



República Federativa do Brasil
Ministério da Indústria, Comércio Exterior
e Serviços
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0300660-3 B1

(22) Data do Depósito: 28/02/2003

(45) Data de Concessão: 21/02/2017



(54) Título: MÉTODO PARA QUANTIFICAR LIBERAÇÃO MITOCONDRIAL DE CITOCROMO C E KIT PARA DETECTAR LIBERAÇÃO MITOCONDRIAL DE CITOCROMO C

(51) Int.Cl.: G01N 33/533; G01N 33/535; G01N 33/92

(73) Titular(es): UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS - UNICAMP. FAPESP - FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO

(72) Inventor(es): ROGER F. CASTILHO; RICARDO G. COSSO; CLAUDIA BARBOSA LADEIRA CAMPOS; ANÍBAL E. VERCESI; HAGAI ROTTENBERG

**"METODO PARA QUANTIFICAR LIBERACAO MITOCONDRIAL
DE CITOCROMO c e KIT PARA DETECTAR LIBERACAO MITOCONDRIAL
DE CITOCROMO c"**

5

A presente invenção se refere a um método para quantificar a liberação mitocondrial de citocromo c durante a morte celular comportando permeabilização seletiva da membrana plasmática e imunodeteção de citocromo c.

10

O citocromo c apoproteico é um componente da cadeia respiratória mitocondrial localizado na face externa da membrana mitocondrial interna, que é liberado da mitocôndria para o citosol depois do desencadeamento do processo de apoptose em diferentes tipos de células como resposta a uma diversidade de agressões sofridas pelas mesmas. Uma vez liberado o citocromo c, conjuntamente com fatores citosólicos, ativa uma cascata de proteases, denominadas caspases, que promovem a morte da célula. Na medida que a liberação mitocondrial do citocromo c constitui-

15

20

25

se em uma etapa crítica no processo de apoptose, sua quantificação pode ser utilizada para caracterizar este tipo de morte celular.

Os métodos conhecidos para medir a liberação do citocromo c compreendem "Western blot" e microscopia de fluorescência.

30

A técnica de "Western blot" requer o fracionamento e separação da mitocôndria da célula homogeneizada. Depois deste estágio as frações seguem intenso e longo processo, incluindo eletroforese das proteínas através de um gel e deste para uma membrana, incubação da membrana com anticorpos primários e secundários para detectar as proteínas. Finalmente o citocromo c é revelado e quantificado para exibir o

grau de morte da célula. Tal procedimento usualmente demanda pelo menos dois dias. Além disso, durante a homogeneização das células, a mitocôndria pode romper e a técnica de "Western blot" poderia induzir a uma superestimação da liberação do citocromo c.

5 A microscopia de fluorescência é mais rápida e mais fácil do que a técnica citada, mas a análise das células apoptóticas no microscópio pode também ser longa e, mais importante, a amostragem é sempre a principal preocupação quando se usa esta técnica.

10 O método descrito segundo a presente invenção diminui drasticamente o tempo despendido para a determinação da liberação mitocondrial do citocromo c, de pelo menos dois dias para um dia, enquanto aumenta a precisão da medida desta proteína e o número de células analisadas durante a apoptose. O resultado é
15 que se consegue efetuar a análise usando qualquer metodologia de fluorescência, quimioluminescência ou colorimetria.

 O método é baseado nas diferenças entre os lipídeos que constituem a membrana plasmática e a membrana mitocondrial. O quociente colesterol/fosfolipídeo é muito elevado
20 na membrana plasmática, enquanto as membranas mitocondriais interna e externa possuem baixo quociente por serem muito pobres ou até virtualmente livres de colesterol.

 Usando baixas concentrações de detergentes específicos de colesterol, tais como digitonina, é possível
25 seletivamente romper a membrana plasmática sem afetar as membranas das organelas intracelulares, como as membranas mitocondriais. A digitonina forma complexos insolúveis com o colesterol, que conduzem à segregação deste e à formação de orifícios de 40-50 Å de largura na camada lipídica. A partir do momento em que a

membrana plasmática é permeabilizada, é possível remover qualquer componente citosólico capaz de passar através dos orifícios formados pela ação da digitonina, incluindo o citocromo c liberado da mitocôndria das células apoptóticas. Qualquer composto descrito
5 ou ainda a descrever que seletivamente permeabilizaria a membrana plasmática baseado no quociente colesterol/fosfolípideo está incluído nesta invenção para detectar a liberação do citocromo c.

O método da presente invenção compreende a permeabilização seletiva da membrana plasmática com baixas
10 concentrações de detergente específico ao colesterol, como digitonina, previamente a uma série de lavagens e à fixação das células. Estas etapas asseguram que o citocromo c liberado seja removido da célula, enquanto a fixação impede a perda desta proteína não liberada durante as etapas seguintes. As células são
15 posteriormente permeabilizadas com um detergente geral, como Triton X-100, Tween 20, Dodecil Sulfato de Sódio ou qualquer outro detergente conhecido ou ainda não conhecido, com a finalidade de permitir a entrada na célula de anticorpos contra citocromo c conjugado com um marcador, como marcador fluorescente, enzima, ou
20 qualquer outro sistema usado para revelação.

O imunocomplexo pode também ser revelado indiretamente usando um anticorpo secundário conjugado com um marcador desejável para fluorescência, quimioluminescência ou detecção de cores. Células não-apoptóticas são positivas para
25 citocromo c uma vez que os citocromos c estão retidos dentro da mitocôndria. Neste caso, a análise por citometria de fluxo, detectaria uma população de células com alta fluorescência. Entretanto, nas células apoptóticas, o citocromo c liberado ao citoplasma será na seqüência liberado das células para o meio de

lavagem durante o tratamento com digitonina, tornando as células negativas para citocromo c. A fluorescência da população de células apoptóticas detectada pela citometria de fluxo, neste caso, seria em torno da fluorescência de fundo.

5 A presente invenção comporta um método para quantificar a liberação mitocondrial de citocromo c durante a morte celular compreendendo as etapas de:

a) permeabilização seletiva da membrana plasmática;

10 b) imunodeteccção de citocromo c.

Vantajosamente no citado método a etapa de permeabilização seletiva da membrana plasmática é seguida pela imunodeteccção do citocromo c e análise por técnicas de fluorescência, quimioluminescência e colorimetria.

15 A invenção comporta composição para detectar liberação mitocondrial de citocromo c compreendendo anticorpo primário contra citocromo c, anticorpo secundário conjugado a fluorocromo, digitonina e tampões.

A invenção comporta, ainda, kit para detectar a
20 liberação mitocondrial de citocromo c compreendendo anticorpo primário contra citocromo c, anticorpo secundário conjugado a fluorocromo, digitonina e tampões.

A invenção comporta, também, o uso de composição
25 para quantificar a liberação mitocondrial de citocromo c durante a morte celular compreendendo anticorpo primário contra citocromo c, anticorpo secundário conjugado a fluorocromo, digitonina e tampões.

A seguir apresenta-se a título meramente ilustrativo não limitativo exemplo de método segundo a presente invenção.

Células leucêmicas HL60 tratadas com Staurosporina, inibidor da proteína quinase C, foram usadas como modelo para indução de apoptose. Tais células sofrem apoptose, quantificada pela externalização de fosfatidilserina via anexina V-FITC, quando mantidas em meio de cultura por 18 horas. Nenhuma apoptose é observada durante as primeiras 6 horas de exposição à droga muito embora sinais apoptóticos já tenham sido desencadeados no interior das células. As figuras de 1 até 9 mostram os histogramas de fluorescência de células marcadas com anticorpo contra citocromo c analisado por citometria de fluxo. O histograma 10
exibe o decréscimo tempo-dependente da fluorescência das células de HL-60 expostas à Staurosporina como consequência da liberação 15
do citocromo c. As células tratadas com Staurosporina por 1 a 6 horas e permeabilizadas com digitonina apresentaram progressivamente menores níveis de fluorescência até próximo da fluorescência de fundo, como mostrado pela média da fluorescência 20
(FM), dentro de cada histograma (Figuras 4 a 9), indicando que depois de 6 horas todo o citocromo c foi liberado da mitocôndria. Controle experimental mostrou células não tratadas permeabilizadas ou não com digitonina (Figura 4 e Figura 3, respectivamente), que 25
exibe níveis similares de alta fluorescência, indicando que baixas concentrações de digitonina usada não liberam uma quantidade significativa de citocromo c da mitocôndria. Por outro lado, células não marcadas (Figura 1) ou células marcadas somente com anticorpos secundários (Figura 2) apresentaram fluorescência a níveis de fundo.

Nos ensaios efetuados células HL60 foram incubadas, ou não, com Staurosporina 1 μ M por 6 horas em meio de RPMI suplementado com FBS 10%, L-glutamina 2mM, em atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C. A cada hora 10⁶ células foram coletadas e lavadas
5 duas vezes com solução de salina tamponada em fosfato (PBS) e centrifugado a 1000 g durante 5 minutos. As células foram novamente suspensas em 100ul de solução de PBS suplementada com mistura de inibidores de protease a 1% e PMSF 1mM. As células foram permeabilizadas por 30 segundos sobre vigorosa agitação com
10 0,005% de digitonina. Com PBS levou-se o volume a 10 ml, centrifugando-se a 5000 g por 5 minutos, sendo os "pellets" fixados com solução de paraformaldeído 2% durante 20 minutos. Depois de duas lavagens em PBS, em idênticas condições, as células foram lavadas em meio de marcação contendo PBS, 2% soro fetal
15 bovino, 0,5% Triton X-100, 0,2% de azida sódica e centrifugado a 5000 g por 10 minutos. Os "pellets" foram novamente suspensos no meio contendo 1 μ g/ml de anticorpo contra citocromo c (Promega) e incubado por 1 hora a 4°C. O volume foi levado a 10 ml com o meio de marcação e centrifugado a 5000 rpm por 10 minutos. As células
20 foram incubadas com anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado Alexa488 (Molecular Probes), por 1 hora a 4°C, lavadas nas mesmas condições e analisadas por citometria de fluxo. Os histogramas das figuras 1 a 4, correspondem ao grupo controle: A figura 1 apresenta os resultados da fluorescência de fundo de
25 células HL-60 não tratadas. A figura 2 a fluorescência de fundo para os anticorpos secundários (2° Ab) de células não tratadas. A figura 3, a fluorescência máxima de células não tratadas impermeabilizadas e incubadas com anticorpo primário (1° Ab) e anticorpo secundário. A figura 4 exhibe a fluorescência máxima de

células não tratadas após a permeabilização das células com digitonina e incubação com ambos anticorpos. As figuras 5 a 9 mostram o decaimento da fluorescência de células HL60 tratadas com Staurosporina incubadas com ambos anticorpos. A fluorescência média significa o valor médio da fluorescência na região de fluorescência mais elevada.

REIVINDICAÇÕES

1. "Método para quantificar a liberação mitocondrial de citocromo c durante a morte celular" caracterizado pelo fato de compreender as etapas de:

5

a) Permeabilização seletiva da membrana plasmática sem afetar as membranas das organelas intracelulares pelo emprego de um detergente específico de colesterol;

10

b) Lavagens e fixação das células;

c) Incubação das células com um anticorpo contra citocromo c conjugado com marcador ou, alternativamente, com um anticorpo contra citocromo c e com um anticorposecundário conjugado com marcador; e

15

d) Imunodeteção de citocromo c por citometria de fluxo.

2) "Método", de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a etapa de imunodeteção do citocromo c poder ser revelada por fluorescência.

20

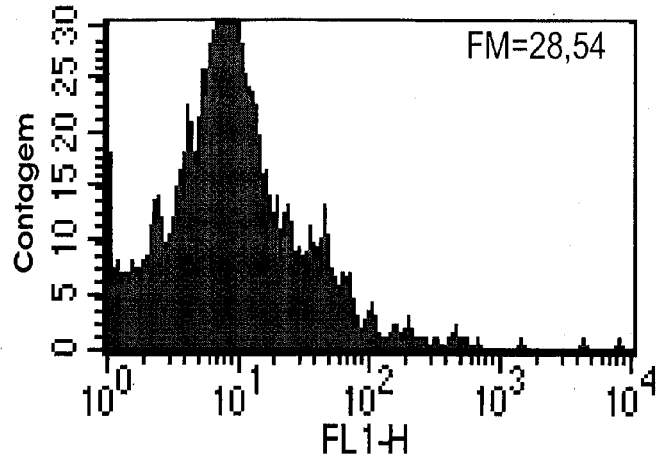


FIG. 1

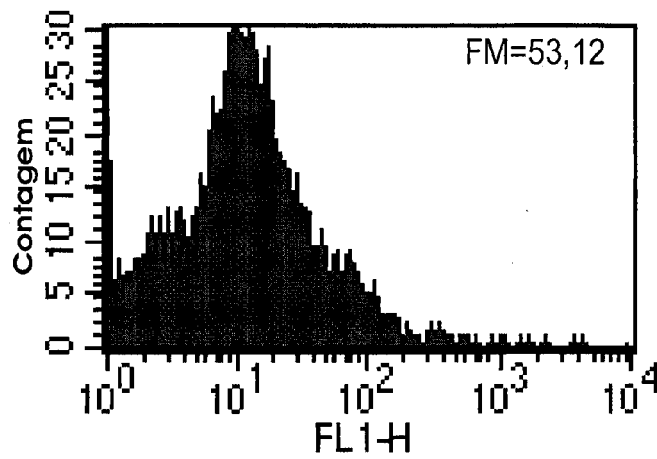


FIG. 2

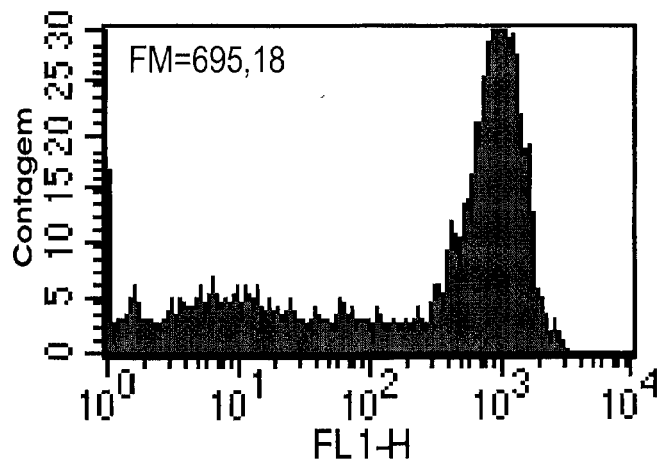


FIG. 3

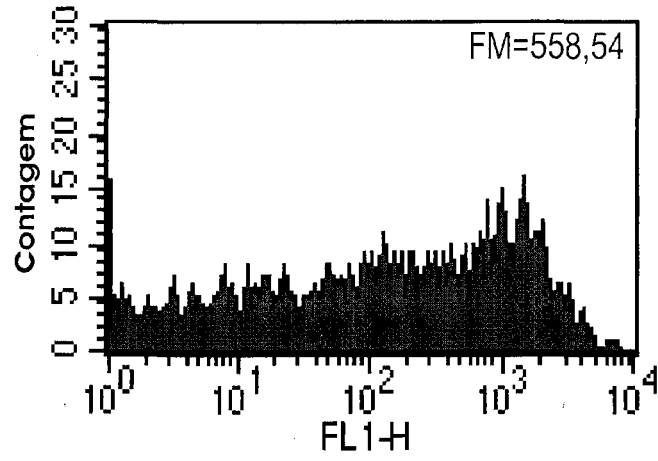


FIG. 4

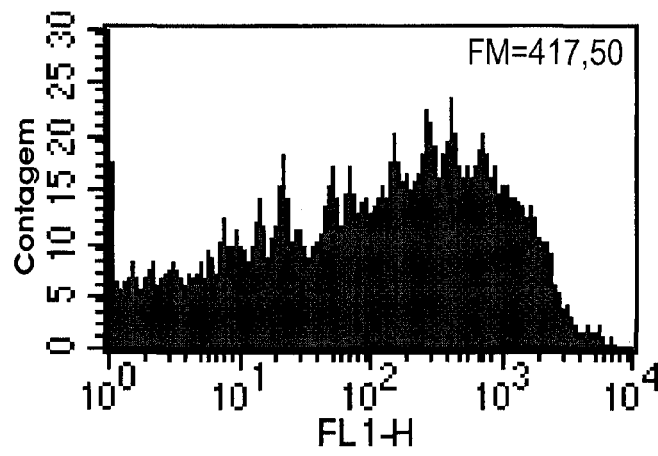


FIG. 5

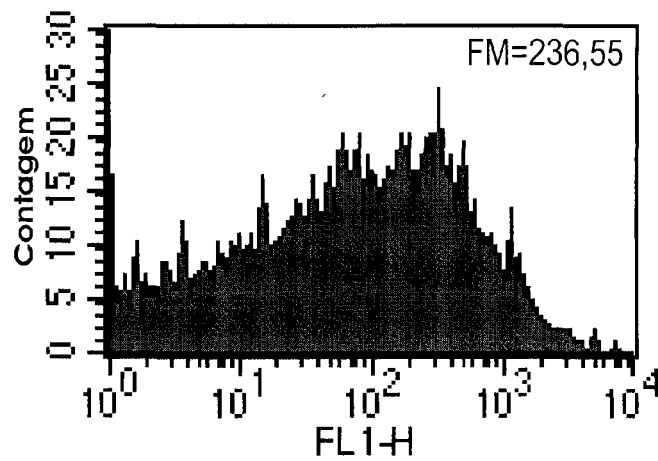


FIG. 6

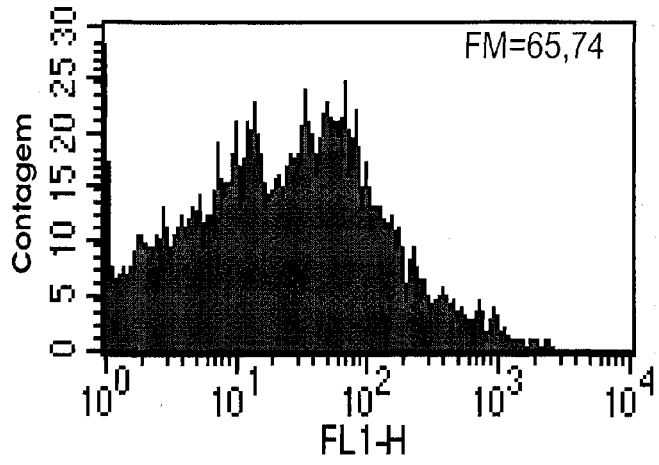


FIG. 7

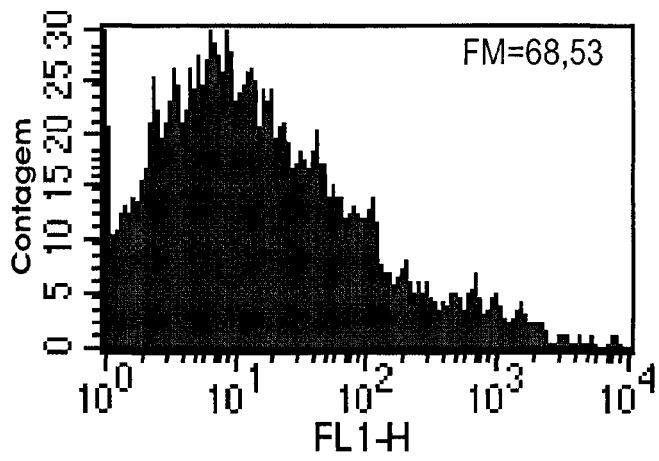


FIG. 8

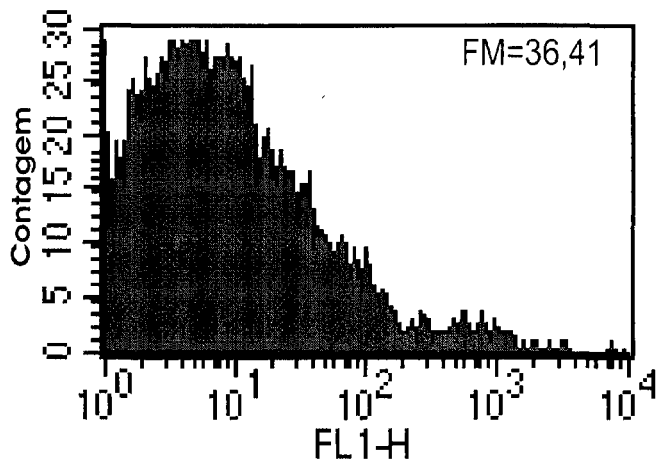


FIG. 9