, os quais são os responsáveis pela supressão parcial ou completa do momento angular. Nesses termos, podemos destacar dois fatores importantes que determinam a posição e a dependência angular do espectro de RPE para um íon metálico em particular. Primeiro, é o tipo de ligante (sua força de ligação com o íon em estudo). Segundo, é a posição do ligante (a simetria do sítio com relação ao íon em estudo).

Um átomo de especial interesse em sistemas biológicos é o ferro, que pode ser encontrado em distintos estados de oxidação. No estado de oxidação Fe^{3+}, spin alto, com simetria axial, os valores para o fator g são iguais a $g_x = g_y = g_\perp = 6$ e $g_z = g_{//} = 2$. Como exemplo, pode-se citar a metamioglobina. No caso de spin baixo, essa mesma proteína apresenta uma simetria rômbica e os três valores de g são próximos de 2. O citocromo *c* férrico em solução aquosa também apresenta esse tipo de espectro.

Hamiltoniano de Spin

O momento magnético de um elétron desemparelhado pode ser expresso em termos de seu spin ($\vec{s}$) como:

$$\vec{\mu} = -g\beta\vec{s} \tag{1}$$

onde β é o Magneton de Bohr e g é o fator giromagnético para o elétron.

Na presença de um campo magnético $\vec{B}$, a interação do elétron com o referido campo, conhecido como efeito Zeeman, será dado pelo Hamiltoniano:

$$H = -\vec{\mu} \cdot \vec{B} \tag{2}$$

$$H = g\beta\vec{s}.\vec{B} \tag{3}$$

No caso de um campo magnético B_0 aplicado ao longo da direção z, tem-se:

$$H = g\beta B_0 S_z \tag{4}$$

As energias associadas a esse Hamiltoniano são dadas por:

$$E(m_s) = g\beta B_0 m_s \tag{5}$$

onde m_s representa as possíveis projeções do spin ao longo do eixo de quantização que, nesse caso, é a direção do campo magnético aplicado. Para um elétron, os valores de m_s são $m_s = \pm\ 1/2$.

As transições entre os níveis de energia se darão quando for fornecida uma energia ao sistema correspondente a: $\Delta E = g\beta B_0$.

Além da interação Zeeman, outras interações podem ocorrer em um sistema paramagnético levando a uma modificação no estado de spin para valores maiores que 1/2. No caso do citocromo *c*, um enfraquecimento do sexto ligante promove o aparecimento do spin 5/2.

O comportamento do spin eletrônico de um metal de transição em um sítio de simetria não cúbica e spin total maior que 1/2, pode ser descrito pelo Hamiltoniano de spin:

$$H = \beta\vec{B}\cdot g\cdot\vec{S} + D\left\{S_z^2 - \frac{1}{3}S(S+1)\right\} + E\left\{S_x^2 - S_y^2\right\} \tag{6}$$

onde o primeiro termo é devido ao efeito Zeeman e os termos contendo D e E são devidos à interação fina ou de campo magnético zero e estão associados ao campo eletrostático para um sistema multi-spin ao redor do íon. D e E são associados a desdobramentos axial e rômbico, respectivamente.

A Hamiltoniana de Spin apresentada na equação (6) pode ser escrita de outra maneira (equação 7), em termos de um fator *g efetivo* (g_{ef}), onde estão contidas as contribuições de D e E.

$$H = g_{ef}\beta\vec{s}\cdot\vec{B} \tag{7}$$

Os valores de g_{ef} são aqueles medidos diretamente nos espectros de RPE.

No caso das hemoproteínas férricas spin alto submetidas a um campo magnético externo, observa-se o desdobramento dos três dubletos de Kramer (± 5/2, ± 3/2, ± 1/2).

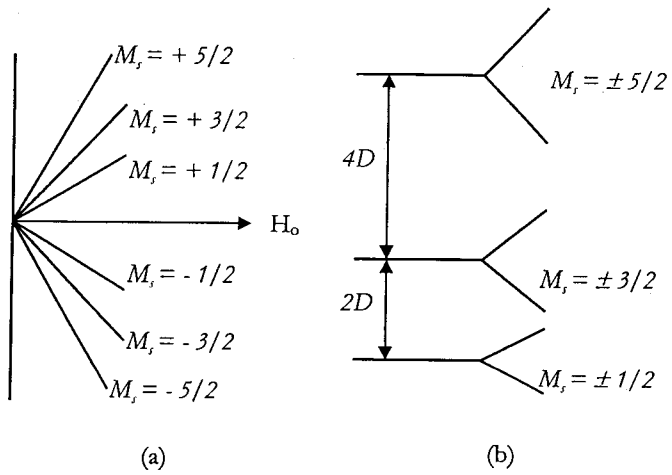


Figura II.3. Níveis de energia de um íon com S = 5/2: (a) íon livre em um campo magnético externo e (b) íon em um campo cristalino.

Quando o íon Fe^{3+} se encontra em um campo cristalino forte, ocasiona o estado de spin baixo, em que o valor de *g* é próximo de 2.

Os desvios dos fatores *g* do valor 2,00023 (elétron livre) são devidos à contribuição do momento angular orbital para o momento angular total (Pake & Estle, 1973). A simetria do íon Fe^{3+}, spin baixo, é rômbica e se observam três valores distintos de *g* (Figura II.4).

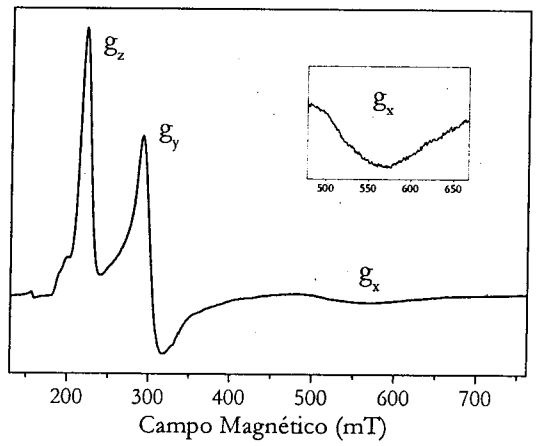


Figura II.4. Espectro de RPE, em banda X, do citocromo *c* férrico, spin baixo, de uma amostra congelada (50 mM de cit *c* em tampão HEPES, pH 7,4, e temperatura de 11 K).

Existe um modelo, chamado de modelo do buraco, para a configuração $d(t_{2g})^5$ correspondente ao estado de spin baixo (Griffith, 1957). Esse modelo é explicado em detalhes por Weissbluth (Weissbluth, 1974). Devido ao fato de o campo cristalino ser muito forte, seu efeito é colocar todos os cinco elétrons na configuração t_{2g}, ao passo que os estados e_g ficam vazios. O modelo sugere que os três orbitais t_{2g} (d_{xy}, d_{xz} e d_{yz}) estão isolados dos orbitais e_g (d_z^2 e $d_{x^2-y^2}$) e contêm os cinco elétrons de valência, de forma que a configuração eletrônica de um elétron é $(d_{xy})^2\,(d_{xz})^2\,(d_{yz})$, ocorrendo um buraco positivo em d_{yz}. Esses orbitais estão sujeitos a campo ligante assimétrico e pode ser decomposto numa componente axial δ (proporcional ao campo ligante forte ao longo do eixo z) e numa componente rômbica, menor, V (proporcional à diferença no campo ligante forte ao longo dos eixos x e y).

Se o elétron estiver confinado unicamente a d_{yz}, talvez não haja contribuição orbital ao momento magnético e somente um valor *g* será observado. Entretanto, há três valores de *g* distintos estabelecendo que o orbital que contém o spin desemparelhado não é exclusivamente d_{yz}. Essa mistura de orbitais é introduzida pela interação spin-órbita.

Podem-se expressar as funções de onda como uma combinação linear dos três estados disponíveis:

$$\begin{aligned} |\psi^+\rangle &= a|\xi^+\rangle + ib|\eta^-\rangle + c|\varsigma^+\rangle \\ |\psi^-\rangle &= a|\xi^-\rangle + ib|\eta^+\rangle + c|\varsigma^-\rangle \end{aligned} \tag{8}$$

onde d_{yz}, d_{xy} e d_{xz} são representados por ξ, η e ς, *a*, *b* e *c* são reais e os sinais + e – representam o spin eletrônico.

Taylor (1977) propôs uma mudança na representação para o estado fundamental, nessas expressões, levando a uma simplificação nos cálculos dos parâmetros do modelo. As funções agora são escritas como:

$$\begin{aligned} |\psi^+\rangle &= a|\xi^+\rangle + ib|\eta^-\rangle + c|\varsigma^+\rangle \\ |\psi^-\rangle &= -a|\xi^-\rangle - ib|\eta^+\rangle - c|\varsigma^-\rangle \end{aligned} \tag{9}$$

onde, na presença do campo magnético, o termo do operador Hamiltoniano do qual *g* é calculado é $\beta\vec{B}(\hat{L}_j + 2\hat{S}_j)$, $j = x, y$ ou z e a separação de energia ao longo do eixo *j* é

$\Delta E_j = g_j \beta \vec{B}$. As expressões resultantes para os valores de *g* principal em termos dos coeficientes das funções de onda são (Taylor, 1977):

$$\begin{aligned} g_z &= 2\left[(a+b)^2 - c^2\right] \\ g_y &= 2\left[(a+c)^2 - b^2\right] \\ g_x &= 2\left[a^2 - (b+c)^2\right] \end{aligned} \tag{10}$$

Essas equações são uma conseqüência dos sinais de *a*, *b* e *c* usados na equação (9) e também da escolha de que o produto $g_x g_y g_z$ seja positivo quando a=1.

Combinando as equações acima temos:

$$\begin{aligned} g_z + g_y &= 4(a+b+c).a \\ g_z - g_x &= 4(a+b+c).b \\ g_y - g_x &= 4(a+b+c).c \end{aligned} \tag{11}$$

ou,

$$\begin{aligned} a &= \frac{(g_z + g_y)}{\left(8(g_z + g_y - g_x)\right)^{1/2}} \\ b &= \frac{(g_z + g_x)}{\left(8(g_z + g_y - g_x)\right)^{1/2}} \\ c &= \frac{(g_y + g_x)}{\left(8(g_z + g_y - g_x)\right)^{1/2}} \end{aligned} \tag{12}$$

Uma vez que os termos *a*, *b* e *c* são encontrados, eles podem ser substituídos nas equações dos autovalores e determinar, dessa forma, os parâmetros V, λ e δ (Taylor, 1977).

$$\begin{aligned} \frac{V}{\lambda} &= \frac{g_x}{g_z + g_y} + \frac{g_y}{g_z - g_x} \\ \frac{\delta}{\lambda} &= \frac{g_x}{g_z + g_y} + \frac{g_z}{g_y - g_x} - \frac{1}{2}\frac{V}{\lambda} \end{aligned} \tag{13}$$

V e δ são dados em unidade da constante de acoplamento spin órbita λ. Quando $\frac{V}{\delta} = \frac{2}{3}$ o sistema é 100% rômbico. Assim, tem-se que:

$$g_z + g_y - g_x = 2(a+b+c)^2 \tag{14}$$

Utilizando a condição de normalização $a^2 + b^2 + c^2 = 1$, obtém-se:

$$g_x^2 + g_y^2 + g_z^2 - g_x g_z - g_x g_y + g_y g_z + 4g_x - 4g_y - 4g_z = 0 \qquad (15)$$

A expressão (15) permite calcular qualquer valor de um g conhecendo-se os outros dois valores do mesmo parâmetro, o que é de particular interesse para o spin baixo férrico, pois o menor valor de g (em campo mais alto) é muitas vezes alargado e somente detectável em temperaturas muito baixas e/ou em soluções muito concentradas. No caso do citocromo *c*, o menor valor de g é difícil de ser medido, mesmo em baixa temperatura, devido ao alargamento da linha e também à baixa concentração da amostra. Esse recurso foi utilizado neste trabalho para obter o terceiro valor de g a partir dos outros dois valores correspondentes às linhas mais intensas.

II.2. Ressonância Paramagnética Eletrônica Pulsada

Quando um centro paramagnético é colocado em um campo magnético estático, o spin eletrônico se orienta ao campo magnético externo. Com a aplicação de uma onda eletromagnética (a microonda), é possível retirar esse spin da posição de equilíbrio. Em RPE-CW, essa transição é observada continuamente através da aplicação de uma onda contínua. No caso do RPE pulsado, observa-se a evolução dessa magnetização após ser retirada de seu equilíbrio, através da aplicação de um pulso de microondas.

Por simplicidade, será feita uma aproximação desse problema de um ponto de vista clássico. O problema reduz-se então ao cálculo da magnetização $\vec{M}$ em presença de um campo estático $\vec{B}_0$ e de um campo oscilante $\vec{B}_1$ (circularmente polarizado) normal a $\vec{B}_0$:

$$\begin{aligned} \vec{B}_0 &= B_0 \hat{k} \\ \vec{B}_1 &= B_1 \cos(\omega_0 t)\hat{i} + B_1 sin(\omega_0 t)\hat{j} \end{aligned} \qquad (16)$$

A magnetização $\vec{M}$ está relacionada com o momento angular $\vec{J}$ por:

$$\vec{M} = -\gamma \vec{J} \qquad (17)$$

onde $\gamma = g\mu_B$. Tomando agora a equação do movimento para o momento angular :

$$\frac{d\vec{J}}{dt} = \vec{\Gamma} = \vec{M} \times \vec{B} \tag{18}$$

Portanto:

$$\frac{d\vec{M}}{dt} = -\gamma\vec{M} \times \vec{B} = -\gamma\vec{M} \times \{\vec{B}_0 + \vec{B}_1(t)\} \tag{19}$$

Introduzindo um sistema de coordenadas girantes (x, y e z) que gira, em referência ao sistema de laboratório (x_L, y_L e z_L) em torno do eixo z com uma velocidade angular $\vec{\Omega}$, verifica-se que:

$$\frac{\delta\vec{M}}{\delta t} = -\gamma\vec{M} \times \left(\vec{B} - \frac{\vec{\Omega}}{\gamma}\right) = -\gamma\vec{M} \times \vec{B}_{ef} \tag{20}$$

Agora o campo efetivo no sistema giratório será:

$$\vec{B}_{ef} = \vec{B} - \frac{\vec{\Omega}}{\gamma} \tag{21}$$

Na ausência do campo magnético oscilante, a magnetização vista do sistema do laboratório precessiona ao redor do campo estático com $\omega_L = g\mu_B B_0$, denominada freqüência de Larmor. Introduz-se o sistema de coordenadas girantes associado ao campo de microondas (x, y e z) que gira em torno do eixo z com freqüência ω_0. O campo magnético efetivo é independente do tempo e, em conseqüência, a magnetização precessiona em torno de $\vec{B}_{ef}$ com uma freqüência ω' dada por:

$$\omega' = \gamma\left\{\left(\vec{B}_0 - \frac{\omega_0}{\gamma}\right)^2 + \vec{B}_1^{\,2}\right\}^{\frac{1}{2}} \tag{22}$$

Esse comportamento está ilustrado na Figura II.5.

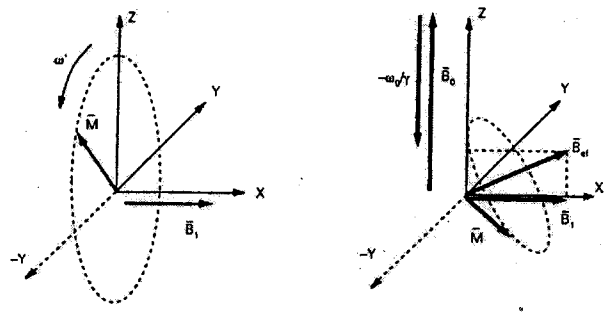


Figura II.5. Evolução da Magnetização no sistema de coordenadas girantes associado ao campo magnético oscilante

Em geral, $B_0 \rangle\rangle B_1$. Para freqüências próximas à de ressonância ($\omega_0 = \gamma B_0$), o eixo de precessão é fixado pelo campo estático. Em ressonância, a magnetização precessiona com uma freqüência $\omega_p = \gamma B_1$ ao redor de $\vec{B}_1$ (no eixo x do sistema de coordenadas girantes). Quando há a aplicação de um campo alternado ou oscilante em condição de ressonância durante um tempo t_p (pulso de microondas), a magnetização, vista do sistema girante de coordenadas, gira ao redor do eixo x de um ângulo dado por:

$$\theta_p = \omega_p t_p = \gamma B_1 t_p \tag{23}$$

Quando $\theta_p = \pi/2$, a magnetização longitudinal é transferida ao plano transversal e quando $\theta_p = \pi$, ocorre a inversão do sentido da magnetização.

Após a aplicação do pulso, o campo $\vec{B}_1$ é desligado e a magnetização retorna ao seu equilíbrio pressionando ao redor de $\vec{B}_o$ com a freqüência de Larmor. Esse retorno à posição de equilíbrio acontece devido aos efeitos da relaxação do sistema paramagnético. O tempo característico para o retorno da magnetização no eixo z é denominado tempo de relaxação longitudinal (T_1).

Devido à falta de homogeneidade do campo magnético (na direção z) gerada pelo ambiente ou pelas vizinhanças dos spins, são induzidas variações na freqüência de Larmor o que ocasiona o espalhamento total dos spins no plano transversal e o desaparecimento da magnetização transversal. Esse desaparecimento ou decaimento tem um tempo característico, T_2, e é equacionado da seguinte forma:

$$M_{\perp}(t) = M_0 \operatorname{sen}\theta e^{-\left(i\omega + \frac{1}{T_2}\right)t} \tag{24}$$

Utilizando ainda o formalismo clássico, podemos equacionar a relaxação longitudinal T_1 e a relaxação transversal T_2. Em um sistema de laboratório, a evolução temporal da magnetização é dada pela equação de Bloch:

$$\frac{d\vec{M}}{dt} = -\gamma\vec{M} \times \{\vec{B}_0 + \vec{B}_1(t)\} - \frac{M_z - M_0}{T_1}\hat{k} - \frac{M_x\hat{i} - M_y\hat{j}}{T_2} \tag{25}$$

onde M_0 é a resposta da magnetização em equilíbrio.

Nos intervalos da aplicação da microonda, ocorre o desacoplamento das componentes transversal e longitudinal da magnetização, tendo-se que:

$$\frac{\delta M_z}{\delta t} = -\frac{M_z - M_0}{T_1} \Rightarrow M_z(t) = M_0 - \{M_0 - M_z(0)\}e^{-\frac{t}{T_1}} \tag{26}$$

Experimento com Pulsos – Eco de Hahn e Eco Estimulado

Eco de Hahn. Excitando a amostra com dois pulsos, θ_1 e θ_2, respectivamente, separados por um intervalo de tempo τ, como ilustra a Figura II.6, a resposta para o sistema pode ser obtida utilizando o formalismo anterior para a evolução da magnetização transversal que é dada por:

$$\begin{aligned} M_{\perp}(t) = {} & M_0 \operatorname{sen}\theta_1 \cos^2\left(\frac{\theta_2}{2}\right) e^{-\left(\frac{i+\tau}{T_2}\right)t} g(t+\tau) + \\ & + M_0 \operatorname{sen}\theta_2 \left\{1 - 2\operatorname{sen}^2\left(\frac{\theta_2}{2}\right) e^{-\left(\frac{\tau}{T_1}\right)t}\right\} e^{-\left(\frac{i+\tau}{T_2}\right)t} g(t) - \\ & - M_0 \operatorname{sen}\theta_1 \operatorname{sen}^2\left(\frac{\theta_2}{2}\right) e^{-\left(\frac{i+\tau}{T_2}\right)t} g(t+\tau) \end{aligned} \tag{27}$$

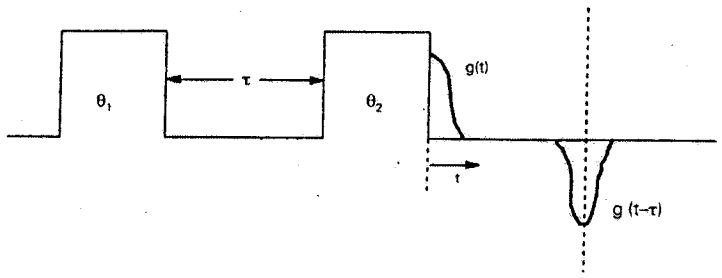


Figura II.6. Excitação da amostra por pulsos de microondas (θ_1 e θ_2), separados por um tempo τ e a formação do eco Hahn.

Como os campos magnéticos gerados pelos magnetos não são perfeitamente homogêneos, conseqüentemente ocorrerá dispersão na freqüência de Larmor sobre o domínio da amostra ($g(t)$). A amplitude do eco é otimizada para $\theta_1 = \pi/2$ e $\theta_2 = \pi$ e varia com $e^{\frac{-2\tau}{T_2}}$, de forma que variando-se o intervalo entre os pulsos τ é possível obter tempo de relaxação T_2 sem o efeito da falta de homogeneidade do campo magnético.

Eco Estimulado. A técnica de eco estimulado é utilizada para medir o tempo de relaxação transversal T_1. O primeiro pulso θ_1 é utilizado para saturar o sistema. Após um tempo τ (variável), são aplicados dois pulsos (θ_2 e θ_3), separados por um tempo T fixo, cuja função é monitorar a evolução da magnetização. Essa seqüência é representada por:

$$X(\theta_1) \rightarrow \tau \rightarrow X(\theta_2) \rightarrow T \rightarrow X(\theta_3)$$

O eco estimulado aparecerá em um tempo $t = \tau$ após o terceiro pulso e sua amplitude será máxima quando $\theta_1 = \theta_2 = \theta_3 = \frac{\pi}{2}$. Outros ecos menores também são observados (Ecos de Mims), provenientes da combinação de θ_1 e θ_3 e de θ_1 e θ_2. Para a seqüência $X\left(\frac{\pi}{2}\right) \rightarrow \tau \rightarrow X\left(\frac{\pi}{2}\right) \rightarrow T \rightarrow X\left(\frac{\pi}{2}\right)$, a resposta é dada por:

$$\begin{aligned} M_\perp(t) = M_0\left\{1 - e^{-\frac{T}{T_1}}\right\}g(t) - \frac{1}{2}M_0 e^{-\frac{2\tau}{T_2}} e^{-\frac{T}{T_1}} g(t+\tau) + \\ + \frac{1}{4}M_0 e^{-\frac{2\tau}{T_2}}\left[g(t - |T-\tau|) - 2\left\{1 - e^{-\frac{\tau}{T_1}}\right\}g(t+T) - e^{-\frac{2\tau}{T_2}} g(t - T - \tau)\right] \end{aligned} \tag{28}$$

Nesse trabalho utiliza-se essa seqüência de pulso para observar o eco estimulado. Essa seqüência consiste na aplicação de três pulsos de $\pi/2$ para determinar o tempo de relaxação longitudinal T_1. O primeiro pulso é utilizado para saturar o sistema. Após um tempo τ, variável, são aplicados os outros dois pulsos, que serão separados sempre por um tempo T fixo. Esses dois últimos pulsos são utilizados para monitorar a evolução da magnetização. À medida que τ cresce, o eco também cresce em intensidade (até um valor máximo) devido à recuperação da magnetização no plano longitudinal.

II.3. Dicroísmo Circular Magnético

A espectroscopia de dicroísmo circular magnético (MCD, do inglês *magnetic circular dichroism*) é o estudo das transições entre os subníveis de energia dos estados eletrônicos desdobrados com a aplicação do campo magnético. Igualmente à espectroscopia de dicroísmo circular convencional (CD, do inglês *circular dichroism*), o MCD mede a diferença entre a absorção da componente da luz circularmente polarizada à direita e à esquerda, porém com uma amostra sob a ação de um campo magnético. O campo deve ser aplicado paralelamente à direção de propagação da luz. Nesse caso, são observadas apenas as transições entre os estados eletrônicos envolvendo a variação da componente do momento orbital eletrônico na direção do campo magnético, $\Delta Mj=\pm 1$. Dependendo da intensidade das transições, ou seja, da absorção da luz polarizada circularmente à direita e à esquerda, os espectros apresentam tanto bandas positivas como negativas, sendo que as transições com $\Delta Mj=+1$ absorvem a luz circularmente polarizada à esquerda e as transições com $\Delta Mj=-1$ absorvem a luz circularmente polarizada à direita.

A diferença entre o CD e o MCD é que o CD provém da assimetria do cromóforo e é muito sensível ao meio e a mudanças conformacionais. O MCD resulta das perturbações induzidas pelo campo magnético nos níveis de energia do sistema. A intensidade do sinal de MCD é muito sensível à concentração dos cromóforos MCD ativos, a distinção entre cromóforos e a geometria dos ligantes ao redor do cromóforo, por exemplo o íon metálico (Campbell & Dwek, 1984).

A medida de Dicroísmo Circular na presença de um campo magnético tem a seguinte forma:

$$\Delta A = A_L - A_R = \Delta A_{CD} + B_0 \Delta A_{MCD} \qquad (29)$$

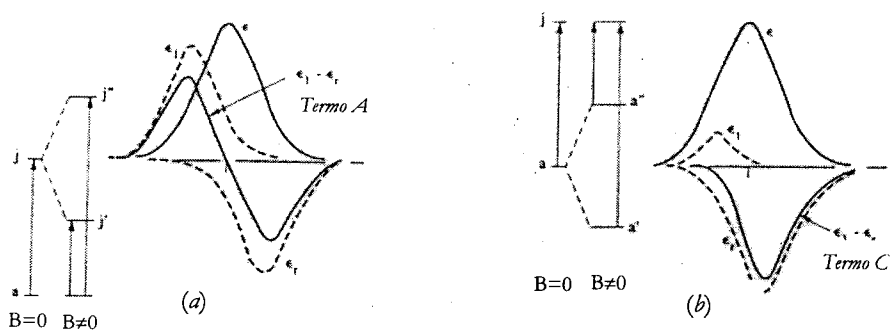
onde ΔA_{CD} é o dicroísmo natural da amostra e ΔA_{MCD} é o dicroísmo induzido pelo campo magnético B_0. Para se obter ΔA_{MCD}, é, em princípio, necessário medir ΔA na presença e na ausência do campo magnético ou efetuar a medida com diferentes valores do campo magnético. A unidade do MCD pode ser expressa de algumas formas relacionadas com a absorção, absortividade molar ou elipticidade, expressas pela absorção entre a luz

circularmente polarizada à direita e à esquerda ΔA, $\Delta\varepsilon$ ou θ (grau de elipticidade), por unidade de campo magnético.

$$\Delta\varepsilon_m = \frac{\Delta\varepsilon}{B_0} = \frac{\Delta A}{bcB_0} = \frac{\theta}{33bcB_0} \tag{30}$$

$\Delta\varepsilon$, θ e ΔA são valores induzidos pelo campo magnético B_0 em Tesla, b é o caminho ótico em cm e c é a concentração molar.

Em geral, três termos (A, B e C) contribuem para a intensidade do espectro de MCD. Devido à aplicação do campo magnético, ocorrem o desdobramento Zeeman dos estados fundamental (termo C) e/ou excitado (termo A) e a indução da mistura de estados pelo campo magnético (termo B) (Cheesman *e col.*, 1991). Essas contribuições estão ilustradas a seguir na Figura II.7. Cada um desses três termos pode ocorrer como uma banda positiva ou negativa com diferentes intensidades. Em substâncias que apresentam o estado fundamental degenerado orbitalmente ou por momento angular de spin, o efeito do campo magnético aplicado é o de separar os níveis (*efeito Zeeman*) por uma pequena diferença de energia. Essa é a contribuição do termo C (Figura II.7b), que apresenta uma dependência com a temperatura que vem da distribuição de Boltzman que regula a população dos dois níveis Zeeman fundamentais (Hollebone, 1993). As diferentes intensidades das absorbâncias correspondentes aos termos A, B e C obedecem à lei de Beer-Lambert, sendo, dessa forma, proporcionais às concentrações.



Figuras II.7. (a) Diagrama ilustrativo da origem do termo A, transição de um estado fundamental não degenerado, a, para um estado degenerado, j. O espectro dá origem a um termo bifásico (absorções positivas e negativas deslocadas), o qual assemelha-se com a derivada da banda de absorção, ε . (b) Diagrama ilustrativo da origem do termo C, transição de um estado fundamental degenerado, a, para um estado não degenerado, j. O espectro dá origem a uma forma de linha Gaussiana (Hollebone, 1993).

O termo *B* possui uma dependência linear com o campo magnético aplicado. Nesse caso, o campo magnético favorece a mistura através das interações dos momentos dos dipolos elétricos com o estado excitado e/ou com o estado fundamental. Quando esse estado, denominado intermediário, é significativamente maior em energia que os estados fundamental e excitado, o acoplamento é fraco e o termo *B* resultante é desprezível. No caso de o estado intermediário estar próximo ao estado excitado, a interação resulta em uma banda pouco intensa independente da temperatura e linear com o campo magnético. Se um estado intermediário estiver próximo do estado fundamental, o acoplamento será muito intenso e o estado intermediário será termicamente populado resultando em um termo fortemente dependente da temperatura. Quando isso ocorre, torna-se difícil distinguir as contribuições dos termos *C* e *B*.

A Espectroscopia de MCD é muito conveniente para identificar cromóforos magneticamente ativos em matrizes biológicas. Em especial, as hemoproteínas têm sido alvo de vários estudos pois o grupo heme é facilmente detectado. Por exemplo, o citocromo *b* pode ser identificado por MCD pela sua ligação axial bihistidina, enquanto o citocromo *c* é identificado pela sua ligação histidina-metionina. Em ambos os citocromos, as bandas de Soret e *Q* são observadas. Seqüências de oxidação e redução do grupo heme em hemoproteínas podem ser seguidas através do MCD (Hollebone, 1993). Nas hemoproteínas ou porfirinas, os termos *A*, *B* e *C* são geralmente usados como meios de classificar as várias bandas de MCD.

Modelos teóricos têm sido apresentados na literatura para explicar o aparecimento tanto das bandas de absorção eletrônica quanto das transições oticamente ativas pela aplicação de campos magnéticos. Uma breve revisão está feita por Cheesman *e col.*, 1991. O espectro de absorção de uma metaloporfirina consiste basicamente em duas transições eletrônicas, uma na banda *Q*, na região de 550-600 nm, de intensidade baixa, e outra na banda B (ou banda Soret), entre ~380 e 450 nm, de intensidade alta. O espectro de MCD de uma hemoproteína diamagnética (S=0) apresenta um intenso termo *A* na banda *Q* e um fraco termo *A* na banda *B* por causa do alto momento magnético da banda *Q* comparado com o momento magnético da banda *B*. A Figura II.8 a seguir ilustra essa situação.

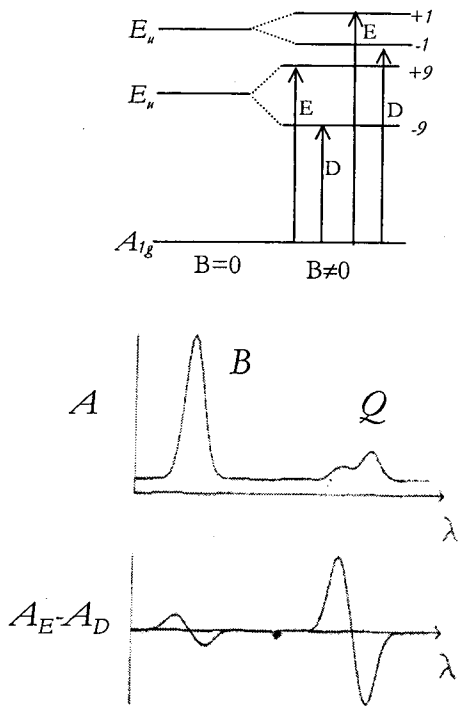


Figura II.8. Energia dos estados de uma hemoproteína diamagnética na presença de um campo magnético na direção z e transições Zeeman entre o estado fundamental e dois estados excitados (Cheesman *e col*, 1991).

A presença de um íon metálico de transição no centro do anel porfirínico introduz várias complexidades ao espectro ótico e ao espectro de MCD. O íon metálico contribui com níveis de energia dos elétrons *d* e transições óticas adicionais são observadas. Essas transições podem ser classificadas como localizadas no metal (*d-d*) e de transferência de carga do metal (*d*) para a porfirina (π), (e_g) ou vice versa. Os estados gerados por todas essas configurações são misturados pela ação da componente campo cristalino de simetria baixa e pelo acoplamento spin órbita. Se o íon metálico possuir um elétron desemparelhado em seu estado fundamental, então o espectro de MCD de todas as transições óticas pode vir a ser dependente da temperatura, contribuindo para o termo *C*. As transições da porfirina π–π* apresentam contribuições do termo *C*, dependente da temperatura, no espectro de MCD, em virtude das interações dos orbitais da porfirina misturados com as configurações *d* do metal paramagnético (Cheesman *e col.*, 1991).

Detalhes espectrais de MCD e UV do Citocromo c

As Figuras II.9.a e II.9.b ilustram os espectros de MCD e de absorção da proteína citocromo *c* nos seus estados de valência Fe^{2+} e Fe^{3+}. A absorção dessa proteína é uma absorção típica da maioria das hemoproteínas ou das porfirinas. As bandas mais fracas entre 520 e 580 nm (Figura II.9.a) são as conhecidas como bandas *Q* e a banda perto de 400 nm (Figura II.9.b) é a chamada banda de Soret e No estado oxidado, o espectro de MCD consiste de bandas fracas na região das bandas *Q* (Figura II.9.a - parte superior) e de uma banda quase simétrica (na forma de uma derivada) centrada perto de 415 nm (Figura II.9.b) correspondente à banda de Soret. No caso do estado reduzido, há um estreito e forte pico (na forma de uma derivada) com o aparecimento da estrutura fina na região das bandas *Q* (Figura II.9.a - parte inferior) e o espectro de MCD na região da banda Soret é menos intenso (Figura II.9.b).

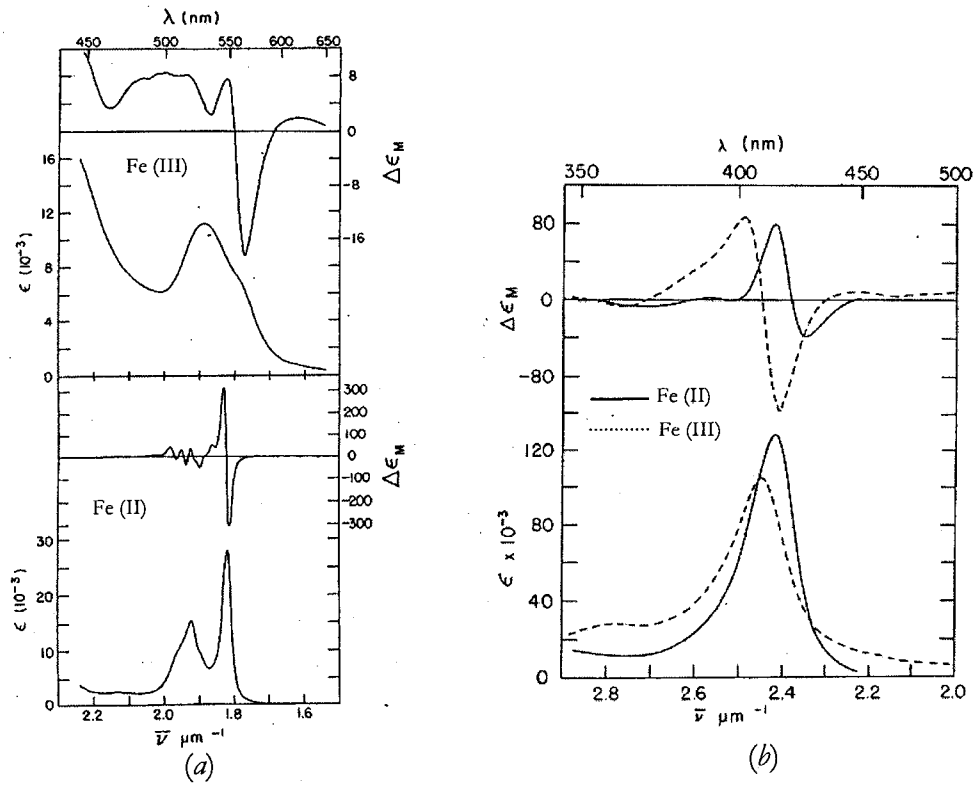


Figura II.9. Espectro de MCD e respectivo UV do citocromo *c* nos estados férrico e ferroso (Sutherland & Klein, 1971). (a) Região das bandas *Q* e (b) Região da banda Soret.

No caso do Fe^{2+}, também se observa uma banda de absorção estreita em 549 nm, proveniente da transição do nível zero vibracional do estado fundamental da porfirina para o nível zero vibracional do estado mais baixo singleto excitado da porfirina, chamada de transição Q_{00} (Figura II.9.*a*). Entre 500 e 535 nm, existem várias bandas provenientes das transições de níveis vibracionais dos estados excitados mais altos da porfirina, conhecidos coletivamente como banda Q_{01}. O MCD da banda Q_{00} assemelha-se a uma derivada do espectro de absorção e indica que um dos dois estados - ou o estado inicial ou o estado final - é degenerado. Nesse caso, é conhecido que o estado fundamental não é degenerado (simetria A_{1g}) e o primeiro estado excitado é duplamente degenerado (simetria E_g) (Gouterman, 1961).

A Figura II.9.b ilustra espectros de absorção do Fe^{2+} e do Fe^{3+} na região da banda Soret, os quais são relativamente semelhantes, portanto ocorre um deslocamento das bandas do Fe^{3+} para o vermelho aproximadamente 6 nm enquanto a banda Soret é deslocada para o azul na mesma quantidade com respeito à correspondente banda do Fe^{2+}. O MCD do Fe^{2+} nessa região consiste na soma de um termo A e um termo B positivo. Já para o Fe^{3+}, as transições são mais complexas, ocorrendo a contribuição do termo C.

III. MATERIAIS E MÉTODOS

III.1. As amostras

A proteína utilizada foi o citocromo *c* (Cytochrome *c* - *horse heart*, type III – SIGMA co), diluída sempre em tampão HEPES. Os lipídios utilizados foram: fosfatidiletanolamina (*egg yolk*) (PE), fosfatidilcolina (*egg yolk*) (PC), cardiolipina (*bovine heart*) (CL), fosfatidilserina (*bovine brain*) (PS), PCPECL (a razão molar PC:PE:CL utilizada foi 2:2:1), dipalmitoil fosfatidilcolina (DPPC), dipalmitoil fosfatidilserina (DPPS), dioleoil fosfatidilserina (DOPS), dicetilfosfato (DCP), distearoil fosfatidilglicerol (DSPG), dimiristoil fosfatidilglicerol (DMPG), dibutiril fosfatidilcolina (DBPC) e didecanoil fosfatidilcolina (DDPC). Os lipídios foram purificados pela Sigma Co. Utilizou-se também o detergente Dodecil Sulfato (*SDS*).

Preparação das vesículas

Na preparação das vesículas de PE, PC, CL, PS, DPPC, DPPS, DOPS, DSPG, DMPG, DBPC e DDPC os lipídios foram primeiramente dissolvidos em clorofórmio, o qual foi posteriormente evaporado com gás N_2, e o filme resultante foi guardado -20°C até o uso. A preparação das vesículas foi realizada com a adição do tampão HEPES ao tubo de ensaio, contendo o filme lipídico, agitado com o *vortex* e sonicado com um ultra-som de ponta com 60 W de potência A sonicação foi realizada por 30 segundos, com um intervalo de 1 min de espera em banho de gelo, repetidos por aproximadamente 25 vezes.

As vesículas de DCP foram preparadas pelo método descrito por Mortara *e col.*, 1978. O DCP foi suspenso em tampão HEPES, aquecido até 60° C e sonicado com o mesmo procedimento apresentado anteriormente.

As miscelas foram preparadas com a adição do SDS em tampão HEPES.

Preparação das membranas para medidas de RPE

Realizou-se uma titulação com as vesículas empregando as seguintes razões lipídio/proteína: 12, 24, 36, 48 e 60. As vesículas foram preparadas a partir de uma solução estoque (24 mM) e depois tituladas em tampão HEPES para atingir a concentração ou a razão l/p desejada. Após a adição do citocromo *c* (330 μM) à solução contendo as vesículas, no tubo de quartzo, a solução foi agitada cuidadosamente, congelada em nitrogênio líquido e posteriormente introduzida na cavidade de microondas para a aquisição do espectro.

Os parâmetros utilizados para a aquisição dos espectros de RPE-CW (banda X) foram os seguintes: amplitude de modulação (0,1 mT), constante de tempo (20,48 ms), potência da microonda (16-20 dB de atenuação ou 4-10mW), temperatura (11 K), campo magnético (50 a 400mT).

Preparação das membranas para medidas de MCD

As concentrações do citocromo c foram 13 μM, para o Fe^{2+}, e 40 μM, para o Fe^{3+}.

O citocromo *c* ferroso foi obtido a partir da redução do citocromo *c* férrico, utilizando-se ditionítio de sódio. Posteriormente a redução, foram realizadas várias lavagens na solução de citocromo *c* com o tampão HEPES, objetivando-se retirar o excesso do ditionítio de sódio presente na solução. Realizou-se uma titulação com as vesículas empregando as seguintes razões lipídio/proteína: 12, 24, 36, 48, 60, 120 e 240. As vesículas foram preparadas a partir de uma solução estoque (6 mM) e tituladas em tampão HEPES para atingir a concentração ou a razão l/p desejada. Os experimentos foram realizados em temperatura ambiente e em pH 7,4, utilizando-se cubetas de quartzo com caminho ótico de 0,5 cm. Foi empregado um ímã de 860 mT. A resolução escolhida foi de 0,5 nm e a medida foi realizada entre 300 e 600 nm, adquirindo-se quatro médias. Todos os espectros de MCD foram filtrados matematicamente por Transformada de Fourier.

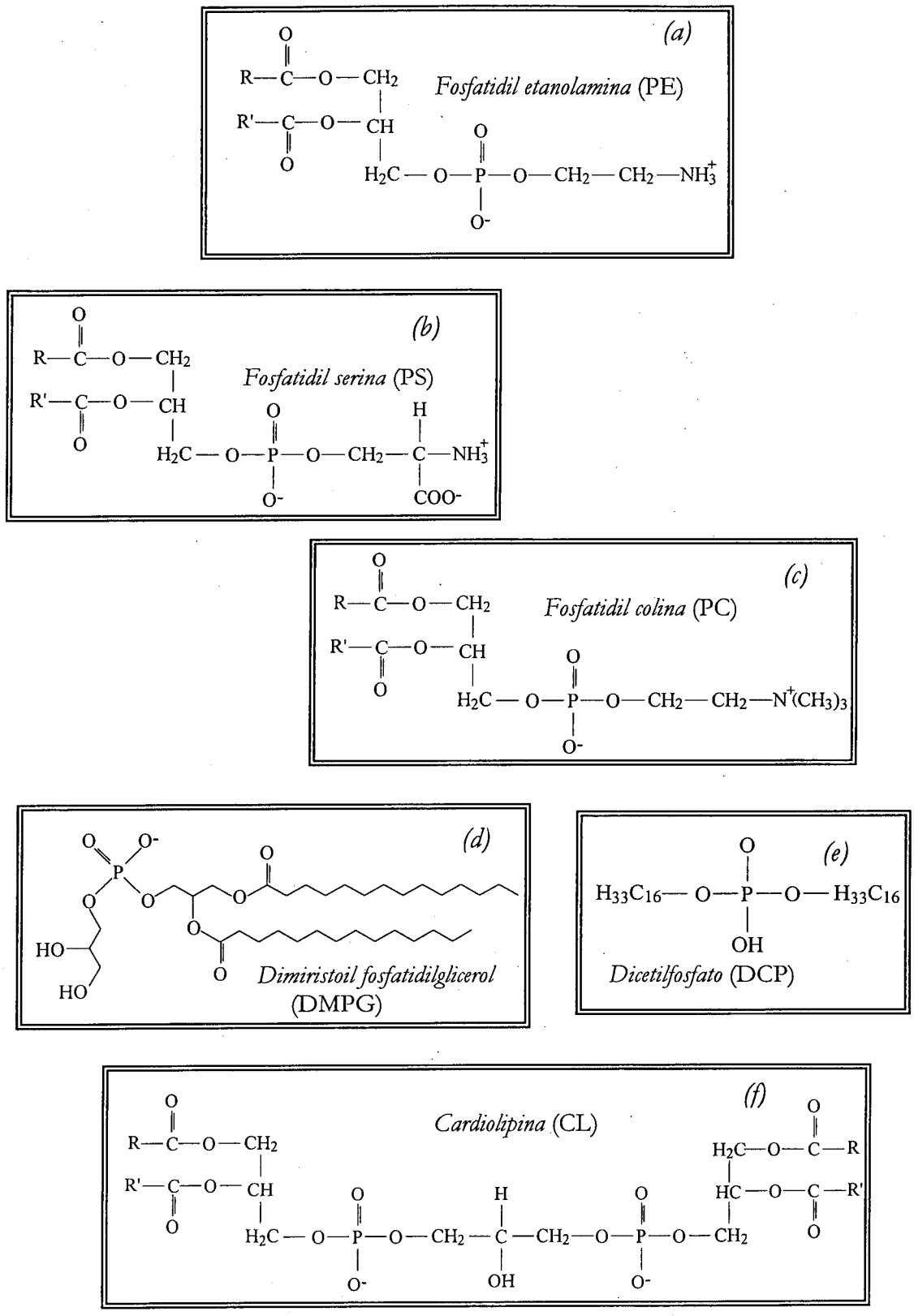


Figura III.1. Fórmulas das cabeças polares dos lipídios: (a) Fosfatidiletanolamina, (b) Fosfatidilserina, (c) Fosfatidilcolina, (d) Dimiristoilfosfatidilglicerol, (e) Dicetilfosfato e (f) Cardiolipina.

IFSC-USP SERVIÇO DE BIBLIOTECA INFORMAÇÃO

III.2. Descrição dos equipamentos

III.2.1. Espectrômetro de Dicroísmo Circular Magnético (MCD)

Os espectros de absorção eletrônica na região de UV-Vis/MCD foram medidos em um espectropolarímetro Jasco J-720, cuja varredura, em comprimentos de onda, estende-se de 180 a 800 nm. Foi utilizado um ímã permanente de 860 mT.

A Figura III.2 ilustra em diagrama de blocos o espectropolarímetro utilizado. Ele é constituído basicamente de: fonte de luz, monocromador, modulador, lentes ou polarizador, fotomultiplicadora, amplificador e registrador.

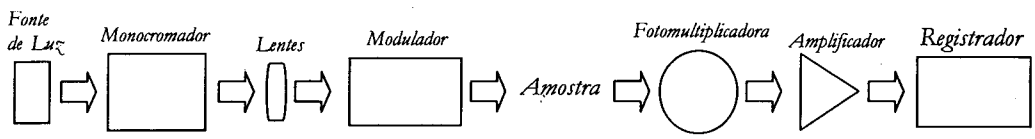


Figura III.2. Diagrama esquemático de um espectropolarímetro.

A luz é gerada por uma lâmpada de xenônio passando por dois monocromadores. Em seguida, é linearmente polarizada por um prisma, passando a oscilar na direção horizontal. Então, a luz linearmente polarizada é modulada, obtendo-se assim um feixe de luz circularmente polarizado à direita e à esquerda. O modulador consiste de um elemento que submete o quartzo a um estresse mecânico, gerando a polarização circular no cristal.

III.2.2. Espectrômetro de RPE Onda Contínua (CW)

As medidas de EPR-CW foram realizadas no espectrômetro Bruker - ELEXSYS - E580. Foram utilizadas uma cavidade retangular e uma freqüência de modulação de 100KHz. Para o resfriamento da amostra, foi usado um sistema comercial de transferência de hélio líquido, criostato modelo ESR900 da Oxford. A temperatura foi controlada digitalmente por uma unidade microprocessadora, modelo ITC 503 da Oxford, utilizando-se como referência térmica o nitrogênio líquido.

O espectrômetro opera com uma microonda da freqüência fixa e um campo magnético externo variável, sendo a freqüência de microonda gerada em banda X. Essa freqüência apresenta um desvio sistemático com relação à freqüência da cavidade ressonante e por isso é necessário ter um sistema de estabilização - chamado de Controlador Automático de Freqüência (CAF) - o qual é composto por um circuito automático de realimentação, interligado entre o detector e o gerador de microondas, que corrige continuamente a voltagem do gerador e, conseqüentemente, a referida freqüência (Figura III.3). A amostra é colocada dentro de uma cavidade ressonante retangular, na região de máximo campo magnético de microonda.

A potência fornecida pelo gerador é dividida, sendo que uma parte segue para a cavidade ressonante e a outra passa através de um atenuador e de um defasador. No detector, a microonda é somada novamente para facilitar a aquisição do sinal de RPE.

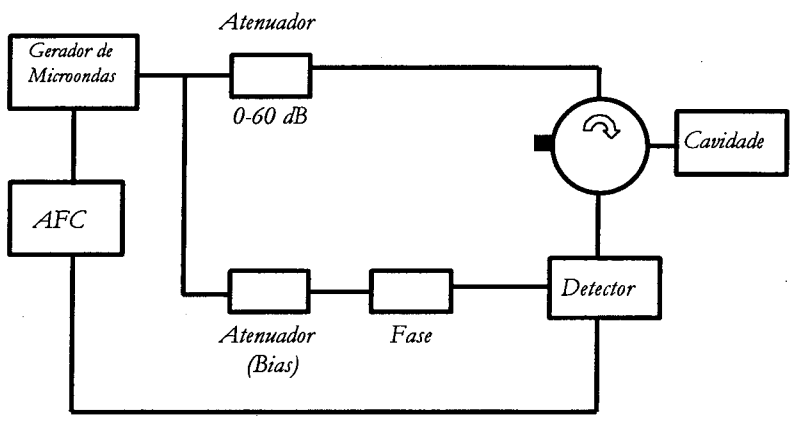


Figura III.3. Diagrama de blocos ilustrando os componentes básicos de um espectrômetro de RPE CW.

III.2.3. Espectrômetro de RPE Pulsado

O espectrômetro de RPE Pulsado consiste basicamente de um gerador de microondas, um gerador de pulsos (MPFU, do inglês *Modeling Pulse Form Unity*), um amplificador de pulsos (TWTA, do inglês *Travelling Wave Tube Amplifyer*) (Modelo 117X - 1kW) e uma cavidade cilíndrica dielétrica de fator de qualidade ajustável.

A microonda sai do gerador e passa pelo *MPFU* onde é modulada em pulsos. Em seguida, é amplificada e enviada para a cavidade. Outra parte da microonda gerada é desviada, passando por um defasador e um atenuador para ser misturada com a resposta da cavidade (Figura III.4). Isso ocorre para possibilitar a detecção em fase e em quadratura.

Para o resfriamento da amostra foram utilizados um sistema comercial de transferência de He e um criostato modelo CF935 da Oxford Instruments.

Para dar início aos experimentos de RPE pulsada, inicialmente é necessário detectar as linhas de ressonância da amostra. Portanto, o primeiro passo é a aquisição de um espectro de RPE-CW. Para o sistema Fe^{3+}, spin baixo, em uma simetria rômbica há três linhas de RPE com três valores de *g* diferentes. A princípio, é possível medir RPE pulsado sobre qualquer uma dessas linhas. Segundo Herrick & Stapleton (1976), existe uma anisotropia para T_1 de cada valor de *g*. Para padronizar o experimento, foi fixada a linha de *g* central (g_y) em campo magnético igual a 300 mT.

Devido à rápida relaxação do sistema, não foi possível detectar o FID (do inglês *Free Induction Decay*), por isso mediu-se o eco estimulado para a determinação de T_1. Inicialmente foram aplicados dois pulsos de 16 ns para determinar qual o valor do tempo (T) entre os dois pulsos em que ocorria o aparecimento de um eco com máxima intensidade. Esse tempo T foi otimizado para 500 ns. A seguir, foi introduzido na seqüência um outro pulso também de 16 ns. Esse pulso tem a função de saturar o sistema e é aplicado anteriormente aos pulsos que geram o eco (como descrito no *Capítulo II – Considerações Teóricas*). O espaçamento entre esse pulso e os dois últimos é denominado τ e variou de 200 a 8000 ns de acordo com a temperatura em que foi realizada a medida de T_1. A cada passo ou a cada tempo τ diferente obteve-se um valor da integração do eco que variou de acordo com a evolução da magnetização. Cada área do eco é correspondente a um ponto da curva de T_1 e foi integrada,

em média, de 200 a 1000 vezes, de acordo com o aumento da temperatura e com a conseqüente diminuição da relação sinal/ruído.

Depois de obtidas, as curvas de T_1 para diferentes temperaturas foram ajustadas com exponenciais *strech* utilizando-se o *programa Origin* e então os valores da taxa de relaxação ($1/T_1$) foram graficados em função da temperatura.

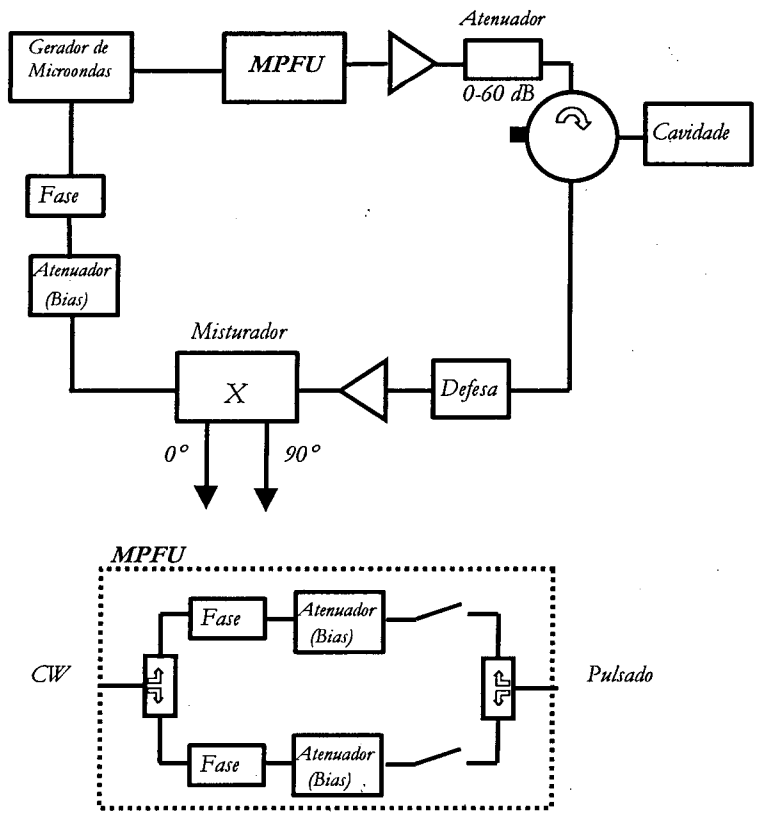


Figura III.4. Diagrama de blocos ilustrando os componentes básicos de um espectrômetro de RPE Pulsado.

III.3. Metodologia para análise dos dados

Cálculo das áreas dos espectros de RPE

Para as simulações dos espectros de RPE, utilizou-se o programa WIN-EPR *SimFonia*, que trabalha com o método de teoria de perturbação para resolver os espectros. A hamiltoniana estabelece, como perturbação, a interação Zeeman eletrônica, as interações de desdobramento de campo zero, a interação hiperfina nuclear, a interação de quadrupolo nuclear e a interação Zeeman nuclear.

Os espectros de RPE do citocromo *c* em estudo correspondem a sinais provenientes de Fe^{3+}, em um campo cristalino forte, quando livre, e em campo cristalino fraco, quando ligado a algumas vesículas, como as vesículas de DCP. Portanto, apresentam um spin eletrônico 5/2 com valores $g_{\perp} = 6$ e $g_{//} = 2$, para uma simetria axial, e spin 1/2 com valores g <3, para uma simetria rômbica, respectivamente.

Para uma melhor reprodução dos espectros experimentais, as simulações do spin 5/2 foram realizadas considerando as possíveis combinações entre as formas de linhas Lorentzianas e Gaussianas. Determinou-se que a forma de linha para o espectro com menor anisotropia foi a Lorentziana, enquanto que, para os espectros que apresentavam maior anisotropia, a forma de linha foi a Gaussiana. Depois de simuladas todas as espécies do sinal de RPE, independentemente, estabeleceu-se uma soma. Cada simulação foi ajustada por um fator adequado para que o espectro resultante da soma estabelecida reproduzisse o espectro experimental. Finalmente, foi calculada a área de cada espécie de forma independente.

O espectro de RPE do spin 1/2 referente ao citocromo *c* livre foi simulado com uma forma de linha Gaussiana. Já no spin 1/2 alternativo do citocromo *c* associado aos lipossomos, foi utilizada uma mistura entre linhas Gaussianas e linhas Lorentzianas na razão 1:1.

A análise de Hill e constante de associação

Existem muitos exemplos em biologia em que a associação da macromolécula com seu ligante vem a ser um processo cooperativo. Um bom exemplo dessa associação é a ligação do oxigênio com a hemoglobina. Portanto, as *interações cooperativas* são muito comuns em sistemas biológicos.

Com o propósito de efetuar o tratamento e a caracterização dos dados de associações cooperativas, é utilizada uma metodologia baseada na suposição de que as ligações além da faixa de saturação podem ser descritas através de equações fenomenológicas, aproximando-as para um sistema infinitamente cooperativo. No caso extremo, de infinita cooperatividade, a ligação pode ser representada pela equação:

$$M_0 + nL \leftrightarrow M_n \tag{1}$$

$$K_d^n = \frac{(M_0)(L)^n}{(M_n)} \tag{2}$$

onde L é o ligante, M_n é o total de espécies microscópicas (ou macromoléculas) que possuem n moléculas de L associadas e K_d é a constante de dissociação dos sítios que estão interagindo. Nesse caso, o parâmetro de equilíbrio de ligação, ν, é:

$$\nu = \frac{n(M_n)}{((M_0)+(M_n))} = \frac{\left(n(L)^n / K_d^n\right)}{\left(1+(L)^n / K_d^n\right)} \tag{3}$$

onde a fração de saturação $\bar{y} = \nu / n$ é dada por:

$$\bar{y} = \frac{\left((L)^n / K_d^n\right)}{\left(1+(L)^n / K_d^n\right)} \tag{4}$$

Na prática, a cooperatividade infinita não é observada. Portanto, vale a aproximação:

$$\bar{y} = \frac{\left((L)^{\alpha_H} / K_d^{\alpha_H}\right)}{\left(1+(L)^{\alpha_H} / K_d^{\alpha_H}\right)} \tag{5}$$

onde $1 \leq \alpha_H \leq n$. O parâmetro α_H é conhecido como a constante de Hill e representa um índice de cooperatividade (Cantor & Schimmel, 1980).

Neste trabalho, a elipticidade molar (Θ) foi graficada em função da concentração de lipídio para comprimentos de onda específicos (λ=415 nm para o citocromo *c* férrico, e λ=400 e 550 nm para o citocromo *c* ferroso), onde apresentou-se maior variação no espectro de MCD. Essas curvas apresentaram um comportamento cooperativo e portanto foram ajustadas com a equação de Hill. Os parâmetros do grau cooperatividade (*n*) e a constante de afinidade ou dissociação (K_d) foram obtidos através do ajuste dessas curvas com a equação de Hill.

As curvas de elipticidade molar (Θ) em função da concentração de lipídio também foram ajustadas com a expressão $y = \frac{K_a.C_l}{K_a.C_l + 1}$, onde C_l é a concentração de lipídio (mM) e K_a é a constante de associação. A partir desses ajustes, foram determinados os valores das constantes de associação (K_a).

IV. RESULTADOS

IV.1. Ressonância Paramagnética Eletrônica

O espectro de RPE do citocromo *c* livre, correspondente ao Fe^{3+}, spin 1/2 com parâmetros g_1=3,075, g_2=2,238 e g_3=1,270, é bastante conhecido na literatura (Brautigan, 1977). A Figura II.4 ilustra o espectro de RPE do citocromo *c* (50mM) medido em nosso laboratório, cujos parâmetros foram obtidos por simulação: g_x=3,085, g_y=2,234 e g_z=1,250.

Os resultados de RPE-CW para o citocromo *c*, em membranas, estão apresentados a seguir e estão ilustrados em função da razão lipídio/proteína (l/p).

RPE do ferro hemínico do citocromo c na presença de vesículas de lipídios saturados

A Figura IV.1.a ilustra o espectro de RPE com lipossomos de DPPC (C16:0) nas seguintes razões l/p: 0, 12, 24, 36, 48 e 60. O aumento da razão l/p leva ao aparecimento da espécie de spin 5/2 no sinal de RPE (em baixo campo g~6). Na Figura IV.2.a, ilustra-se a partição dessas formas de spin em cada razão l/p de acordo com a área obtida pela integral dupla do espectro de RPE simulado das diferentes espécies. O aumento da razão l/p leva a um discreto aumento da porcentagem do citocromo *c* na forma de spin 5/2.

A Figura IV.1.b mostra o espectro de RPE do citocromo *c* na presença de vesículas de DMPG (C14:0) em várias razões l/p. Pode-se observar que o aumento da razão l/p leva ao aparecimento de duas espécies diferentes de spins do ferro hemínico: um sinal de spin 5/2 ($g_\perp$ ~ 6) e uma forma diferente de spin 1/2 (g_1=2,902, g_2=2,225 e g_3=1,500) com menor distorção rômbica comparada com o sinal do citocromo *c* férrico livre. Essa espécie paramagnética já foi observada em estudos de interação da membrana CL com o citocromo *c* (Vicent, 1987). Neste estudo aqui apresentado, essa espécie será chamada de *spin 1/2 alternativo*. A Figura IV.2.b quantifica a partição das formas de spin do citocromo *c* para cada razão l/p.

A Figura IV.1.c ilustra o espectro de RPE na presença de vesículas DPPS (C16:0) em várias razões l/p. Aumentando a quantidade de DPPS, observa-se o aparecimento das duas formas de estado de spin citadas acima, mas com diferentes partições (Figura IV.2.c). Esse

resultado sugere que o DPPS favorece a população de citocromo *c* para o estado de spin 5/2 ($g_{\perp} \sim 6$ e $g_{//} \sim 2$). Resultado similar é obtido na presença do DSPG (C18:0) (Figuras IV.1.d e IV.2.d).

A Figura IV.1.e ilustra o espectro do citocromo *c* na presença do lipossomo DCP (C16:0) novamente em várias razões l/p. Em baixa razão l/p, o spin 1/2 alternativo é predominante no sinal de RPE. Essa predominância é gradualmente substituída pelo estado de spin 5/2, concomitantemente com o aumento da razão l/p. Esse dado sugere que, em vesículas DCP, a simetria de spin 1/2 alternativo (g_1=2,902, g_2=2,225 e g_3=1,5) é uma espécie intermediária na conversão para a forma de spin 5/2. A Figura IV.2.e ilustra essa conversão gradual que acompanha o aumento da razão l/p.

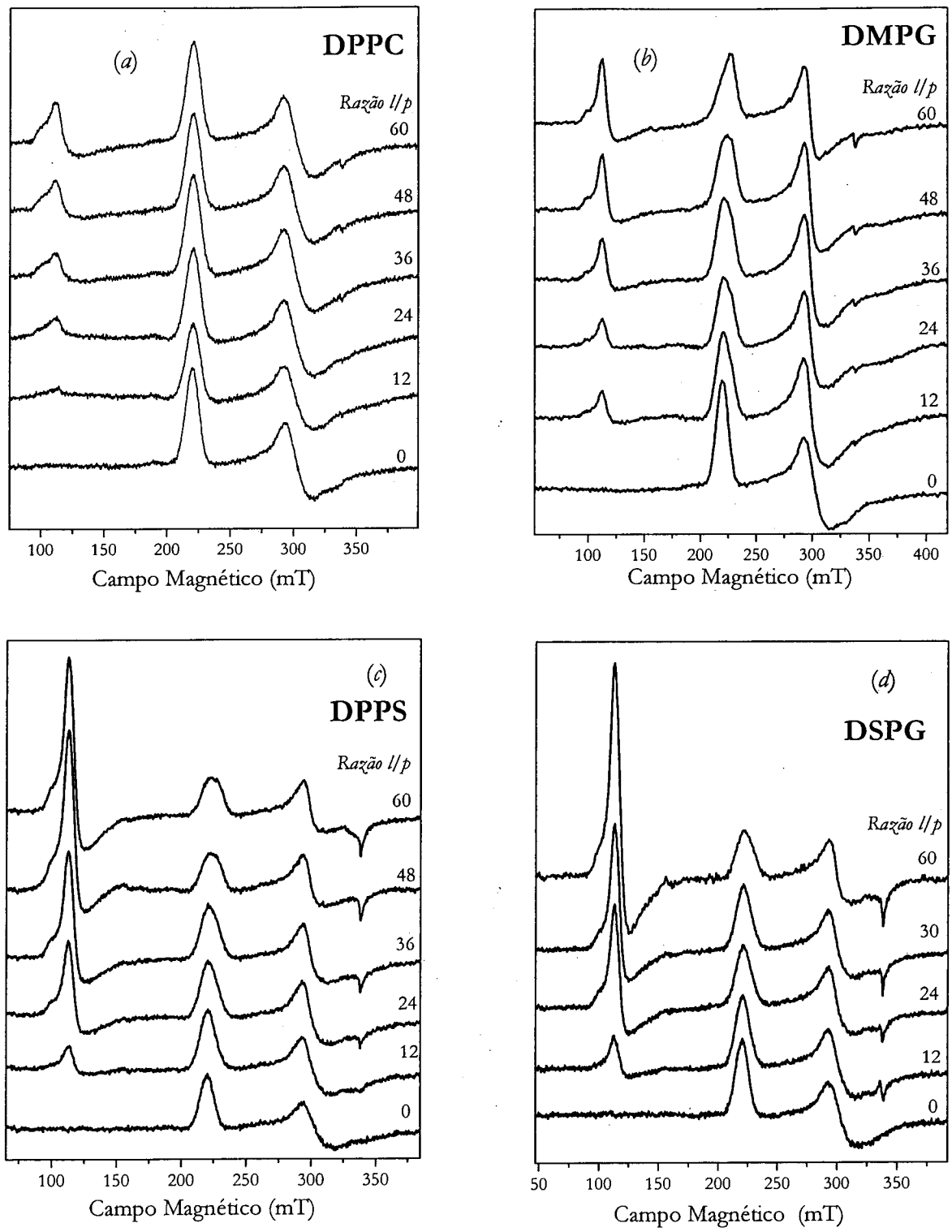
RPE do citocromo c do ferro hemínico na presença de lipossomos insaturados

As Figuras IV.1.f e IV.1.g mostram respectivamente o espectro de EPR do citocromo *c* na presença de vesículas de DOPS (C18:cis Δ^9) e CL em várias razões l/p. Em ambos os casos, o aumento da razão l/p é acompanhada pela conversão da proteína nativa citocromo *c* (S=1/2) no aumento da espécie de spin 1/2 alternativo. Na presença de vesículas de DOPS, a forma de spin 5/2 não é observada e uma significativa quantidade do citocromo *c* nativo - ou o estado de spin 1/2 - é ainda detectada (Figura IV.2.f). Diferentemente, a Figura IV.2.g mostra que, na presença de CL (contendo 80% de ácido linoléico), a partição favorece a espécie de simetria de spin 1/2 alternativo. Para uma alta razão l/p (l/p=60), uma outra espécie paramagnética com spin alto e com simetria rômbica é observada (g=4,3, campo magnético em 155 mT). Simultaneamente, pode ser também detectado o sinal de um radical em torno de 330 mT, provavelmente devido à peroxidação lipídica (Chamulitrat *e col.*, 1989; Nantes *e col.*, 2000). O inserte da Figura IV.1.g mostra esse espectro e sua simulação computacional com os seguintes parâmetros: g_1=2,014, g_2=2,008 e g_3=2,004. Na região de campo magnético 110 mT ($g \sim 6$), uma pequena quantidade de spin 5/2 é também detectada.

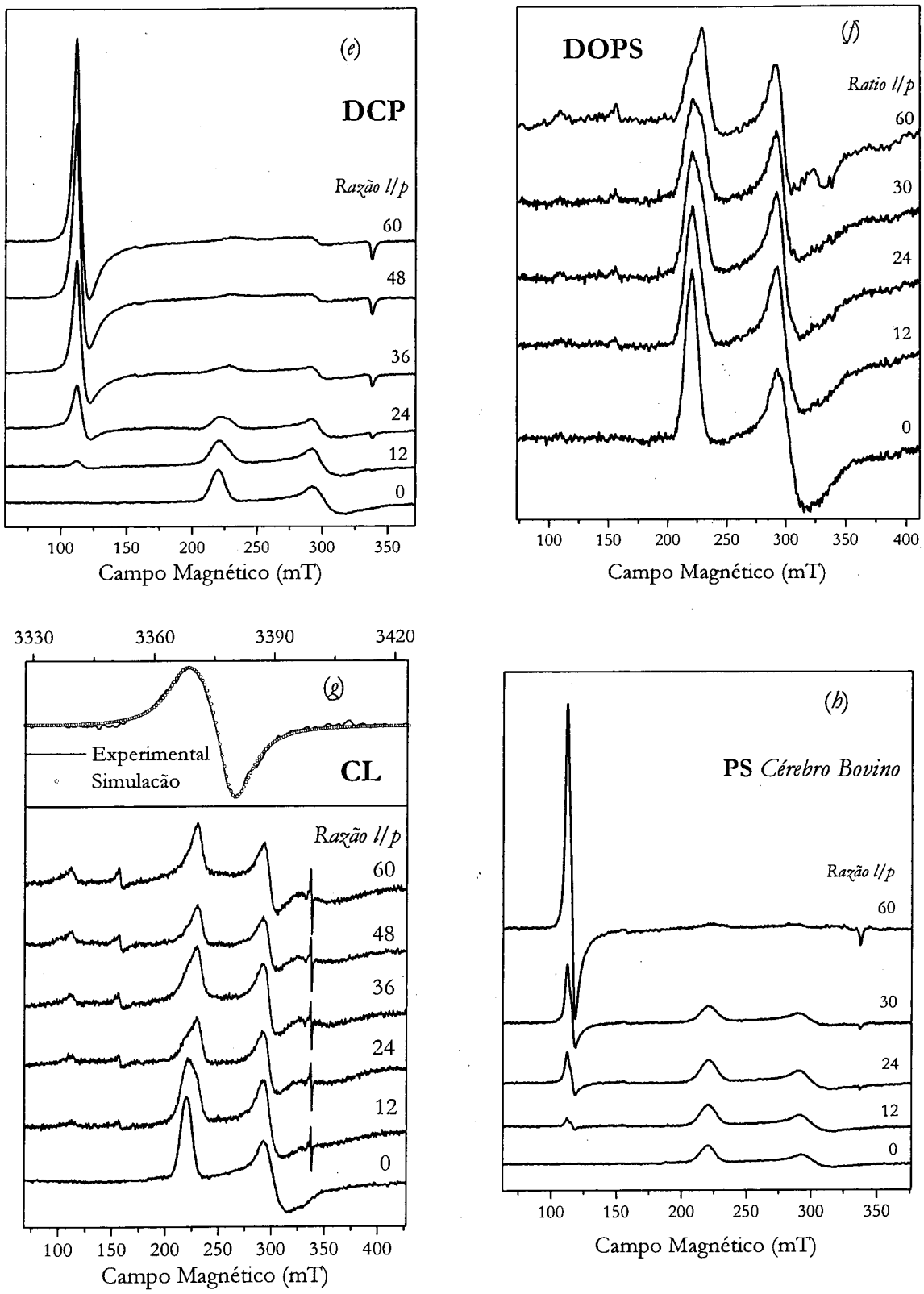
A Figura IV.1.h ilustra o sinal de RPE do citocromo *c* na presença de PS de cérebro bovino em diferentes razões l/p. Esse resultado sugere que a associação do citocromo *c* com o lipídio leva à conversão do spin 1/2 em spin 5/2 com simetria quase axial e o espectro de RPE com uma linha muito estreita (Tabela IV.2). Os valores de *g* para o espectro são g_1 = 6,05, g_2 =

5,83 e g_3 = 2,003, obtidos por simulação espectral. A Figura IV.2.h ilustra a partição das diferentes formas do citocromo *c*.

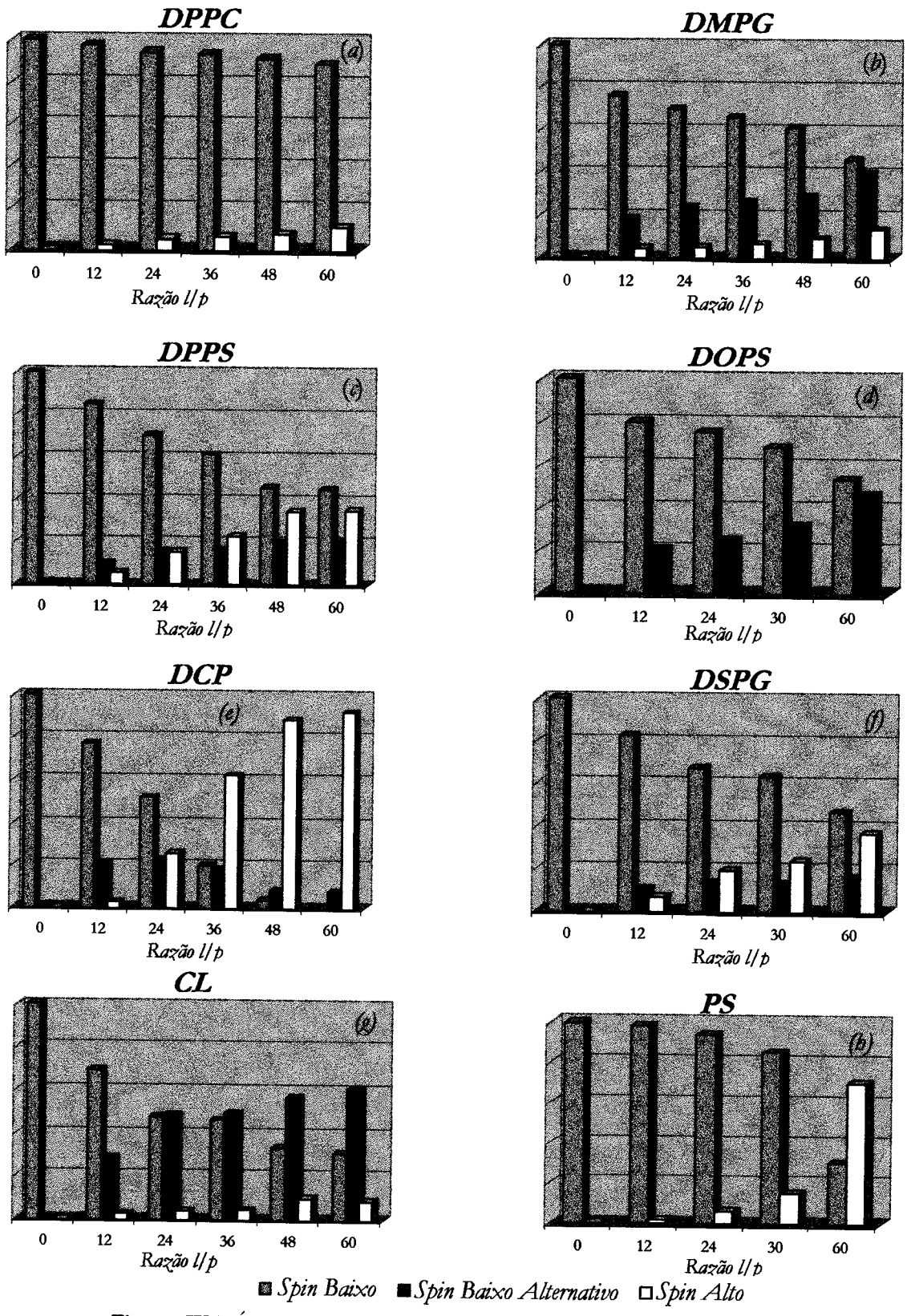
Experimentos também foram feitos com os lipossomos PC de gema de ovo, com cadeia de 16-20 C insaturada, dibutiril PC (C4:0) e didecanoil PC (C10:0), e PE de gema de ovo com cadeia de 16-20 C insaturada e não foi observada nenhuma alteração nos espectros de RPE.



Figuras IV.1. Espectros de RPE das membranas: (*a*) citocromo c/DPPC, (*b*) citocromo c/DMPG, (*c*) citocromo c/DPPS e (*d*) citocromo c/DSPG em diferentes razões l/p indicadas.



Figuras IV.1. Espectros de RPE das membranas: (*e*) citocromo c/DCP, (*f*) citocromo c/DOPS, (*g*) citocromo c/CL e (*h*) citocromo c/PS em diferentes razões l/p indicadas.



Figuras IV.2. Áreas das espécies de RPE, referentes aos espectros da Figura IV.1.

RPE do citocromo c do ferro hemínico na presença de lipossomos PCPECL

Vale destacar o resultado do RPE para a membrana PCPECL, pois esse lipossomo mimetiza a membrana interna da mitocondria. A Figura IV.4 ilustra os resultados de RPE para diferentes razões l/p. É interessante observar que, para essa associação, não ocorre o aparecimento do spin 1/2 alternativo. Em alta razão l/p, uma quantidade razoável da espécie paramagnética de spin alto com simetria rômbica é observada (g=4,3, campo magnético em 155 mT). O aparecimento do sinal do radical em torno de 330 mT devido à peroxidação lipídica também ocorre, analogamente ao que acontece com a membrana citocromo *c*/CL.

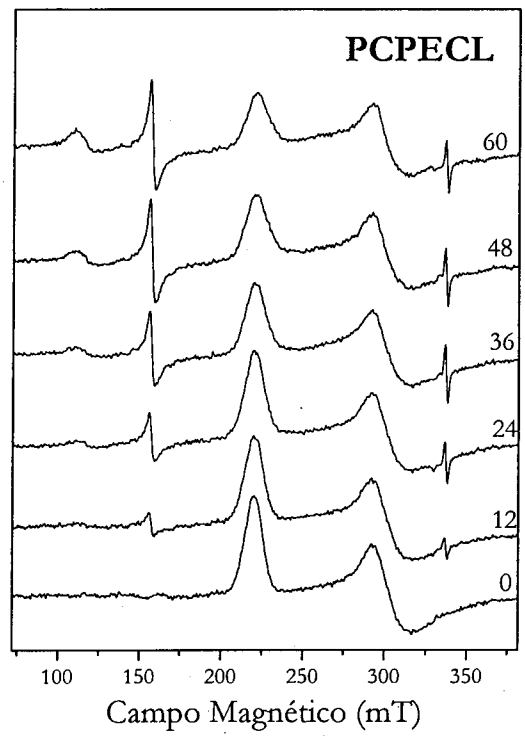


Figura IV.3 . Espectro de RPE da membrana citocromo *c*/ PCPECL em diferentes razões l/p indicadas.

Os resultados apresentados até aqui estão sistematizados nas Tabelas IV.1 e IV.2 a seguir. Na Tabela IV.1 estão resumidas as características dos lipídios utilizados: carga da cabeça, tamanho da cadeia carbônica e estado de spin verificado no espectro de RPE. Na Tabela IV.2 estão apresentados os parâmetros de RPE - forma de linha, largura de linha e parâmetro *g* - obtidos através da simulação dos espectros utilizando-se o programa *SinFonia*.

Tabela IV.1. *Características dos lipídios estudados.*

LIPÍDIOS	*CARGAS DA CABEÇA*	*LIGAÇÕES CARBÔNICAS*	*CADEIAS CARBÔNICAS*	*ESTADOS DE SPIN OBSERVADOS NO ESPECTRO DE RPE*
PE	+ –	Insaturadas	C_{16}-C_{20}	1/2
PC	+ –	Insaturadas	C_{16}-C_{20}	1/2
CL	– –	Insaturadas (80% ácido linoléico)	C_{18} (80%)	1/2 e 1/2 alternativo
PS	+ – –	Insaturadas	C_{16}-C_{20}	1/2 e 5/2
DPPC	+ –	Saturadas	C_{16}	1/2 e 5/2
DPPS	+ – –	Saturadas	C_{16}	1/2, 1/2 alternativo e 5/2
DOPS	–	Insaturadas	C_{18}	1/2 e 1/2 alternativo
DCP	–	Saturadas	C_{16}	1/2, 1/2 alternativo e 5/2
DSPG	–	Saturadas	C_{18}	1/2, 1/2 alternativo e 5/2
DMPG	–	Saturadas	C_{14}	1/2, 1/2 alternativo e 5/2
DDPC	+ –	Saturadas	C_{10}	1/2
DBPC	+ –	Saturadas	C_4	1/2

Tabela IV.2. *Parâmetros RPE obtidos a partir da simulação dos espectros de RPE utilizando-se o programa SinFonia.*

LIPÍDIO	*ESTADO DE SPIN*	*FORMA DA LINHA*	G_X	G_Y	G_Z	Δ_X	Δ_Y	Δ_Z
DPPC	5/2	L	5,900	5,900	2,002	95	95	10
	5/2	G	6,500	6,500	2,002	90	90	10
DMPG	5/2	L	5,920	5,920	2,002	64	64	10
	5/2	G	6,600	5,400	2,002	110	110	10
DPPS	5/2	L	5,900	5,900	2,002	65	65	10
	5/2	G	6,550	5,400	2,002	130	130	10
DSPG	5/2	L	5,900	5,900	2,002	65	65	10
	5/2	G	6,550	5,400	2,002	130	130	10
DCP	5/2	L	6,050	5,780	2,000	45	45	10
CL	5/2	L	6,000	5,950	2,000	70	70	10
PS	5/2	L	6,050	5,830	2,000	21	25	10
PCPECL	5/2	L	6,000	5,950	2,000	90	90	90
Spin 1/2 alternativo	1/2	L/G=0,5	2,968	2,275	1,510	73	73	200
Citocromo c livre	1/2	G	3,085	2,234	1,250	110	150	400

IV.2. Dicroísmo Circular Magnético (MCD) e Espectroscopia de Absorção Eletrônica (UV)

Modificações no estado de spin do ferro nas valências Fe^{3+} e Fe^{2+} foram também estudadas por MCD, monitorando-se assim as alterações do ferro hemínico na presença dos diferentes lipossomos. Para um estudo mais cuidadoso da associação do citocromo *c* com os lipossomos, o espectro do citocromo *c* foi adquirido com uma quantidade crescente de membrana.

A Figura IV.4.a ilustra o espectro de MCD do citocromo *c* (Fe^{3+}) na presença do lipossomo CL nas diferentes razões l/p. Podem-se observar, na região da banda de Soret no espectro de MCD, uma banda positiva em 400 nm e uma banda negativa em 418 nm para a proteína livre. O espectro de MCD da associação citocromo *c*/CL mostra uma diminuição de intensidade e um pequeno deslocamento para o azul na banda negativa com um mínimo agora em 415 nm. A banda de Soret no espectro de UV- Vis apresenta um deslocamento discreto (2 nm) para o azul na presença dos lipossomos.

O mesmo experimento foi realizado com o citocromo *c* (Fe^{2+}). A Figura IV.4.b ilustra o espectro de MCD do citocromo *c* (Fe^{2+}) tanto livre como na presença do lipossomo CL para as diversas razões l/p. Esse espectro é bastante diferente do obtido com o Fe^{3+}, já conhecido na literatura (Sutherland & Klein, 1972). O espectro de MCD do citocromo *c*, Fe^{2+}, exibe uma banda positiva em 418 nm (Figura IV.4.b). Um sinal proeminente aparece na banda de 549 nm que caracteriza o citocromo *c* ferroso. Na presença dos lipossomos CL, é observada uma partição da proteína associada às vesículas e ao meio aquoso. Os lipossomos CL promovem uma significativa modificação no espectro de MCD nas bandas Soret e *Q*, representando uma diminuição da intensidade da banda de MCD em 550 nm e um deslocamento da banda positiva de 415 para 400 nm. No espectro UV-Vis, um deslocamento mais acentuado para o azul da banda de Soret (7 nm) é também observado. Esse resultado é bem nítido na razão l/p=60.

Esses resultados se repetem de maneira muito semelhante para os seguintes lipossomos: DPPS, DSPG, DCP e PS. Entretanto, a variação das bandas como uma função da razão l/p apresenta diferenças.

Verificando-se os lipossomos de PCPECL e DOPS, constata-se que eles mostram resultados semelhantes. Contudo, tais resultados são diferentes dos acima mencionados. No caso da interação com o citocromo c Fe^{2+}, o espectro de MCD evolui com a razão l/p crescente assemelhando-se ao espectro do citocromo c Fe^{3+}, como se a proteína mudasse o estado de valência do íon de ferro (Figuras IV.5 e IV.6). Entretanto, os espectros de MCD para a associação citocromo *c*/DCP (Figura IV.7), como os demais (não ilustrados), não apresentam a banda negativa em 415 nm.

Um comportamento peculiar também ocorre na associação do citocromo *c* (Fe^{2+}) com o DMPG. Nesse caso, ocorrem um rápido desaparecimento da banda em 550 nm e um deslocamento da banda de 410 para 400 nm, logo na razão l/p=12. Posteriormente, já na razão l/p=24, ocorrem o crescimento ou a recuperação da banda de 550 nm e o retorno da banda de 400 para 410 nm (Figura IV.8).

Para uma apresentação mais objetiva dos resultados de MCD, serão apresentados os gráficos da elipticidade molar (Θ) em função da concentração de lipídio para os comprimentos de onda λ=400 e λ =550 nm, para o Fe^{2+}, e λ=415 nm, para o Fe^{3+}.

A Figura IV.9 ilustra esses gráficos para o citocromo Fe^{2+} e as Figuras IV.10 mostram os mesmos resultados correspondentes ao citocromo Fe^{3+}.

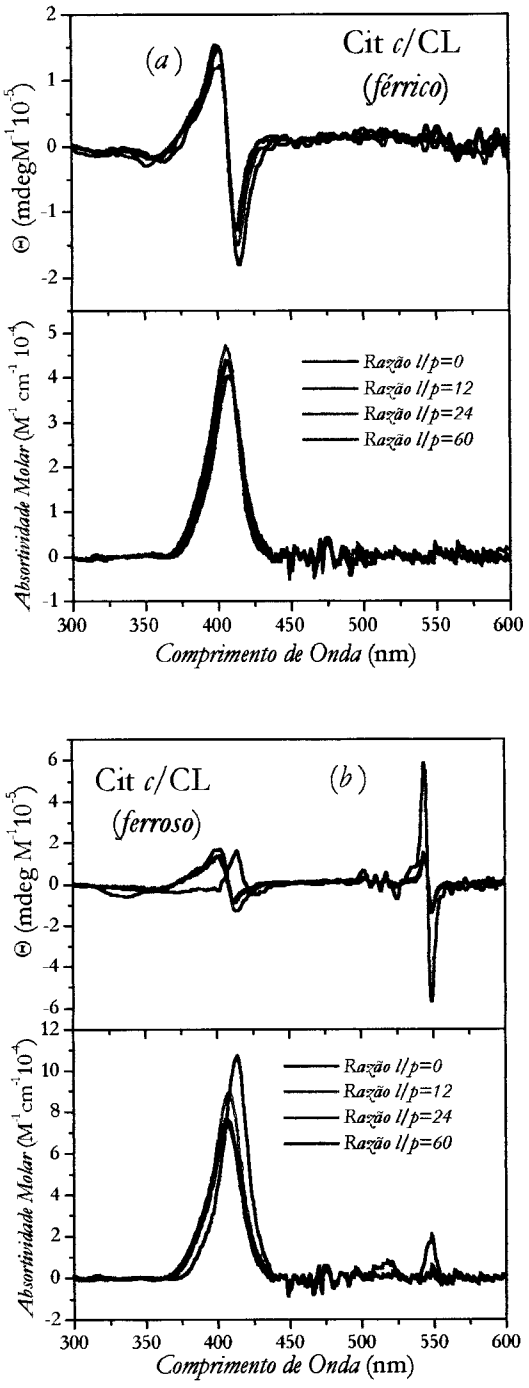


Figura IV.4. Espectros de MCD e UV-vis das membranas: (a) citocromo *c* (Fe^{3+})/CL, e (b) citocromo *c* (Fe^{2+})/CL em tampão HEPES, pH 7,4 e temperatura de 23°C.

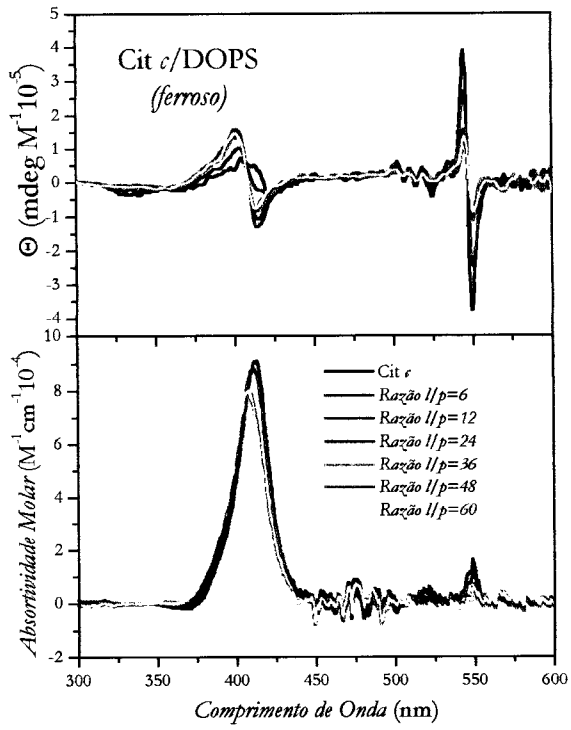


Figura IV.5. Espectros de MCD e UV-vis da membrana citocromo *c* (Fe^{2+})/DOPS em tampão HEPES, pH 7,4 e temperatura de 23°C.

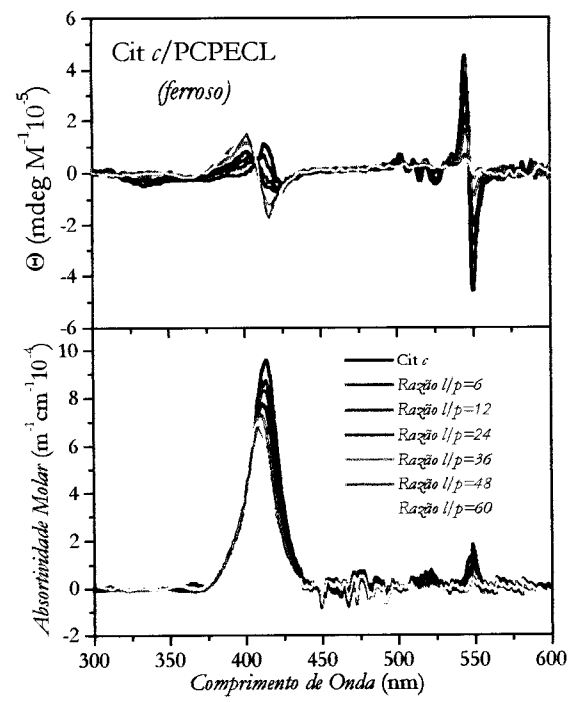


Figura IV.6. Espectros de MCD e UV-vis da membrana citocromo *c* (Fe^{2+})/PCPECL em tampão HEPES, pH 7,4 e temperatura de 23°C.

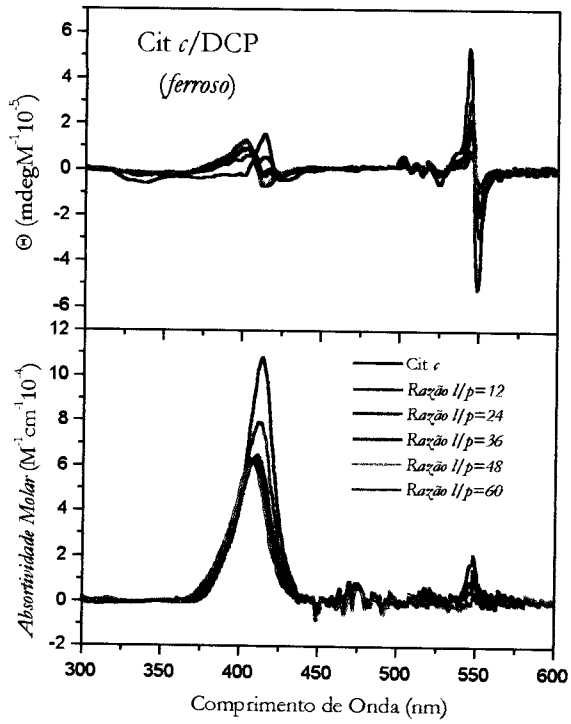


Figura IV.7. Espectros de MCD e UV-vis da membrana citocromo *c* (Fe^{2+})/DCP em tampão HEPES, pH 7,4 e temperatura de 23°C.

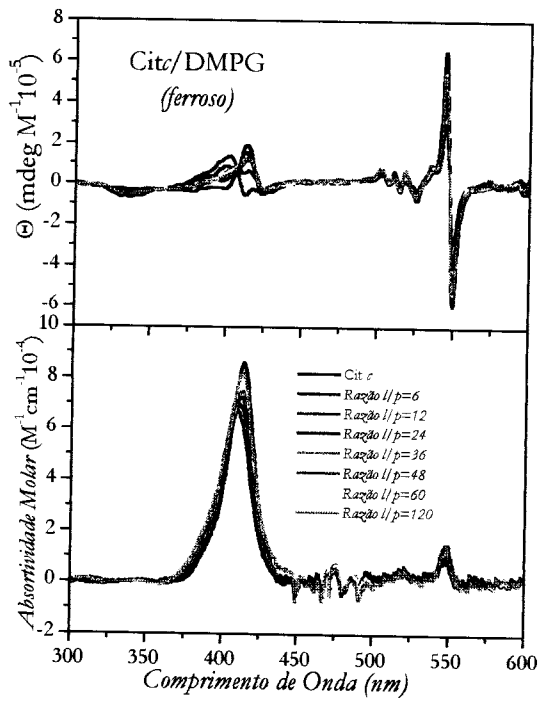
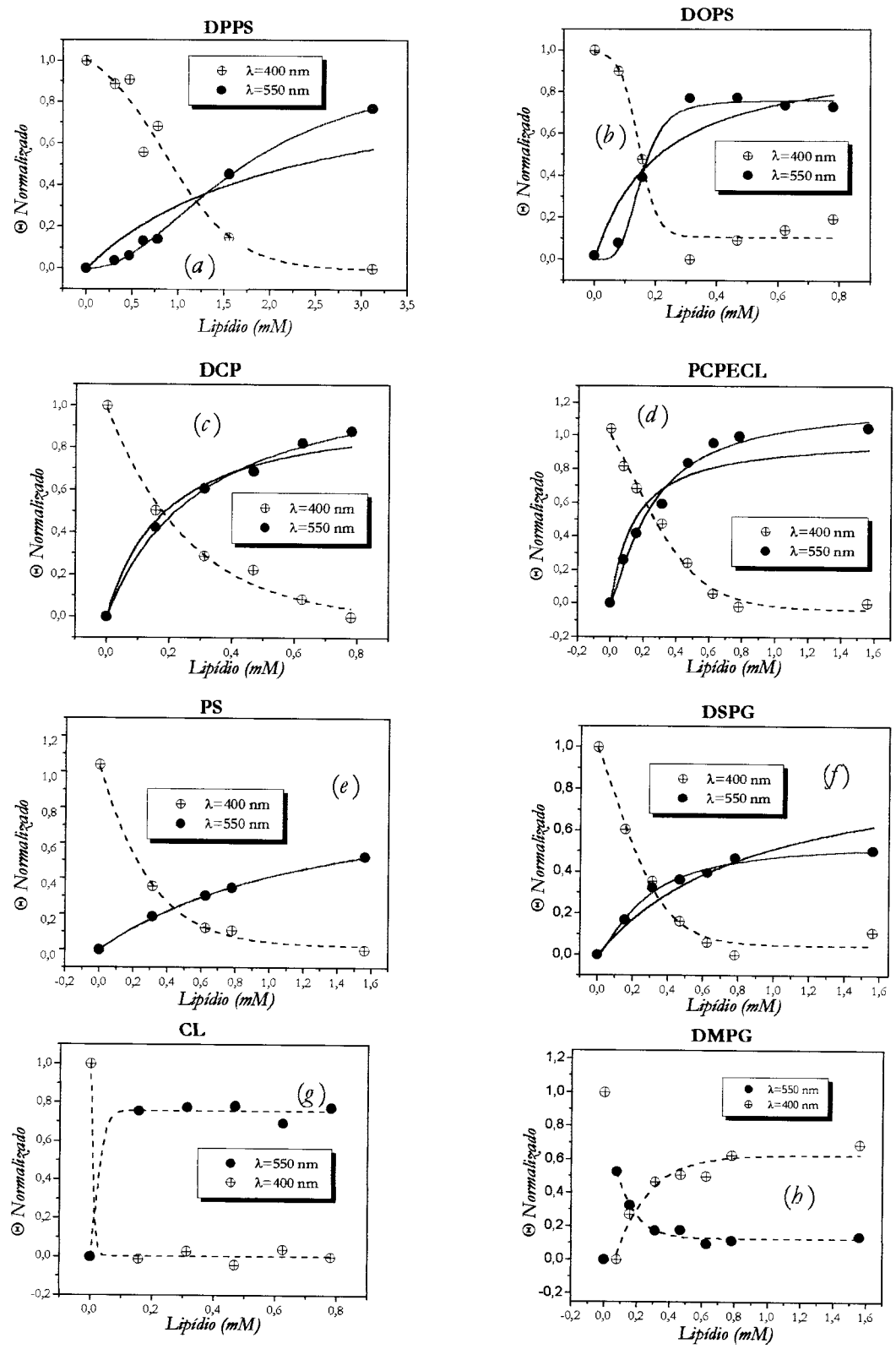


Figura IV.8. Espectros de MCD e UV-vis da membrana citocromo *c* (Fe^{2+})/DMPG em tampão HEPES, pH 7,4 e temperatura de 23°C.



Figuras IV.9. θ normalizado para diferentes associações citocromo *c* (ferroso)/lipossomo *versus* concentração de lipídio. O aparecimento de diferentes estados de spin está associado com a diminuição da elipticidade molar da banda em λ=550 nm e deslocamento da banda positiva de 418 para 400 nm. Em azul está ilustrado o ajuste que determina a constante de associação e em vermelho está ajustada a função de Hill.

IPSO-USP SERVIÇO DE BIBLIOTECA INFORMAÇÃO

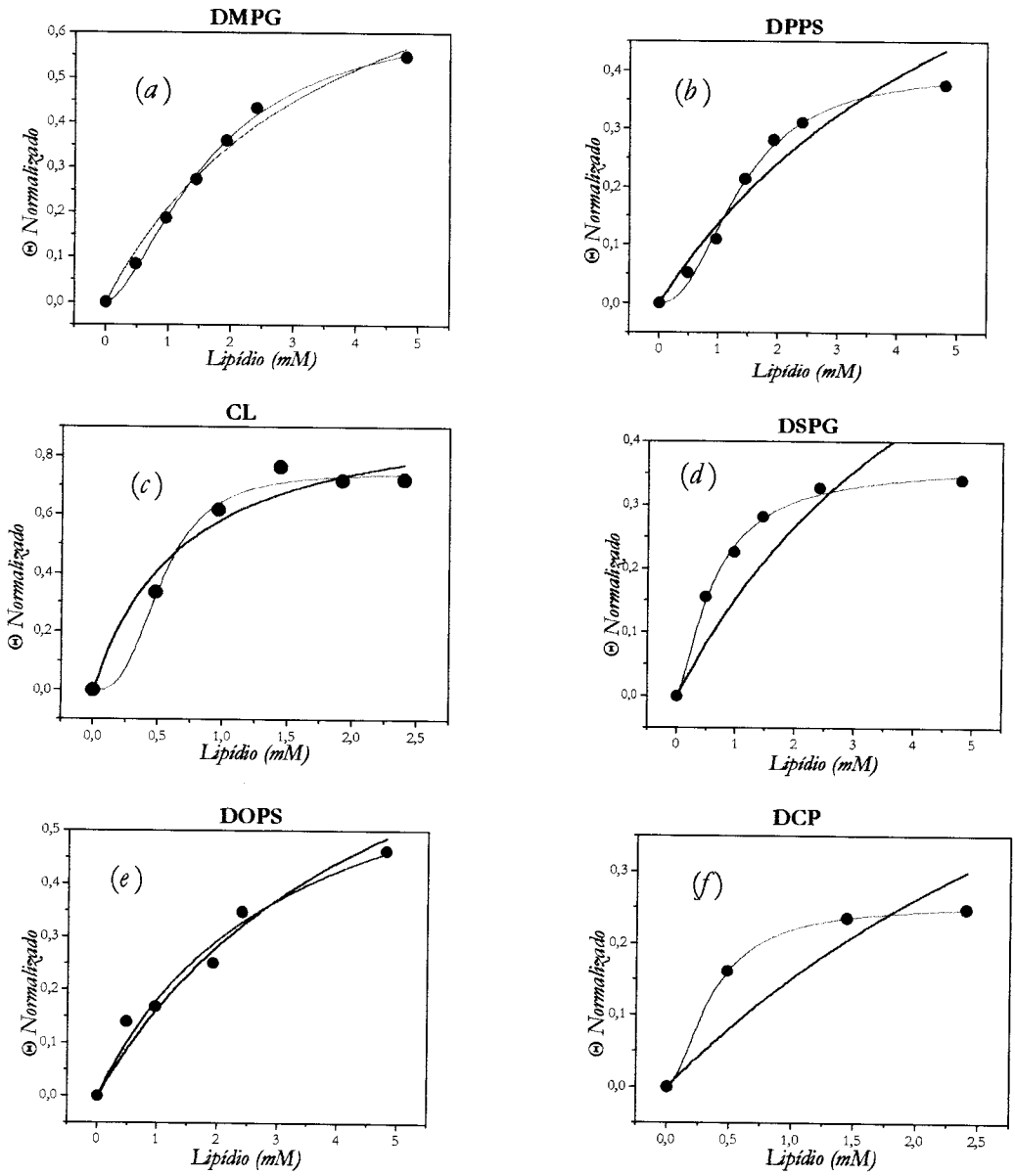


Figura V.I. 10. θ normalizado para diferentes associações citocromo *c* (férrico)/lipossomo *versus* concentração de lipídio. O aparecimento de diferentes estados de spin está associado com a diminuição da elipticidade molar da banda em λ=415 nm. Em azul está ilustrado o ajuste que determina a constante de associação e em vermelho está ajustada a função de Hill.

Para efeito de comparação das curvas de Θ normalizado *versus* concentração de lipídio, foi efetuado o ajuste dessas curvas utilizando a equação de Hill, cujos parâmetros estão ilustrados na Tabela IV.3, a seguir. Os parâmetros K_d e n correspondem a constante de

afinidade e grau de cooperatividade de dissociação, respectivamente. Na associação do citocromo *c* ferroso observa-se maior grau de cooperatividade com os lipossomos CL, DOPS (n~4). O DSPG, PCPECL e DPPS também são cooperativos. O DCP e PS não apresentam cooperatividade. Na associação do citocromo *c* férrico, observa-se maior grau de cooperatividade com o lipossomo CL (n~2,9) seguido do DCP, DPPS, DMPG e DSPG, que ainda apresentam cooperatividade. No caso do lipossomo DOPS não se observou cooperatividade.

Nenhuma alteração ocorre na associação do citocromo *c* com as membranas PE e PC.

Em relação aos parâmetros acima apresentados (Tabela IV.3), vale lembrar que as constantes de cooperatividade (n) dependem do tipo da curva de Θ normalizado *versus* concentração de lipídio. Já as constantes de afinidade (K_d) possuem uma dependência com o tamanho das vesículas lipídicas. Entretanto a constante de afinidade pode variar de um experimento para outro, visto que o tamanho das vesículas não foi padronizado com o uso de um extrusor.

Outro estudo foi efetuado através do ajuste das curvas de Θ normalizado *versus* concentração de lipídio utilizando uma função do tipo $f(x)=K_a\ (x)/1+\ K_a\ (x)$, onde K_a corresponde à constante de associação. Os valores de K_a obtidos através dos ajustes estão ilustrados na Tabela IV.3.

Tabela IV.3. Constante de associação (K_a), constante de afinidade (K_d) e grau de cooperatividade (n).

LIPÍDIO	Fe^{3+}			Fe^{2+}		
	K_a	K_d	n	K_a	K_d	n
CL	1,4 ± 0,2	0,52 ± 0,04	2,9 ± 0,8	- *	- *	- *
DMPG	0,27 ± 0,01	1,7 ± 0,1	1,6 ± 0,1	-	-	-
PS	-	-	-	0,70 ± 0,01	1,4 ± 0,1	1
DSPG	0,18 ±0,04	0,62 ± 0,07	1,4 ± 0,3	1,1 ± 0,1	1,7 ± 0,2	1,24
PCPECL	-	-	-	6,9 ± 1,6	0,25 ± 0,06	1,3 ± 0,3
DCP	0,18 ± 0,04	0,36 ±0,06	1,7 1±0,96	5,4 ± 0,5	0,31 ± 0,05	1
DOPS	0,20 ± 0,01	3,2 ± 0,1	1	5 ± 1	0,15 ± 0,01	4,09 ± 1
DPPS	0,16 ± 0,01	1,7 ± 0,1	1,6 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,27 ± 0,04	1,37 ± 0,3

* Não foi possível realizar o ajuste devido à rápida saturação do sistema.

Os resultados obtidos para a constante de afinidade apresentados na tabela acima sugerem que a associação do citocromo *c* com as vesículas lipídicas ocorrem na seguinte ordem CL, PCPECL, DSPG, PS, DCP, DPPS, DOPS para o citocromo *c* ferroso e CL, DMPG, DOPS, DCP, DSPG e DPPS para o caso do citocromo *c* férrico. É importante observar que a vesícula que interage mais fortemente com o citocromo *c* tanto em seu estado férrico como em seu estado ferroso é a CL. O melhor ajuste para a curva de Θ normalizado *versus* concentração lipídio referente à associação citocromo *c* férrico/CL foi o de Hill. No caso da associação citocromo *c* ferroso/CL, a curva apresentou um comportamento bastante hiperbólico, não sendo possível efetuar nenhum ajuste. A cardiolipina é especial pelo seu papel biológico, pois é um importante componente da intermembrana da mitocôndria.

Comparando os ajustes realizados, observa-se que os ajustes de Hill são mais representativos para as associações do citocromo *c* ferroso com DPPS, DOPS e PCPECL, e são equivalentes ao ajuste da constante de associação no caso do DCP, PS e DSPG. Já no caso do citocromo *c* férrico, os ajustes de Hill são mais representativos para o caso do DPPS, CL, DSPG e DCP, e são equivalentes ao ajuste da constante de associação para o DMPG e DOPS.

V.DISCUSSÃO

Citocromo c férrico

Os resultados obtidos com o citocromo *c* férrico associado aos diferentes tipos de lipossomo, observados através da técnica de RPE-CW (Figura IV.1), mostram a presença de diferentes estados de spin: um sinal correspondente ao estado de spin 1/2 com três valores de g (g_x=3,085, g_y=2,234 e g_x=1,250) identificados como os sinais da proteína em solução aquosa, um sinal correspondente ao estado de spin 5/2 com valores de $g_{\perp}\cong 6$ e $g_{//}\cong 2$, um sinal correspondente ao estado de spin 1/2 com três valores de g diferentes daquele da proteína em solução aquosa e que está chamado aqui de spin 1/2 alternativo (g_x=2,968, g_y=2,275 e g_x=1,500) e um sinal correspondente ao estado de spin alto com simetria rômbica e valor de g=4,3. Em presença de determinados lipídios biológicos, concomitante com este último sinal (g=4,3) também é detectado um sinal associado a um radical com valores de g_1=2,014, g_2=2,008 e g_3=2,004. Outro resultado que pode ser mencionado é a dependência da distribuição das espécies paramagnéticas em relação ao tipo de lipídio associado à proteína citocromo *c* (Figuras IV.1).

Reversibilidade do spin alto (S=5/2) do citocromo c férrico

A existência do spin 5/2 para o citocromo *c* está descrita na literatura como uma desnaturação da proteína na presença do lipossomo de CL (Vincent *e col.*, 1987). Essa explicação está baseada no fato de que, com uma alteração do pH da solução aquosa do citocromo *c* para um valor muito baixo ou próximo de 1,5, o sinal de RPE mostra a conversão do estado de spin de 1/2 para 5/2, correspondente a uma desnaturação ácida da proteína. Entretanto, a adição de NaCl ao meio proteína/lipossomo promove o desligamento da hemoproteína da membrana, observando-se assim uma diminuição da espécie de spin 5/2 e uma recuperação da espécie de spin 1/2. Na Figura V.1. a seguir, estão ilustrados alguns experimentos em que se mostra tal desligamento utilizando as membranas DCP, DMPG e CL. Nesses casos, as membranas foram preparadas e divididas em duas partes. Em uma das partes foi acrescentado o NaCl para comparação com a parte em que tal composto não foi acrescentado. Observa-se que, para o DCP, ocorrem a

diminuição da espécie de spin 5/2 e o reaparecimento da espécie de spin 1/2 característico da proteína livre. Com a adição de NaCl, recupera-se todo o sinal do spin 1/2 característico do citocromo livre, no caso do DMPG. No caso da CL, onde também se observa o desaparecimento parcial da espécie de spin 1/2 alternativo, tal recuperação não é total. Esse fato deixa claro que as modificações conformacionais que levam a mudanças do estado de spin no citocromo *c*, induzidas pela associação proteína/lipossomo, são reversíveis.

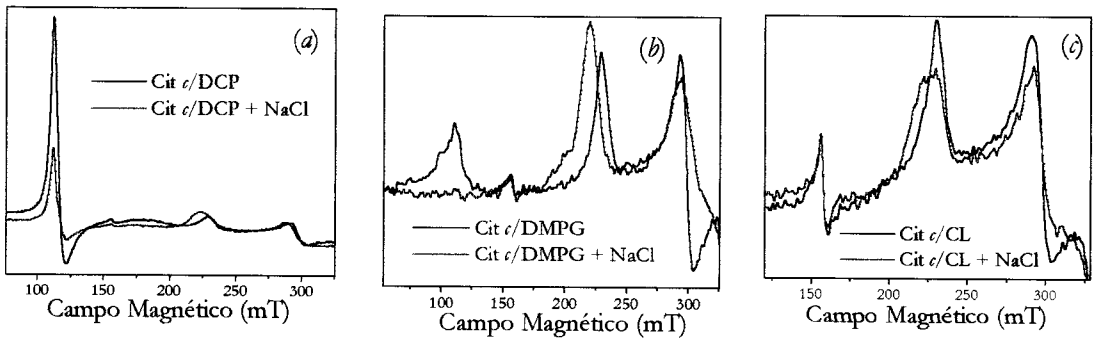


Figura V.1. Espectro de RPE do citocromo c associado aos lipossomos (a) DCP, (b) DMPG e (c) CL, na razão l/p=30 (em preto) e na razão l/p=30 com NaCl (em vermelho).

Estados de spin alto (S=5/2) e baixo (S=1/2) do citocromo c férrico

Para explicar o aparecimento das espécies com estado de spin 5/2, basta admitir que a associação do citocromo *c* com os lipossomos induz mudanças conformacionais que afastam o resíduo de metionina, aminoácido que contém o átomo de enxofre, desligando-o parcialmente do íon de ferro, modulando o campo cristalino de forte para fraco e mudando como conseqüência o estado de spin de 1/2 para 5/2. Esse efeito é obtido com os lipossomos CL, DPPC, DMPG, DPPS, DSPG, DCP e PS em ordem crescente de população, em que, para CL, a população estimada é de 5%, e, para DCP e PS, tal estimativa é praticamente 100%.

O aparecimento da espécie de spin 1/2 alternativo pode ser devida a mudança conformacional induzida pela associação com os lipossomos, isso deve diminuir a distorção rômbica do ferro hemínico, possivelmente afrouxando o ambiente onde se localiza o anel hemínico como sugerem as análises dos dados de dicroísmo circular no UV obtidos por Nantes *e col.*, (2001). Esse afrouxamento pode também permitir que uma cadeia carbônica de algum lipídio vizinho ao heme se introduza no bolso hidrofóbico, alterando a simetria local do ferro, como sugerem Rytömaa & Kinnunen (1995), afastando o enxofre da metionina do íon de ferro hemínico. O aparecimento dessa espécie de spin 1/2 alternativo

ocorre com os lipossomos DSPG, DPPS, DCP, DOPS, DMPG e CL em ordem crescente de população, em que para DSPG, a população estimada é de 20%, e, para CL, tal estimativa é de 60%. No caso do DCP, há uma competição entre os dois estados de spin formados pela associação proteína/lipossomo.

Com base nessas hipóteses, o efeito das associações dos diferentes lipossomos conta tanto com o efeito eletrostático como com a interação hidrofóbica para promover o aparecimento das espécies de spin 1/2 alternativo e de spin 5/2.

Correlação das modificações dos estados de spin do citocromo c férrico com os diferentes lipossomos associados

Considerando-se os lipídios *zwiteriônicos* (DPPC, PE, PC, DDPC e DBPC), observa-se, dos resultados de RPE, que somente a associação com o DPPC resulta em uma pequena formação da espécie de spin 5/2 (cerca de 14%). Os outros não produzem quaisquer modificações no espectro de RPE. Fazendo a mesma análise com lipossomos formados por lipídios carregados negativamente (CL, DMPG, DPPS, DSPG, DCP e PS), nota-se que a ocorrência da espécie de spin 5/2 possui uma correlação com o aumento do comprimento da cadeia carbônica nos lipídios saturados, o que parece sugerir que a inserção da cadeia carbônica é o fator de importância na mudança conformacional que afasta o enxofre da metionina 80 das vizinhanças do íon de ferro. A exceção seria o DCP que tem cadeia carbônica menor do que a do DSPG e igual àquela do DPPS, entretanto a cabeça polar é bem menos volumosa que a cabeça polar do DSPG e do DPPS. Nesse caso, a interação eletrostática permitiria uma melhor acomodação estérica da cabeça polar do DCP na proteína, compensando a diferença de comprimento da cadeia carbônica.

Observando-se o efeito da presença de ligações insaturadas das cadeias carbônicas na associação proteína/lipossomo, como é o caso de CL e DOPS, nota-se que somente o estado de spin 1/2 alternativo é formado, o que sugere que a dobra da cadeia carbônica formada pela ligação dupla cria um impedimento estérico impedindo uma acomodação adequada da cadeia na região hidrofóbica da proteína. O fato descrito provavelmente impede o aparecimento de modificações no espectro de RPE da associação entre a proteína e os lipossomos de PE e PC que são *zwiteriônicos*.

Pode-se fazer uma correlação com o aparecimento da espécie de spin 1/2 alternativo do citocromo *c* associado com a estrutura dos lipídios utilizados. O fator que mais importa na associação proteína/lipossomo é a presença da carga negativa da cabeça polar, independente do tamanho ou da existência de insaturação da cadeia carbônica. Dos

resultados de RPE, a espécie de spin 1/2 alternativo não aparece na associação do citocromo *c* com os lipossomos de lipídios *zwiteriônicos*.

Nessa análise, a única exceção é o resultado observado na associação do citocromo *c* com os lipossomos de PS. Nesse caso, só é formada a espécie de spin 5/2. Os lipídios PS são extraídos do cérebro bovino e a composição não é bem determinada. Por outro lado, esses lipídios já estavam estocados no laboratório por mais de cinco anos e as cadeias insaturadas poderiam já estar peroxidadas. A peroxidação lipídica foi observada com os lipídios de CL nos primeiros experimento realizados neste trabalho. O resultado da associação entre a CL peroxidada e o citocromo *c* será comentado ainda neste capítulo.

Associação do citocromo c com o lipossomo PCPECL, o qual mimetiza a membrana interna da mitocôndria

Os resultados de RPE da associação do citocromo *c* com o lipossomo PCPECL (2:2:1), que mimetiza a membrana interna da mitocôndria, comparada com a associação com o lipossomo de CL (Figuras IV.3 e IV.1.g, respectivamente) mostra basicamente que não há a formação da espécie de spin 1/2 alternativo. No espectro de RPE (Figura IV.1.g), pode-se observar apenas um pequeno alargamento da linha em g_z, ou seja, em campo de 220,8 mT. Esse resultado indica que a acomodação da proteína, que interage eletrostaticamente com as cargas negativas das cabeças polares dos lipídios, depende do arranjo das cabeças polares vizinhas ao lipídio que oferece a carga para a interação, já que a presença de PC e PE (*zwiteriônicos*) como vizinhos impede o aparecimento do spin 1/2 alternativo. Nessa mistura de lipídio, para cada CL de cabeça polar negativa existem quatro lipídios de cabeça polar *zwiteriônica*. É importante aqui notificar que os lipossomos de PC ou de PE não mostram modificações na associação com o citocromo *c* observadas por RPE.

Embora o citocromo *c* não integre nenhum complexo protéico da cadeia respiratória, ele necessita interagir com o lado externo da membrana mitocondrial interna para desempenhar sua função como transportador de elétrons. Dessa forma, a sua associação com a membrana mitocondrial deve favorecer uma conformação protéica adequada ao transporte de elétrons e altamente inadequada à atividade peroxidase, impedindo, assim, o ataque aos lipídios da membrana. É interessante notar que a própria topologia do citocromo *c* associado à membrana mitocondrial assegura uma baixa atividade peroxidática visto que a maior parte do conteúdo de cardiolipina da membrana mitocondrial interna (80%) está localizada do lado interno da membrana, portanto sem

contato com o citocromo *c*. Por ser negativamente carregada, a cardiolipina aumenta substancialmente a atividade peroxidática do citocromo *c* sobre vários substratos incluindo os compostos carbonílicos e os peróxidos resultantes da oxidação de lipídios (Nantes *e col.*, 1998). Essa topologia peculiar também deve assegurar a liberação do citocromo *c* da membrana mitocondrial interna para disparar o evento apoptótico no citossol.

Dessa forma, na membrana PCPECL os lipídios de Cl são substituídos por lipídios de PC e PE presentes na vizinhança pelo processo denominado *flip-flop,* coordenado pelas flipases, existindo uma preferência por deixar os lipídios de CL do lado interno da membrana interna da mitocôndria, diminuindo-se assim a atividade peroxidática do citocromo *c*. Esses fatos acima relatados encontram suporte nos resultados de RPE com os lipossomos de PC e PE, que não apresentam alteração no heme, de PCPECL, que apresentam pequena alteração no heme, e de CL, no qual ocorre o aparecimento do spin 1/2 alternativo.

A associação do citocromo c na presença de lipossomos de CL peroxidada

Observa-se, ainda na Figura IV.3, o aparecimento do sinal de RPE em g=4,3 e de um sinal de radical livre em g=2 correspondente à reação do citocromo *c* com os lipídios de CL que estão peroxidados. Esse resultado torna-se bem claro quando se estuda a associação do lipossomo de CL já bem peroxidada como mostra a Figura V.2 a seguir. Nessa figura, são apresentados os espectros de RPE para o citocromo *c* em solução aquosa, associado com lipossomo de CL não peroxidada, com CL peroxidada e em solução aquosa na presença de *t*-butil peróxido.

A peroxidação lipídica ocorre quando o oxigênio do ar reage com a dupla ligação do lipídio insaturado. No caso, a CL possui 80% de ácido linoléico, o qual possui duas ligações duplas.

A associação da CL peroxidada promove uma mudança significativa do ferro hemínico. Observa-se o proeminente sinal correspondente ao spin intermediário S=3/2 (g=4,3) com simetria rômbica. Concomitatemente ocorre o desaparecimento da banda de Soret (*bleaching*) no espectro de UV-vis em um tempo de 20 minutos a partir da preparação.

Tanto o sinal de RPE, spin intermediário com g=4,3, quanto a diminuição da banda de Soret ocorrem devido a alterações no anel pirrólico, provavelmente o rompimento de uma ligação com um nitrogênio do referido anel.

Na presença de *t*-butil peróxido, observa-se o radical peroxil, mas, na presença da CL muito peroxidada, o radical não é observado, provavelmente devido ao longo tempo da preparação em relação ao rápido tempo da reação e do conseqüente desaparecimento desse radical. No entanto, foi possível detectá-lo na presença de CL pouco peroxidada e identificar os parâmetros de RPE já relatados no *Capítulo IV*. Esses resultados da interação do íon de ferro com lipídios na presença de *t*-butil peróxido estão sendo investigados mais detalhadamente como subprojeto deste trabalho.

A existência dessa reação indica que a cadeia carbônica deve se aproximar do heme para que a reação ocorra e, portanto, corrobora o modelo de inserção da cadeia lipídica no sítio hidrofóbico próximo ao heme.

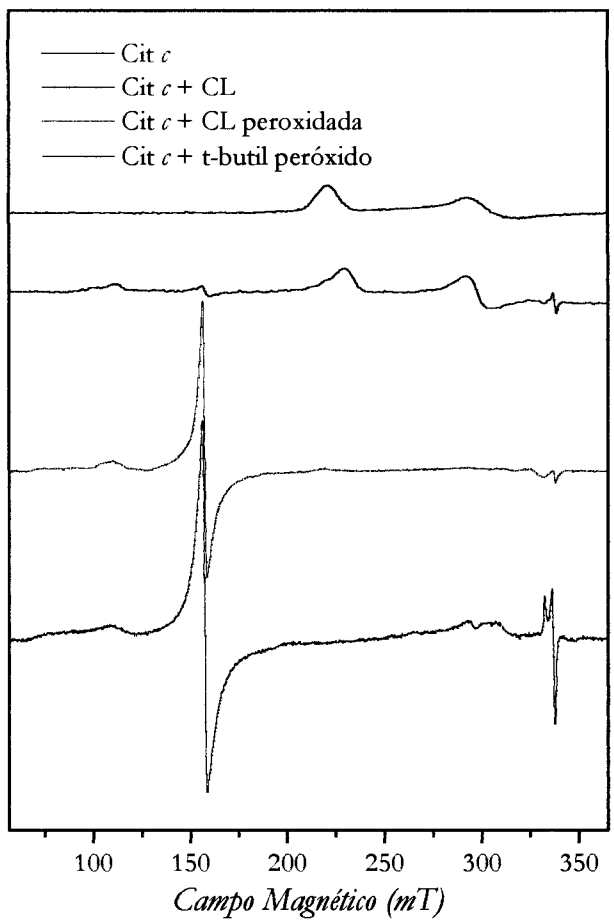


Figura V.2. Espectro de RPE do citocromo c livre (a), associado com o lipossomo Cl (b), na presença de CL peroxidada (c) e na presença de *tert*-butil peróxido (d) na razão l/p=48.

A associação do citocromo c com lipossomos promove mudanças conformacionais na proteína

Os espectros de MCD dos citocromos *c* férrico e ferroso revelam que a associação da hemoproteína com as vesículas promove mudanças conformacionais no grupo heme. A Figura IV.4 ilustra a associação do citocromo c com lipossomo CL, como exemplo, induzindo significativas mudanças estruturais na proteína ou no grupo heme, em ambos os estados (férrico e ferroso).

A conversão do spin baixo (S=1/2) para o spin baixo alternativo do citocromo c férrico é acompanhada pelo decréscimo da banda negativa de MCD em 415 nm enquanto que a conversão para o spin alto (S=5/2) não apresenta modificações nas bandas de MCD

Nas associações nas quais o estado de spin 1/2 alternativo é detectado pelas medidas de RPE (Figuras IV.1.b, IV.1.c, IV.1.d, IV.1.e, IV.1.f, IV.1.g), os espectros de MCD do citocromo *c* exibem correspondente decréscimo e deslocamento para o azul da banda negativa de 415 nm na mesma ordem de intensidade populacional observada no RPE (Figura IV.10). É interessante notar que somente o segmento negativo do espectro de MCD é algo sensível à conversão do spin 1/2 do ferro hemínico (correspondente ao citocromo *c* livre) para o estado de spin 1/2 alternativo (correspondente ao citocromo *c* associado ao lipossomo). Esses dados sugerem que a mudança de simetria induzida pelo lipídio é acompanhada por pequenas alterações rotacionais em regiões que preferencialmente absorvem luz circularmente polarizada à direita (Van Holde, 1971).

A conversão do citocromo *c* férrico de spin 1/2 para spin 5/2 não é acompanhada por mudança no espectro de MCD. Esse resultado já era esperado uma vez que, na temperatura ambiente, os sinais de MCD para hemoproteínas férricas spin 1/2 e spin 5/2 são muito semelhantes em forma e intensidade. Entretanto, em baixas temperaturas, o sinal de MCD do estado de spin 1/2 é cerca de 100 vezes mais intenso que aquele correspondente ao estado de spin 5/2 (Cheesman, 1991).

Para as mudanças correlacionadas com a espécie de spin 1/2 alternativo, os gráficos com ajustes de Hill (Figura IV.10) mostram que existe cooperatividade da associação citocromo *c*/lipossomo na ordem decrescente de cooperatividade: CL, DCP, DMPG, DPPS, DMPG, DSPG e variando a constante de cooperatividade *n* de 2,9 para 1,0 (Tabela IV.3). Esse efeito sugere que, ao associar uma proteína ao lipossomo, há uma mudança estrutural do lipossomo que facilita a associação da próxima proteína.

Comparando os ajustes das curvas de Θ normalizado *versus* concentração de lipídio, no caso do citocromo *c* férrico, os ajustes de Hill são mais representativos para DPPS, CL, DSPG e DCP e são equivalentes ao ajuste da constante de associação no caso do DMPG e DOPS. Isso indica que há uma cooperatividade na associação do citocromo *c* (férrico) com os lipídios estudados.

Citocromo c ferroso

Quando o citocromo *c* ferroso se associa com os lipossomos CL, DPPS, DSPG, DCP e PS a modificação do espectro de MCD indica a perda do sinal em 550 nm, um deslocamento da banda positiva de 418 nm para 400 (Figuras IV.4b e IV.9). Comparando os presentes resultados de MCD com o resultado bem conhecido da oxi e da desoxi-hemoglobina humana, cujo estado de spin é bastante conhecido (Eaton & Hofrichter, 1981), identificamos que o citocromo *c* ferroso em meio aquoso apresenta spin (S=0) característico de um forte sinal em 550 nm no espectro de MCD. Quando associado com membranas, o ferro hemínico no citocromo *c* ferroso apresenta o estado de spin na forma de spin alto (S=2). Nesse caso, o intenso sinal no espectro de MCD em 550 nm desaparece.

Essas mudanças poderiam indicar que há uma conversão do estado de spin do íon Fe^{2+} de S=0 para S=2. Esse resultado é corroborado pela reversibilidade do sinal de MCD quando a proteína é dissociada dos lipossomos por adição de NaCl (Nantes *e col.*, 2001). É importante notar que essas bandas na região da banda de Soret são muito parecidas com aquelas do citocromo *c* em estado férrico e poderiam induzir uma mudança de valência do íon ferro de 2+ para 3+ quando associado com esses lipossomos.

No caso da associação do citocromo *c* com os lipossomos DOPS e PCPECL, as bandas de MCD parecem indicar que parte das proteínas é realmente oxidada (Figura V.3). Foram realizadas as medidas de RPE para verificar a existência de citocromo *c* férrico com o lipossomo de DOPS. O resultado foi positivo, verificando-se que algum processo de oxidação ocorreu. É possível que os lipídios utilizados já não estivessem isentos de peroxidação. No caso do lipossomo PCPECL, resultados anteriores de MCD e de RPE (Nantes *e col.*, 2001) mostraram que não há a mudança de valência, o que sugere que provavelmente a hipótese de peroxidação desses lipossomos era correta.

As análises dos ajustes de Hill sugerem que, no estado ferroso, a associação citocromo *c*/DOPS apresenta maior cooperatividade, seguida pelas associações citocromo *c*/DPPS, citocromo *c*/DCP e citocromo *c*/PCPECL. Esses resultados estão ilustrados na Figura IV.9 e na Tabela IV.3). No caso da associação do citocromo *c* ferroso com CL já na

razão l/p=12, a associação já é praticamente completa, ocorrendo a saturação. Esse fato torna inviável o uso do modelo de Hill para um ajuste adequado. Para tal análise, seria necessário realizar essas medidas em razões l/p menores que 12.

Comparando os ajustes realizados, observa-se que os ajustes de Hill são mais representativos para as associações do citocromo *c* ferroso com DPPS, DOPS e PCPECL e são equivalentes ao ajuste da constante de associação no caso do DCP, PS e DSPG, o que indica que há uma cooperatividade na associação do citocromo *c* (ferroso) com os lipídios estudados.

Um resultado peculiar ocorre ainda com o citocromo *c* ferroso na associação citocromo *c*/DMPG (Figura IV.8). Como já descrito na literatura, o DMPG possui duas transições de fase, uma na temperatura de 18° C e outra em torno da temperatura de 38° C, a qual é fortemente dependente da concentração salina da solução (Riske *e col.,* 1997). As medidas de MCD são realizadas à temperatura de 25° C. Como no procedimento do experimento realizado a força iônica não está controlada, à medida em que aumentamos a quantidade de lipossomos, a concentração salina relativa diminui. Esse efeito sobre os lipossomos pode estar modulando a associação com o citocromo *c*, que também é carregado. Esse comportamento diferenciado em relação aos outros lipídios pode estar relacionado com essas transições de fase do DMPG, já que a proteína citocromo *c* é carregada e compete com a força iônica usada com o tampão HEPES. Esse ponto também deverá ser motivo de investigações futuras.

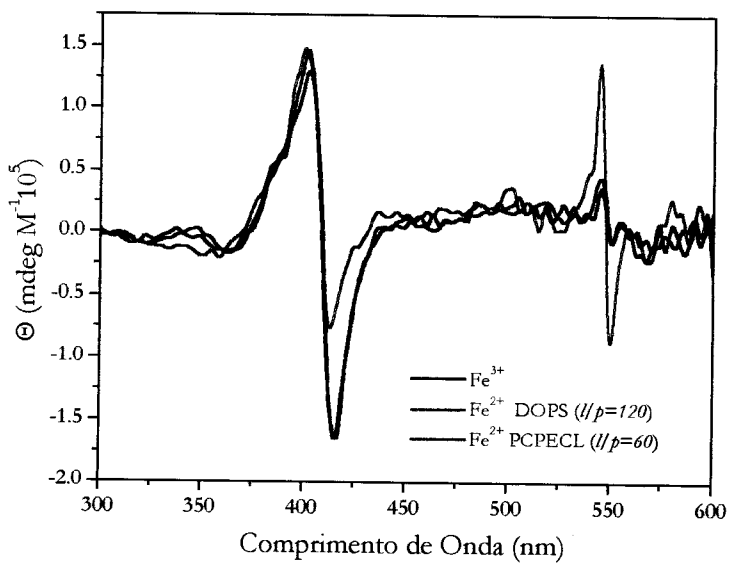


Figura V.3. Espectro de MCD do citocromo *c* ferroso associado com o lipossomo DOPS (em vermelho) e com PCPECL (em azul) e do citocromo *c* férrico livre (em preto).

O modelo

A Figura V.4 a seguir ilustram a molécula do citocromo *c*. As Figuras V.4.a e V.4.c são representações da superfície eletrostática do citocromo *c* realizadas através do programa *LabWiew*. A proteína está representada nas duas faces sendo que as Figuras V.4.c e V.4.d são faces opostas (giradas de 180°) da proteína representada nas Figuras V.4.a e V.4.b, respectivamente. Nas Figuras V.4.b e V.4.d, estão destacados os resíduos lisina (em azul) responsáveis pela interação eletrostática entre a proteína e os lipídios carregados negativamente. O canal hidrofóbico proposto por Takano (Takano *e col*, 1973) está representado em verde. Em rosa estão ilustrados os resíduos sugeridos por Rytömaa & Kinnunen (Rytömaa & Kinnunen, 1995), os quais seriam as *âncoras* para a interação hidrofóbica entre o lipídio e a proteína.

Rytömaa & Kinnunen (1995) sugerem que os lipídios carregados negativamente interagem eletrostaticamente com as lisinas 72 e 73, enquanto os lipídios *zwiteriônicos*, ou neutros, fazem uma ligação química com a asparagina 52. A partir dessa interação inicial ocorreria então a penetração da cadeia carbônica no bolsão hidrofóbico da proteína. Vale salientar que os resíduos sugeridos por Rytömaa & Kinnunem, a asparagina 52 e as lisinas 72 e 73, estão localizados no lado oposto das da das lisinas sugeridas por Takano (Takano *e col*, 1973).

Os resultados de RPE discutidos anteriormente concordam com o modelo proposto por Rytömaa & Kinnunen (1995), que estabelece a penetração da cadeia carbônica no bolsão hidrofóbico do citocromo *c*. Esses resultados também corroboram que há uma interação eletrostática inicial entre o citocromo *c* e os lipídios carregados negativamente.

Foram realizados alguns cálculos para se detectarem canais físicos dentro da proteína, mas aparentemente na estrutura da proteína citocromo *c* não foi possível detectar nenhum canal físico de modo a acomodar uma cadeia carbônica. Vale lembrar que a proteína não foi avaliada em seu estado dinâmico e, portanto, como especulação, acredita-se que, no modelo dinâmico, ocorra uma abertura do canal sugerido por Takano (Takano *e col*, 1973) de modo a acomodar a cadeia uma carbônica do lipídio.

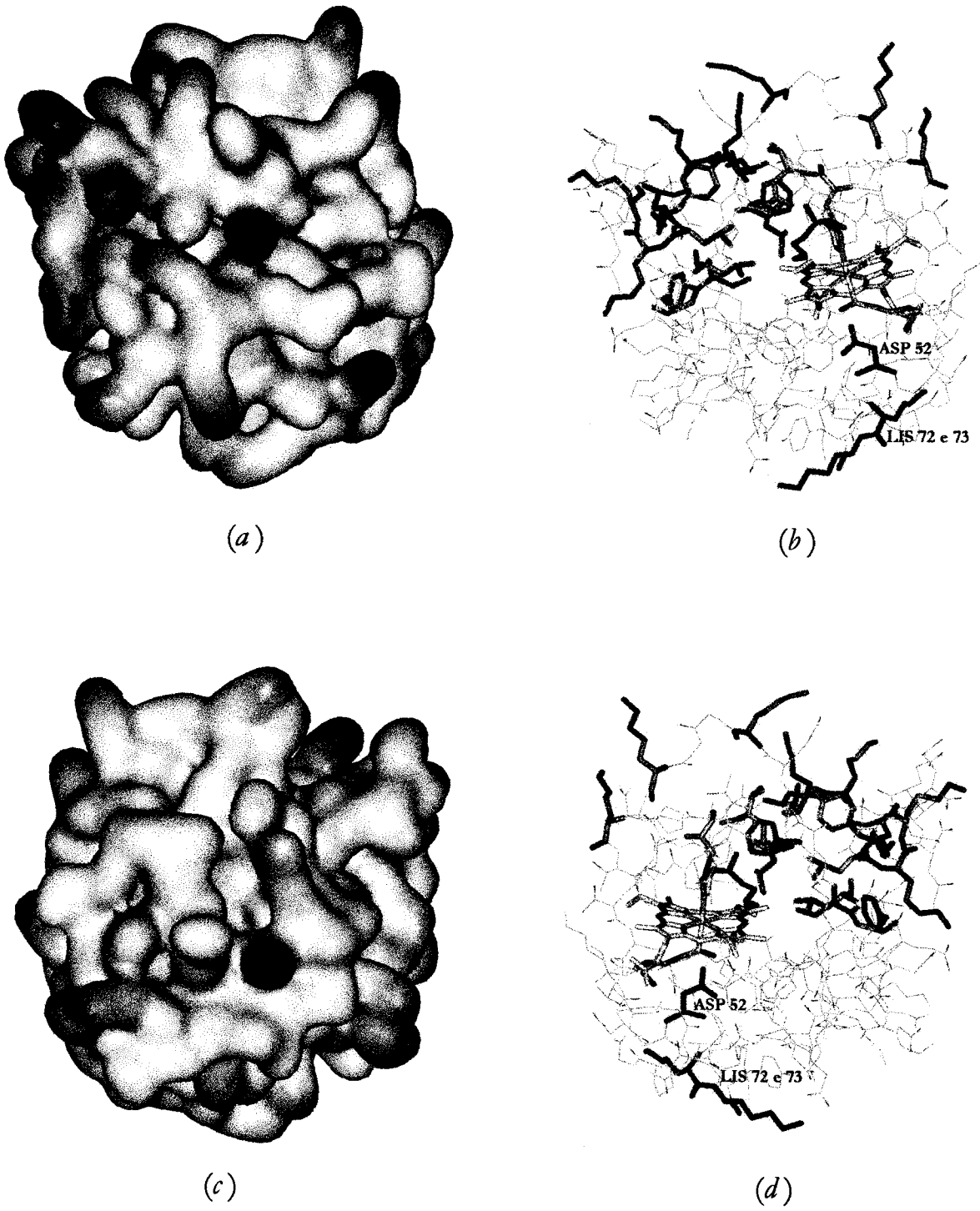


Figura V.4. Representação da molécula citocromo *c*. (a) e (c) ilustram superfícies de potencial eletrostático e (b) e (c) ilustram as cadeia carbônica e os aminoácidos (gerados pelo programa *LabWiew*) (c) e (d) representam a molécula rotacionada de 180° em relação (a) e (b).

Os resultados aqui apresentados mostram que a interação do citocromo *c* com diferentes membranas não é um problema simples como possa parecer à primeira vista, já que existe a dependência da distribuição de cargas das cabeças polares dos lipídios, do tamanho e do estado de saturação das cadeias carbônicas e do estado de valência do ferro da proteína. Mas o que fica realmente claro é que as mudanças conformacionais induzidas pela associação proteína/lipossomo são moduladoras do campo cristalino visto pelo íon de ferro hemínico fazendo variar tanto a simetria local do ferro quanto seu estado de spin. Fica claro também que a interação é tanto eletrostática quanto hidrofóbica. Esses estados de spin induzidos pela associação proteína/lipídio devem ser importantes no processo de transferência de elétrons no trabalho mitocondrial e no mecanismo peroxidático do citocromo *c* no fenômeno de apoptose.

VI. PERSPECTIVAS

VI.1. RPE-Pulsado

Medidas de T_1

Foram realizados experimentos nos quais mediram-se os tempos de relaxação longitudinal (T_1) do ferro hemínico do citocromo *c* em função da temperatura, em três sistemas diferentes. Primeiramente, a medida foi realizada com a proteína em tampão HEPES pH=7,4, em solução congelada. Outros sistemas estudados foram as membrana citocromo *c*/CL e citocromo *c*/ SDS. A Figura VI.1 a seguir ilustra uma curva da relaxação longitudinal (T_1) em função do tempo para uma amostra de citocromo *c* congelado na temperatura de 7 K. Os valores de T_1 foram obtidos com ajuste de uma função exponencial *stretch* da forma $y = A + Be^{\left(\frac{t}{T_1}\right)^n}$, utilizando-se o programa *Origin*. Os valores de *n* estão ilustrados na Tabela VI.1. A Figura VI.2 a seguir ilustra a taxa de relaxação longitudinal ($1/T_1$) em função da temperatura.

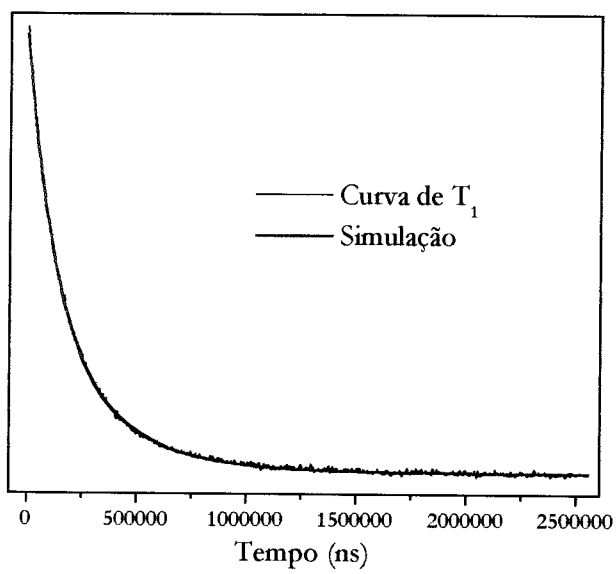


Figura VI.1. Curva de Relaxação Longitudinal (T_1) em s^{-1} *versus* o Tempo (ns).

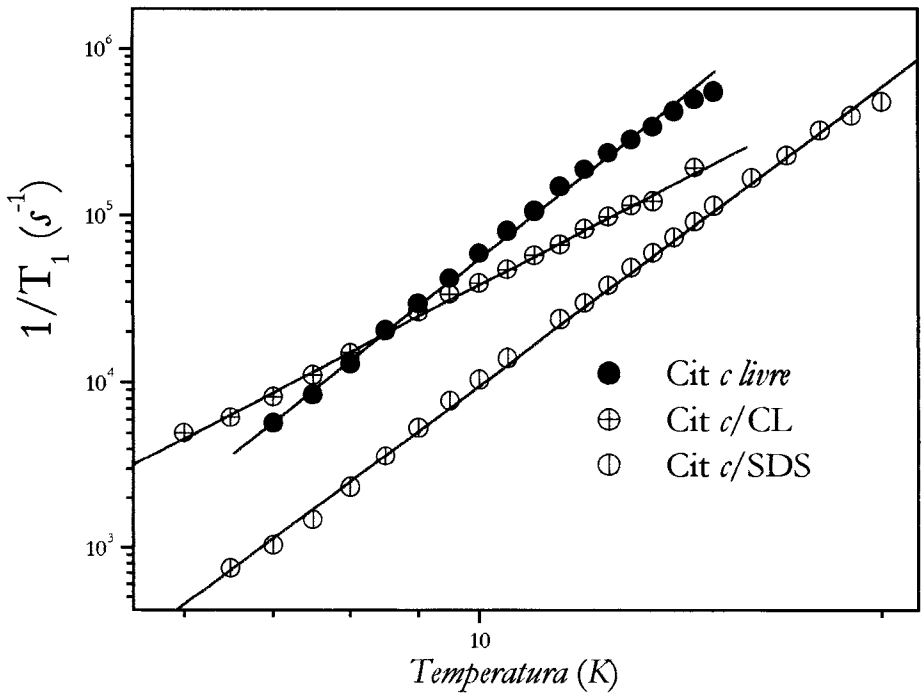


Figura VI.2. Taxa de Relaxação Longitudinal ($1/T_1$) em s^{-1} *versus* a Temperatura (K).

Os valores da Tabela VI.1 mostram que a relação entre a expressão $1/T_1$ e a temperatura varia conforme o sistema estudado. De acordo com o modelo proposto por Stapleton (Stapleton *e col.*, 1982), a taxa de relaxação varia com a temperatura de acordo com uma função de potência do tipo T^{3+2d}, onde *d* é a dimensão fractal. O resultado obtido para o citocromo *c* livre em solução confirma os resultados citados por Stapleton *e col* 1982. Os autores encontraram o valor do expoente n=6,34±0,07. O resultado obtido para o sistema Citocromo *c*/SDS poderia se enquadrar nesse modelo, mas para o sistema Citocromo *c*/CL esse modelo não é mais válido, pois *n* é muito pequeno. Segundo esse modelo *d* deveria variar de 1 a 3.

Tabela VI.1. Parâmetros do ajuste da curva de $1/T_1$.

Sistema	*n*	*d*
Citocromo *c* livre	6,34 (±0,07)	1,45 (±0,03)
SDS	5,96 (±0,05)	1,32 (±0,02)
CL	4,17(±0,04)	0,72 (±0,02)*

* Para d<1 o modelo de Stapleton não é mais válido (Stapleton *e col*, 1982).

Stapleton e colaboradores (Stapleton *e col.*, 1982) relacionaram a taxa de relaxação spin eletrônico Raman em proteínas férricas com um modelo no qual a estrutura da proteína está caracterizada pela dimensão fractal (d) e pela densidade de estados vibracionais $\rho(\omega)$, que varia com a freqüência ω^{d-1}, e a dependência da taxa de relaxação Raman com a temperatura é T^{3+2d}. Embora essa dimensão fractal d seja um simples parâmetro, ele é um bom indicador da conformação da proteína, pois é uma medida quantitativa do grau de como a estrutura preenche o espaço no qual ela reside. Os autores mostram que os valores de d podem ser medidos através da medida de relaxação spin-rede e obter parâmetros idênticos aos resultados obtidos através de raios-X e as mudanças na estrutura da proteína. Por exemplo, os efeitos do solvente sobre a estrutura da proteína podem ser convenientemente monitorados por medidas de relaxação.

No mecanismo de relaxação Ramam, um fônon de alta energia é espalhado inelasticamente por um spin paramagnético causando um *spin flip* e uma correspondente mudança de energia no referido fônon. Esse processo é mais rápido que o processo direto (processo de um fônon) quando a temperatura é alta suficiente para popular os estados dos fônons de maior energia ($\hbar\omega >> g\mu_B H$). O processo de dois fônons é dominante pois todo fônon de alta energia pode fazer parte, enquanto somente aqueles com energia $g\mu_B H$ são possíveis no processo direto. Fisicamente, o processo de relaxação envolve a modulação do campo eletrostático do ligante por vibrações estruturais, o que perturba os estados eletrônicos dos orbitais que são acoplados com o spin via interação spin órbita.

Esse estudo poderá ser estendido para outros sistemas citocromo *c*/lipídio com a finalidade de sistematizar e apresentar um modelo para esse tipo de relaxação e possivelmente analisar a estrutura da proteína a partir do tempo de relaxação medido pela técnica de RPE Pulsado nesses sistemas.

Outros estudos utilizando-se a técnica de RPE Pulsado

Existe outra forma de obter um espectro de absorção pela técnica de RPE além da forma convencional ou CW. Através da técnica de RPE pulsado é possível obter um espectro de absorção medindo-se as intensidades do eco com a variação do campo magnético. Um fato interessante a ser observado com essas medidas é a posse de informações adicionais pelo espectro em comparação ao medido com a técnica CW. A Figura VI.3 a seguir permite a comparação dessas duas medidas de aborção para o citocromo *c* livre.

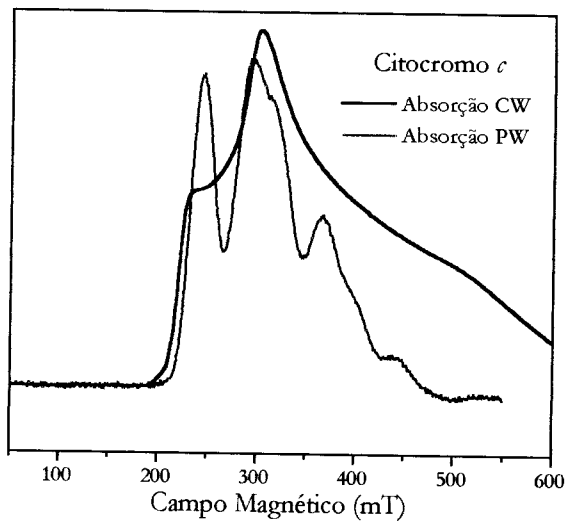


Figura VI.3. Espectro de absorção do citocromo c (T=11K) medido através da técnica de RPE Pulsado (PW) (em vermelho) e através da técnica de RPE Onda Contínua (CW) (em preto).

Outro tipo de medida que pode ser explorado com RPE pulsado nos sistemas citocromo *c*/lipídios e a ESEEM (do inglês *Electron Spin Eco Envelop Modulation*). Nesse tipo de medida, obtêm-se informações sobre os núcleos vizinhos ao centro paramagnético (os quais promovem a modulação). A Figura VI.4 a seguir ilustra um espectro ESEEM do sistema citocromo *c*/SDS. Essa técnica em breve será explorada em nosso laboratório. Experimentos preliminares indicam que através dessa técnica é possível o estudo das associações citocromo *c*/lipossomo.

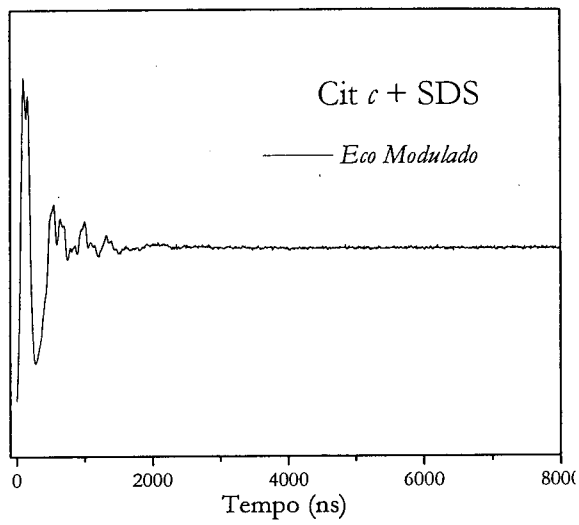


Figura VI.4. Eco Estimulado SDS

Esses tipos de informações obtidas por RPE-PW são muito novos e abrem caminho para muitas investigações aplicáveis também em materiais biológicos.

VI.2. Peroxidação lipídica com t-butil peróxido

Um estudo sobre peroxidação lipídica também foi realizado, utilizando o *tert*-butil peróxido. A Figura VI.5 ilustra alguns espectros de RPE das reações analisadas. Observamos que o radical peroxil não aparece na presença dos lipossomos PCPECL e CL. Já na presença do DCP e na ausência de lipossomos, ocorre o aparecimento do radical peroxil, fato que pode estar relacionado com uma proteção lipídica contra danos protéicos promovidos por radicais. Estudos utilizando vários lipossomos estão sendo realizados como continuidade dos projetos do grupo.

Experimentos preliminares indicam que a presença de lipídios insaturados também retarda a perda da banda Soret promovida por *tert*-butil hidroperóxido, sugerindo que esses lipídios presentes nas membranas podem atuar como trapeadores de radicais produzidos pela atividade peroxidática do citocromo *c* e, portanto, podem desempenhar um papel protetor contra danos, em proteínas, promovidos por radicais.

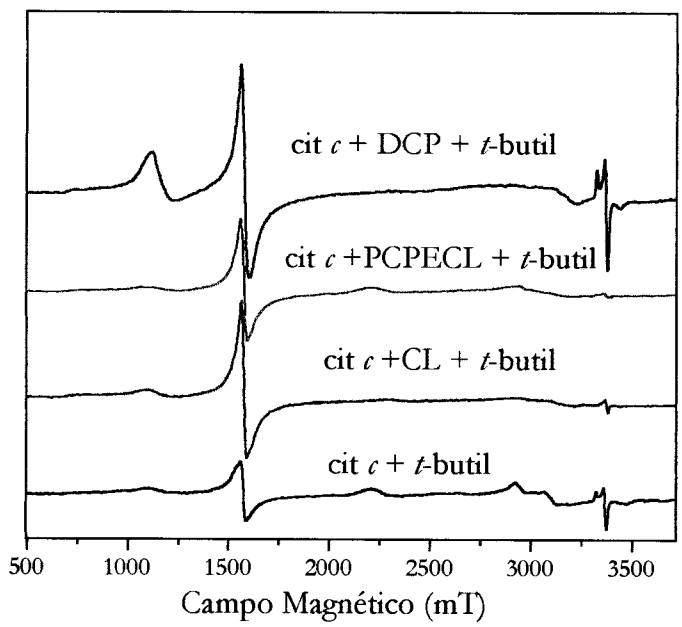


Figura VI.5. Espectro de RPE do citocromo *c* com *tert*-butil peróxido na presença dos lipossomos PCPECL, CL e DCP.

VII. CONCLUSÕES

Os objetivos propostos no início desta tese foram atingidos no que se trata do estudo sistemático da natureza da interação entre o citocromo *c* e as cadeias fosfolipídicas.

Pode-se observar, desses estudos, que o centro ativo da proteína, ou seja, o grupo heme, sofre o efeito tanto das interações eletrostáticas quanto da interação hidrofóbica e depende dos lipídios que formam os lipossomos – se são carregados, têm cabeças polares mais ou menos volumosas e têm cadeias carbônicas compridas com ligações saturadas ou insaturadas.

As técnicas utilizadas estudam diretamente o centro ativo mas permitem também inferir sobre efeitos de cooperatividade dos diferentes lipossomos.

Os resultados aqui apresentados são importantes para o entendimento do papel biológico do citocromo c, já que evidenciam que o campo cristalino visto pelo íon ferro é modulado pelo tipo de interação que ocorre com a superfície das diferentes membranas. Também o aspecto positivo da interação hidrofóbica com a possível inserção da cadeia carbônica próxima ao íon ferro pode promover o papel peroxidático do citocromo *c* no meio citossólico, contribuindo para o processo apoptótico na célula.

Este trabalho também abre um leque de novas idéias e de futuras investigações. Um novo estudo dessa interação deve ser implementado a partir da técnica RPE pulsado, como indicam os resultados já obtidos apresentados.

VIII.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Banci L.; Bertini I.; Gray H. B.; Luchinat C.; Reddig T.; Rosato A., Turano P., (1997) Solution Structure of Oxidized Horse Heart Cytochrome *c* B*iochemistry* **36**, 9867-9877.

Cantor C. R e. Shimmel P. R. *Biophysical Chemistry – Part III – The behavior of biological macromolecules* (W.H. Freemam and Company - 1980).

Brautigan D.L., Feinberg B.A., Hoiffman B.M., Margoliash E.(1977) Multiple Low Spin Forms of the Cytochrome *c* Ferrihemochrome *J. Biol.Chem.* **25**, 574-582.

Brown L.R.; Wüthrich K (1977) NMR and ESR studies of the interaction of cytochrome c with mixed cardiolipin-phosphatidylcholine vesicles. *Biochim Biophys Acta* **468** 389-410.

Bushnell GW, Louie GV, Brayer GD (1990) High-resolution three-dimensional structure of horse heart cytochrome *c J Mol Biol* **214**, 585-595.

Campbell, I.d e Dwek, R.A; *Biological Spectroscopy*, London, The Benjamiin/Cummings, 1984.

Chamulitrat, W., Takahashi, N., and Mason, R.P. (1989) Peroxyl, Alkoxyl, and Carbon-centered radical Formation from Organic Hidroperoxides by Chloroperoxidase *J. Biol. Chem.* **264**, 7889-7899.

Cheesman M.R., Greenwood C., Thomson A. J. (1991) Magnetic Circular Dichroism of Hemoproteins *Adv Inorg Chem*, **36**, 201-255.

Cullis PR, de Kruijff B (1979) Lipid polymorphism and the functional roles of lipids in biological membranes. *Biochim Biophys Acta* **559**, 399-420.

Daum G (1985) Lipids of Mitochondria *Biochim Biophys Acta* **822**, 1-42.

De Jongh HHJ, Killian JA, de Kruijff B (1992) A water-lipid interface induces a highly dynamic folded state in apocytochrome *c* and cytochrome *c*, which may represent a common folding intermediate. *Biochemistry* **31**, 1636-1643.

De Kruijff B.; Cullis P.R. (1980) Cytochrome *c* specifically induces non-bilayer structure in cardiolipin-containing model membranes. *Biochim Biophys Acta* **602**, 477-490

Eaton, W. A.; Hofrichter, J. Polarized Absorption and Linear Dichroism Spectroscopy of Hemoglobin (1981) *Methods Enzimol.* **76**, 175-261.

Feher G. *Eletron Paramagnetic Resonance with Applications to Selected Problems in Biology (Les Houches Lectures, 1969)*; New York, Gordon and Breach, 1970.

Gouterman, M. (1961) Spectra of Porphyrins *J. Mol Spectrosc.* **6**, 138&.

Griffith, J. S. (1957) Theory of Eletron Resonance in Ferrihemoglobin Azide Nature, **180**, 30-31.

Gulik-Krzywicki T., Shecheter E., Luzzati V., Faure M (1969) Interaction of protein and lipids: Structure and polymorphism of protein-lipid water phases. *Nature* **223**, 116-1121.

Heimburg T; Marsh D. (1993) Investigation of secondary and tertiary structural changes of cytochrome *c* in complexes with anionic lipids using amide hydrogen exchange measurements: a FTIR study. *Biophys J* **65**, 2408-2417.

Heimburg T., Hildebrandt P., Marsh D. (1991) Cytochrome *c*-lipid interaction studied by resonance Raman and ^{31}P spectroscopy. Correlation between the conformational changes of the protein and the lipid bilayer. *Biochemistry* **30**, 9084-9089.

Henning B, Neupert W (1981) Assembly of cytochrome *c*. Apocytochrome *c* is bound to specific sites on mitochondria before it is converted to holocytochorme *c*. *Eur J Biochem* **121**, 203-212.

Herrick R.C.; Slapeton H. J. (1976) Anomalous T^7 Raman spin-lattice relaxation rate of spin cytochrome p-450 from *Pseudomonas putida** *J. Chem Phys* **65**, 4778-4785.

Hildebrandt P.; Stockburger M. (1986) Surface-enhanced resonanceRaman spectroscopy of cytochrome *c* at room and low temperatures. *J Phys Chem* **90**, 6017-6024

Hildebrandt P.; Stockburger M. (1989a) Cytochrome *c* at charged inerfaces. 1. Conformational and redox equilibrium at the eletrode/electrolyte interface probed by surface-enhanced resonance Raman spectroscopy. *Biochemistry* **28**, 6710-6721

Hildebrandt P. and Stockburger M. (1989b) Cytochrome *c* at charged interaces. 2. Complexes with negatively charged macromolecular systems stuidied by resonance Raman spectroscopy. *Biochemistry* **28**, 6722-6728.

Hollebone B.B. (1993) MCD Spectroscopy in analysis *Spectrochimica Acta Rev.* **15**, 493-526.

Jordi W.; de Kruijff B (1995) Apo- and holocytochrome c-membrane interacitons, in Cytochrome *c: a Multidisciplinary Approach* (Scott, RA., and Mauk AG eds.) University Science Books, Sausalito, California pp. 449-474.

Jordi W. Li-Xin Z, Pilon M, Denel RA, de Kruijff B (1989) The importance of the amino terminus of the mitochondrial precursor protein apocytochrome c for translocation across model membranes. *J Bio Chem* **264**, 2292-2301.

Jori G., Tamburro A. M.; Azzi A. (1974) Photooxidative and spectral studies on cytochrome c. Conformational changes induced by binding of cardiolipin. *Photochemistry and Photobiology* **19**, 337-345.

Kilmelberg H. K.; Papahadjopoulos D. (1971) Interactions of basic proteins with phospholipid membranes. Binding and changes in the sodium permeability of phosphatidylserine vesicles. *J Biol Chem* **245**, 1142-1148.

Kotani, M - *The Structure and Properties of biomolecules and Biological Systems* -(Duschene, J., ed.), p.p. 159-181, Interscience, London, 1964.

MacNaughtan W., Snook KA, Caspi E, Franks NP (1985) An X-ray diffraction analysis of orientated lipid multilayer containing basic proteins. *Biochim Bhiophys Acta* **818**, 132-148.

Morse PD, Deamer DW (1973) Interaction of cytochrome c with lipid monolayers. *Biochim Biophys Acta* **298**, 769-782.

Muga A, Mantsch HH, Surewicz WK (1991) Membrane binding induces destabilisation of cytochrome c structure. *Biochemistry* **30**, 7219-7224.

Mustonem P. Virtanen JA, Somerharju PJ, Kinnunen PDJ (1987) Binding of cytochrome *c* to liposomes as revealed by the quenching of fluorescence form pyrene-labeled phospholipids. *Biochemistry* **26**, 2991-2997.

Nantes, I. L., Faljoni-Alario, Vercesi, A. E. , K. E.; Bechara, E. J. H. (1998). Liposome effect on the cytochrome *c*-catalyzed peroxidation of carbonyl substrates to triplet species. *Free Radical Biol. Med.* **25,** 546-553.

Nantes, I. L., Faljoni-Alário, A., Nascimento, O. R., Bandy, B., Gatti R. and Bechara E. J. H.. (2000). Modifications in heme iron of free and vesicle bound cytochrome *c* by *tert*-butyl hydroperoxide. A magnetic circular dichroism and electron paramagnetic resonance investigation. *Free Radic. Biol. & Med.* **28**, 786-796.

Nantes, I. L.; Zucchi M. R.; Nascimento O. R. and Faljoni-Alário *A.* (2001) Effect of Heme Iron Valence State on the Conformation of Cytochrome c and Its Association with Membrane Interfaces *J Biol Chem*, **276**, 153-158.

Nicholls, P. (1974) Cytochrome c Binding to Enzymes and Membranes *Biochem. Biophys. Acta* **346**, 261-310.

Pake, G. E.; Estle T. L. *The physical principles of electron paramagnetic resonance* (2d ed) Reading, Mass., W. A. Benjamin, Advanced Book Program, 1973.

Papahadjopoulos D., Moscarello M., Eylar E. H., Isac T (1975) Effects of proteins on the thermodynamic phase transitions of phospholipid membranes. *Biochim Biophys Acta* **401**, 317-335.

Pfanner N. Hartl FU, Neupert W (1987) Import of proteins into mitochondria: a multi-step process. *Eur J Biochem* **175**, 205-212.

Pinheiro, T.J.T. (1994) The interaction of horse heart cytochrome with phospholipid bilayers. Structural and dynamic effects. *Biochimie* **76**, 489-500.

Pinheiro, T.J.T., Watts A. (1994a) Lipid specificity in the interaction of cytochrome c with anionic phospholipid bilayers revealed by solid-state ^{31}P NMR measurements. *Biochemistry* **33**, 2451-2458.

Pinheiro, T.J.T., Watts A. (1994b) Resolution of individual lipids in mixed phospholipid membranes and specific lipid-cytochrome *c* interactions by magic angle spinning solid-state phosphorus-31 NMR *Biochemistry* **33**, 2458-2467.

Poole, C. P. - *Electron Spin Resonance* - John Wiley & Sons., Inc., USA, 1983.

Rietveld A, Sijens P, Verkleij AJ, de Druijff B (1983) Interaction of cytochrome *c* and its precursor apocytochorme *c* with various phospholipids *EMBO J* **2**, 907-913.

Riske K.A., Politi M.J., Reed W.F., LamyFreund M.T. (1997) Temperature and ionic strength dependent light scattering of DMPG dispersions *CHEMISTRY AND PHYSICS OF LIPIDS* **89**, 31-44.

Rojo, T.; Lezana, L. and Barandiarán – *Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletronica* – Universidad del Pais Vasco, 1993.

Rytömaa, M.; Kinnunen, P. K. (1995). Reversibility of the binding of cytochrome c to liposomes *J. Biol. Chem.* **270**, 3197-3202.

Salamon Z.; Tollin G. (1991a) Reduction of Cytochrome *c* at a Lipid Bilayer Modified Electrode *Biolectroch Bioener* **25**, 447-454.

Salamon Z.; Tollin G. (1991b) Interfacial Eletrochemistry of Cytochrome *c* at a Lipid Bilayer Modified Electrode – Effect of Incorporation of Negative Charges Into the Bilayer on Cyclic Voltammetric Parameters *Biolectroch Bioener* **26**, 321-334.

Shipley G.G.; Leslie R.B.; Chapman D., (1969) X-ray diffraction of the interaction of phospholipids with cytochrome c in aqueous phase. *Nature* **222**, 561-562.

Spooner P.J.R.; Watts A. (1991a) Reversible unfolding of cytochrome *c* upon interaction with cardiolipin bilayers. I.Evidence from deuterium NMR measurements. *Biochemistry* **30**, 3871-3879.

Spooner P.J.R..; Watts A. (1991b) Reversible unfolding of cytochrome *c* upon interaction with cardiolipin bilayers. 2. Evidence from 31P NMR measurements. *Biochemistry* **30**, 3880-3885.

Stampleton HJ; Flynn CP; Stinson DG; Colvin JT and Allen JP Protein Conformation from Electron Spin Relaxation Data *Biophys. J.* (1971)

Sutherland J. C.; Klein M. P. (1972) Magnetic Circular Dichroism of Cytchrome *c*. J.*Chem Phys* **57**(1), 76-86.

Sutin N.; Yandell J.K. (1972) Mechanisms of the Reactions of Cytochrome *c* *J. Biol. Chem.* **247**, 6932-6936.

Szebeni J, Tolin G (1988) Ineraction of cytochrome c with liposomes:: covalent labeling of externally bound protein by the fluorescent probe, azidonaphthalenedisulfonic acid, enclosed in the inner aqueous compartement of unilamellar vesicles. *Biochim biophys Acta* **932**, 153-159.

Takano, T; Kallai, O.B.; Swanson, R.; Dickerson R.E. The Structure of Ferrocytochrome c at 2.45 Å Resolution *J. Biol. Chem.* , **248**, 5234-5255 (1973)

Taylor C.P.S. (1977) Relation of The t2g, Hole Model to the Directional Properties of the g Tensor, and a New Method for Calculating the Ligand Field Parameters *Biochem Biophys Acta*, **491**, 137-149.

Tessie J (1981) Interaction of cytochrome c with phospholipid monolayers. Orientation and penetration of protein as function of the packing density of film, nature of the phospholipid, and ionic content of the aqueous phase. *Biochemistry* **20**, 1554-1560.

Van S.P.; Griffith O.H. (1975) Bilayer struture in phospholipid-cytochrome *c* model membranes. *J Membrane Biol* **20**-155-170.

Van Holde, K..E. - PHYSICAL BIOCHEMISTRY - New Jersey, EUA, Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs (1971).

Vicent J.S.; Levin I.W. (1986) Interaction of ferricytochrome c with cardiolipin multilayers: a resonance Raman study. *J. American Chemical Society* **108**, 3551-3554

Vicent JS, Kon H, Levin IW (1987) Low-temperature electron paramagnetic resonance study of the ferricytochrome *c*-cardiolipin complex. *Biochemistry* **26**, 2312-2314.

Weissbluth, M. (1974) Hemoglobin, p. 99, Springer-Verlag, New York.

Wickman, H.H; Klein, M.P., Shirley, D.A. (1965) Paramagnetic Resonance of Fe^{3+} in Polycrystalline Ferrichrome A* *J. Chem. Phys.* **42** (6), 2113-2117.

Wuthrich, K., Aviram, I., Schejter, A. (1971) Structural Studies of Modified Cytochromes *c* by Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy *Biochim. Biophys. Acta* **253**, 98-103.

Yang, J.; Liu, X. S., Bhalla, K., Kim, C. N.; Ibrado, A. M.; Cai, J.; Peng, T.; Jones, D. P.; Wang, X. (1997) Prevention of apoptosis by Bcl-2; Release of cytochrome *c* from mitochondrial blocked *Science* **275**, 1129-1132.