

UTILIZAÇÃO DE VESÍCULAS DE DODAB PARA INTERNALIZAÇÃO DE CITOCROMO *c* PARA AMBIENTE CITOSÓLICO: PADRONIZANDO A TÉCNICA

Victória Cristina Xavier de Moraes¹; Katia Cristina Ugolini Mugnolo²

1. Estudante do curso de Biomedicina; e-mail: victoria.xavier.morais@gmail.com
2. Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: katiac@umc.br

Área do Conhecimento: **Bioquímica**

Palavras chaves: Citocromo *c*; lipossomos; apoptose; DODAB.

INTRODUÇÃO

O citocromo *c* é uma heme proteína cujos mecanismos lhe conferiram propriedades que a envolvem em processos de morte celular, especificamente na apoptose (MUGNOL, 2004). Esta relação do citocromo *c* com o desencadeamento da ativação da cadeia de caspases quando de sua liberação da membrana mitocondrial para o citosol, tem sido alvo de estudos que levam em conta a interação desta macromolécula com a membrana deste organela e a influência dos aminoácidos de sua estrutura primária neste processo (KAWAI, 2009). Busca-se elucidar em mais detalhes os mecanismos que levam o citocromo *c* a iniciar o processo apoptótico e uma das formas pode-se dar a partir produção de formas mutantes desta proteína, com substituições pontuais em alguns resíduos de aminoácidos, seguido da avaliação de sua capacidade de ativar caspases. Parte deste processo requer também buscar as melhores metodologias para internalização destas formas mutantes de *c* no citosol das células analisadas, já que a proteína, se exógena, não ativa a morte celular.

Técnicas como a microinjeção, já testada anteriormente para este processo de introdução pela Profa Dra Katia Mugnolo, foram efetivos para a internalização de citocromo *c* e estudos preliminares da influência de determinados resíduos de aminoácidos de sua estrutura na efetividade do desencadeamento do processo apoptótico, porém, devido à sua limitação no que concerne o tipo e quantidade de células passíveis de serem submetidas à técnica, bem como à necessidade de disponibilidade de equipamentos de alto custo, justifica-se a busca por outras técnicas. Uma delas envolve o uso de lipossomos, potenciais carreadores desta proteína do ambiente extra para o intracelular. Dentre os lipossomos disponíveis, pensamos utilizar o tensoativo catiônico DODAB - brometo de dioctadecildodecil amônio – já utilizado na indústria farmacêutica, principalmente, como carreador de drogas. Estes lipossomos são estruturas fechadas semelhantes a conchas esféricas de membrana com bicamada cujo core é aquoso. Podem assumir diferentes estruturas de acordo com sua forma de preparação, a qual interfere no tamanho, número de carga, cadeias, lamelas e grau de saturação. Estas vesículas atuam através de mecanismos de transporte passivo, agregando-se à membrana celular para depois internalizar seu conteúdo, ou ativo, quando endocitadas pelas células e sendo então rompidas no citosol (PRIETO, 2009). Devido à necessidade de se padronizar meios de baixo custo e fácil aplicação desta técnica, este projeto pretende testar condições em que os lipossomos de DODAB sejam capazes de internalizar formas nativas e mutantes de citocromo *c* no meio intracelular para que seja possível aplicar esta técnica em estudos de indução de morte celular.

OBJETIVO

Determinar os parâmetros ideais para a internalização de citocromo *c* ao ambiente citosólico utilizando lipossomos de DODAB.

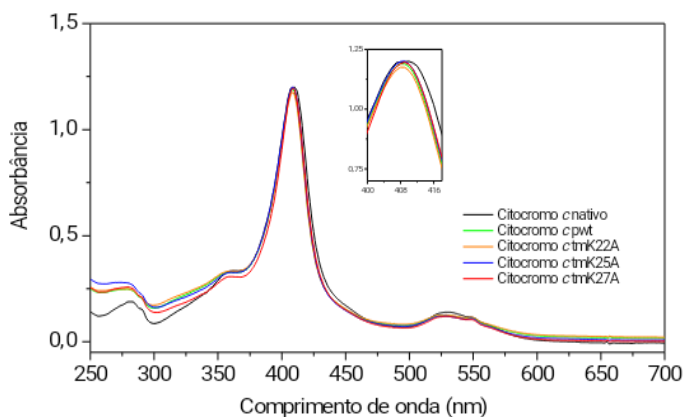
METODOLOGIA

Foram obtidas formas mutantes de citocromo *c* a partir de mutação sítio-dirigida realizada sobre plasmídeo PJRhrsN2 desenhado por Rumbley, Hoand e Englander (RUMBLEY, 2002). A forma original do plasmídeo já possui mutações nas histidinas 26 e 33 e sua expressão direta resulta no citocromo *c* H26N/H33N, pseudo-wild-type (pwt). Mutações pontuais foram inseridas para substituição de diferentes resíduos de aminoácidos, obtendo-se as formas tmK22A, tmK25 e tmK27A (respectivamente H22A/H26N/H33N, H25A/H26N/H33N e H26N/H27A/H33N). A expressão dos plasmídeos pwt e dos três mutantes foi realizada por transformação em *Escherichia coli* BL21 Star e pré-cultivo posterior em LB Ágar contendo ampicilina. A purificação consiste de sonicação, centrifugação, precipitação de proteínas, diálises em membrana de 3,5 kDa, cromatografia de troca iônica, dessalinização e liofilização. Para o teste da influência do DODAB, nesta primeira parte do projeto, foram utilizadas células de músculo liso de aorta de coelho (MLAC) em meio de cultura DMEN (Dulbecco's Modified Eagle Medium), incubadas em estufa a 37°C e atmosfera com 5% de CO₂, seguindo o protocolo estabelecido pelo Centro Interdisciplinar de Investigação Bioquímica (CIIB). Foi montada uma placa de Elisa com densidade de 1 x10⁴ células por poço (100µL por poço), mantida em estufa por 48 horas e depois a ela adicionadas as vesículas de DODAB. Os lipossomos foram preparados à 500 µM utilizando o protocolo disponível no CIIB, diluindo-se 16 mg de DODAB em 50 mL de água deionizada. A suspensão obtida foi mantida em banho maria sob temperatura controlada de 55 a 60°C, sob agitação vigorosa durante 10 minutos e depois resfriada à temperatura ambiente mantendo-se agitação em vórtex durante 5 minutos. O processo foi repetido 3 vezes. Foram preparadas suspensões em tampão fosfato salino (PBS) e também em água deionizada, visando determinar o menor solvente. Em trabalhos anteriores, constatou-se ue por esta técnica de preparação são obtidos lipossomos de DODAB com certa de 400 nm de diâmetro. Diferentes volumes das duas soluções foram acrescentados às células nos poços da placa de Elisa visando verificar a menor concentração não-citotóxica do DODAB em cada um dos solventes, sempre em triplicata. A determinação da viabilidade celular foi feita pelo método de MTT (3-[4,5dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) (SITTAMPALAM, COUSSENS e NELSON, 2004), que permitiu verificar o percentual de células viáveis, medindo-se espectrofotometricamente a absorbância do meio e avaliando os efeitos citotóxicos do DODAB em comparação com controle-negativo, só células. Foram testadas as células (a) que receberam solução de diferentes concentrações DODAB preparado em água e em PBS frente células-controle de processo (células que não receberam DODAB).

RESULTADO E DISCUSSÃO

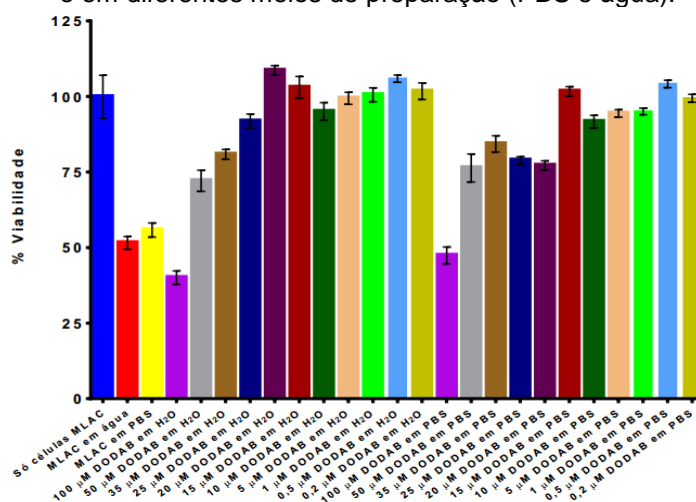
Foram expressas e purificadas quatro das cinco formas mutantes de citocromo *c* (pwt, tmK22A, tmK25 e tmK27A). Os resultados dos espectros UV-Vis estão apresentados na figura 1. A forma mutante tmK79A ainda está em fase de expressão e purificação. Há discreta variação no λ máximo da banda Soret e deslocamentos também na região de 350 nm. Estas diferenças estão possivelmente relacionadas com diferenças na estrutura das formas modificadas, uma vez que os resíduos de lisina substituídos estão diretamente envolvidos no processo de enovelamento do citocromo *c*.

Figura 1 - Espectro UV-Vis das formas nativa e mutantes 50 μM em tampão fosfato de sódio 5 mM pH 7,4. Citocromo c nativo (linha preta), pwt (linha verde), tmK22A (linha laranja), tmK25A (linha azul) e tmK27A (linha vermelha). No inserto detalhe da região da Soret. Utilizada cubeta de cristal de quartzo de $l = 1$ cm.



Estas formas mutantes serão testadas na segunda fase do projeto, prevista para a edição 2018-2019, quando padronizadas as melhores concentrações de DODAB que promovem o mínimo efeito citotóxico sobre as células (que é o objetivo desta primeira fase do projeto, realizada no período 2017-2018). Para a determinação dessas melhores concentrações, diferentes concentrações dos lipossomos de DODAB foram adicionados às células MLAC plaqueadas. Após 24 horas de incubação com as vesículas foi realizado o teste MTT para quantificação da viabilidade celular em cada concentração de lipossomo testada. Os resultados obtidos estão apresentados na figura 2.

Figura 2 – Viabilidade celular no contato de células MLAC com diferentes concentrações de DODAB e em diferentes meios de preparação (PBS e água).



Os resultados apresentados no teste de MTT mostram que as maiores concentrações de DODAB levaram a morte celular, enquanto que os menores volumes adicionados mantiveram a viabilidade das células. Tanto a estrutura quanto a organização celular foram mantidas nas concentrações de DODAB inferiores a 15 μM , sendo estas as que serão testadas na segunda fase do projeto, às quais serão incorporadas forma nativa e modificadas de citocromo c (pw, tmK22A, tmK25A, tmK27A e tmK79A).

CONCLUSÃO

Até o momento é possível inferir que em concentrações inferiores a 15 μM os lipossomos de DODAB não tiveram efeito citotóxico, tanto quando a solução foi preparada em tampão PBS quanto em água. Abaixo desta concentração acreditamos que, quando da incorporação de citocromo *c* nativo e formas mutantes na segunda parte deste projeto, possamos internalizar esta proteína e observar os seus efeitos sem que haja influência inespecífica de morte celular por parte dos próprios lipossomos.

REFERÊNCIAS

Kawai, C., Pessoto, F.S., Rodrigues, T., Mugnol, K.C.U., Tortora, V., Castro, L., Milicchio, V.A., Tersariol, I.L.S., Di Mascio, P., Radi, R., Carmona-Ribeiro, A.M. and Nantes, I.L. pH-Sensitive binding of cytochrome *c* to the inner mitochondrial membrane. Implications for the participation of the protein in cell respiration and apoptosis. *Biochemistry*, 48: 8335–8342, 2009.

MUGNOL, K.C.U. Caracterização espectroscópica de citocromo *c* baixo spin com baixo grau de rombicidade através de uso de micelas reversas de AOT/HEXANO e micelas aquosas de SDS. 2004. 108 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade de Mogi das Cruzes, Mogi das Cruzes, 2004.

Prieto, T. Hemoproteínas e hemopeptídeos como agentes de indutores de morte celular: estudo comparativo de entrega por lipossomos de DODAB e microinjeção. Universidade de Mogi das Cruzes. Mogi das Cruzes, p. 150 f. 2009.

Rumbley, J.N., Hoang, L., Englander, S.W. Recombinant equine cytochrome *c* in *Escherichia coli*: high-level expression, characterization and folding and assembly mutants. *Biochemistry*, v.41, n.47, pp.13894-13901, 2002.

Sittampalam, G.S. ; Coussens, N.P.; NELSON, H; . Guidance Manual. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/#_mttassays_Introduction. Consulta em 20/02/2017.

Vieira, D.B.; Carmona-Ribeiro, A.M. Cationic Nanoparticles for delivery of amphotericin B: preparation, characterization and activity in vitro. *Journal of Nanobiotechnology*, v.6 (6), 2008.