



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

Bruna Renata Casadei

***“ESTUDO DE MEMBRANAS ERITROCITÁRIAS RESISTENTES A
DETERGENTES DA SÉRIE ÉTER DE POLIOXIETILENO (BRIJ)”***

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Bruna Renata Casadei
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade Estadual de
Campinas para obtenção do Título de
Mestre em Biologia Funcional e Molecular,
na área de Bioquímica.

Orientadora: Dra. Eneida de Paula
Co-orientador: Dr. Cleyton Crepaldi Domingues

Junho, 2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

C261e

Casadei, Bruna Renata

Estudo de membranas eritrocitárias resistentes a
detergentes da série éter de polioxietileno (Brij) / Bruna
Renata Casadei. – Campinas, SP: [s.n.], 2011.

Orientador: Eneida de Paula.

Co-orientador: Cleyton Crepaldi Domingues.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Biologia.

1. Biomembranas. 2. Detergentes. 3. Eritrócitos. 4.
Microdomínios da membrana. I. Paula, Eneida de, 1963-.
II. Domingues, Cleyton Crepaldi. III. Universidade
Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Título em inglês: Detergent-resistant membranes from human erythrocytes treated with polyoxyethylene acyl ethers (BRIJ).

Palavras-chave em inglês: Biomembranes; Detergents; Erythrocyte, Membrane microdomains.

Área de concentração: Bioquímica.

Titulação: Mestre em Biologia Funcional e Molecular.

Banca examinadora: Eneida de Paula, Anita Hilda Straus Takahashi, Pietro Ciancaglini.

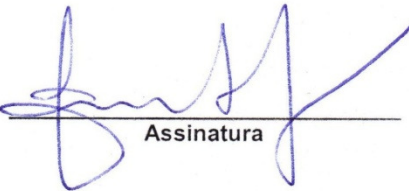
Data da defesa: 28/06/2011.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular.

Campinas, 28 de junho de 2011.

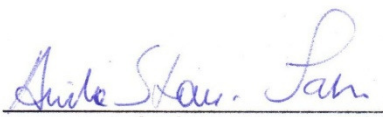
Banca examinadora:

Profa. Dra. Eneida de Paula (Orientadora)



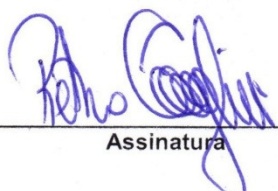
Assinatura

Profa. Dra. Anita Hilda Straus Takahashi



Assinatura

Prof. Dr. Pietro Cíancaglín



Assinatura

Profa. Dra. Karin do Amaral Riske

Assinatura

Profa. Dra. Sônia Valéria Pinheiro Malheiros
Marques Fernandes

Assinatura

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **família** mais linda desse mundo: a minha família. Obrigada sempre e por tudo! Amo vocês!

E agradeço a **Deus** por ter colocado pessoas tão incríveis no meu caminho. Para cada pessoa que passou (ou ainda está) em minha vida agradeço sempre por me mostrar a vida com outros olhos:

- À **Profa. Dra. Eneida**, minha orientadora, pela oportunidade, por me mostrar o caminho certo e dar chances para meu crescimento profissional.
- Ao **Dr. Cleyton**, meu co-orientador, obrigada pela ajuda, principalmente, na fase final de meu mestrado.
- À minha banca de defesa: **Prof. Dr. Pietro Ciancaglini** e **Profa. Dra. Anita Takahashi**.
- À **Profa. Dra. Karin do Amaral Riske**, **Profa. Dra. Patrícia** e **Prof. Dr. Ernanni**, obrigada por acreditar no meu trabalho e me dar credibilidade! **Profa. Dra. Dani**, **Profa. Dra. Sonia Malheiros** e **Prof. Dr. Leonardo Fraceto**, obrigada pelas dicas e pela ajuda no desenvolvimento do meu trabalho. **Prof. Dr. Armindo A. Alves**, obrigada por abrir as portas para meu crescimento profissional, obrigada por confiar em mim!
- As meninas e os meninos do lab: à **Raquelzitcha**, **Vivi VVV**, obrigado por me darem teto e comida, mas, principalmente, obrigada por serem minhas amigas! À **Mi**, que sempre me entende, ouve meus chororos, etc. À **Cíntia**, **Maris**, **Vivi G.**, obrigada pela amizade. À **Vivi V.**, **Ana Laís**, **Taciane**, **Sara**, **Lívia**, **Cínthia**, **Nathalie**, **Giovana T.**, **Sheila** e **Grillo**: obrigada por terem compartilhado experiências, dicas, ou apenas momentos maravilhosos. **Allan Radaic Che**, obrigada por me lembrar sempre de Deus, isso me faz tão bem!
- Aos técnicos do laboratório: **Maribel** e **Márcio**, obrigada por toda ajuda durante o mestrado.
- Aos meus amigos: **Jú Matoso**, minha psicóloga particular, e **Paulinho B**, pelos bons momentos do café; **Paulinho Castilho** e **Thaís Franco**: adorei conhecer vocês!
- Ao **Eder**, que me acompanhou, me deu forças e me apoio durante todo esse período. E obrigada pelo auxílio nas artes gráficas.
- Ao apoio financeiro do CNPq e da Fapesp (processo nº: 2009/00904-1).

SUMÁRIO

ÍNDICE DE ABREVIATURAS	VI
ÍNDICE DE FIGURAS	VII
ÍNDICE DE TABELAS	X
RESUMO.....	XI
Abstract.....	xiii
INTRODUÇÃO	15
1. Membranas biológicas	15
1.1. <i>Lipid Rafts</i>	20
1.2. Membranas Resistentes a Detergente (DRMs).....	25
1.3. <i>Lipid rafts</i> versus DRMs	26
1.4. Membrana Eritrocitária	31
1.5. Membrana do eritrócito e suas frações resistentes a detergentes.....	37
2. Detergentes e solubilização de membranas eritrocitárias.....	40
2.1. Propriedades físico-químicas dos detergentes	42
2.2. Quantificação do efeito hemolítico.....	43
OBJETIVO	47
MATERIAIS E MÉTODOS	48
1. Preparo dos eritrócitos.....	48
2. Hemólise em meio isosmótico.....	48
3. Remoção de colesterol das membranas de eritrócito.....	50
4. Isolamento de DRMs	50
5. Dosagens de proteínas totais e colesterol	51
6. Eletroforese SDS-PAGE.....	51
7. <i>Western Blotting</i>	52
8. Extração dos lipídios	53
9. Cromatografia em camada delgada de alta resolução - HPTLC.....	53
10. Composição em ácidos graxos por cromatografia a gás (CG)	54
11. Medidas de Viscosidade	55
12. Determinação do tamanho das DRMs e ghosts de eritrócito.....	55
13. Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR)	55
RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
1. Hemólise	57
2. Membranas Resistentes a Detergentes (DRMs)	63
2.1. Preparo de DRMs isoladas em diferentes condições de temperatura e a partir de células tratadas com M β CD.....	65
2.2. Caracterização do conteúdo de colesterol e proteínas de DRMs.....	67
2.3. <i>Western Blotting</i>	73
2.4. Análise dos fosfolipídios de DRMs	74
2.5. Composição dos ácidos graxos constituintes dos fosfolipídios de DRMs	80
2.6. Determinação do tamanho de DRMs.....	84
2.7. Análise da organização de DRMs por ressonância paramagnética eletrônica (EPR)	86
CONCLUSÃO	92
PERSPECTIVAS.....	95
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	96
ANEXOS	110

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

Brij 58 – polioxietileno 20-cetil éter

Brij 98 – polioxietileno 20-oleil éter

C₁₂E₈ – octaetilenoglicol mono lauril éter

C^{sat} – concentração de detergente necessária para início da solubilização

C^{sol} – concentração de detergente necessária para total solubilização

CG – cromatografia gasosa

CMC – concentração micelar crítica

DFP – diisopropilfluorofosfato

DLS – *dynamic light scattering*; espalhamento de luz dinâmico

DRM – *detergent-resistant membrane*; membrana resistente a detergente

D_w – solubilidade aquosa do detergente

EPR – *electron paramagnetic resonance*; ressonância paramagnética eletrônica

GPI - glicosilfosfatidilinositol

HLB – balanço hidrofílico-lipofílico

HPTLC – *high performance thin layer chromatography*; cromatografia em camada delgada de alta resolução

Ht – hematócrito

K_b – constante de ligação detergente-membrana

L_d – fase líquido-desordenada

L_o – fase líquido-ordenada

MβCD – metil-β-ciclodextrina

PC – fosfatidilcolina

PE – fosfatidiletanolamina

PI – fosfatidilinositol

PS – fosfatidilserina

PVDF – *polyvinylidene fluoride*; fluoreto de polivinidileno

R_e^{sat} – razão molar efetiva (detergente/lipídio, na membrana) para saturação

R_e^{sol} – razão molar efetiva (detergente/lipídio, na membrana) para solubilização

SASL – *stearic acid spin label*; marcador de spin do tipo doxil-estearato

SDS-PAGE – *sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*; eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio

SM – esfingomielina

TX-100 – polioxietileno glicol terc-otilfenil éter

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química do colesterol e dos fosfolipídios: fosfatidilglicerol (PG), fosfatidiletanolamina (PE), ácido fosfatídico (PA), fosfatidilserina (PS), fosfatidilcolina (PC), fosfatidilinositol (PI) e esfingomielina (SM), onde R representa a cadeia hidrocarbônica.	18
Figura 2. Modelo esquemático da estrutura lipídica-protéica de <i>lipid rafts</i> . Associação de colesterol com lipídios tais como esfingolipídios, formam domínios de fase L_o com propriedades físicas e biológicas únicas. Proteínas associadas a esses domínios são frequentemente aciladas ou ancoradas ao GPI. Proteínas transmembranares se localizam nas bordas dos rafts com os domínios voltados para a fase L_d enquanto as cadeias de palmitato se posicionam adjacentes ao domínio L_o	23
Figura 3. Representação da membrana plasmática e do citoesqueleto de eritrócitos. A cabeças dos dímeros da espectrina são unidos para formar tetrâmeros e suas caudas formam complexos com actina que são estabilizados pela proteína 4.1 e outras moléculas. Interações verticais conectam o citoesqueleto à bicamada lipídica através do complexo banda 3-anquirina-espectrina, entre o complexo proteína 4.1-p55-glicoforina C e entre a espectrina e a bicamada lipídica (esquema adaptado de Maier et al., 2009).....	34
Figura 4. Estrutura dos detergentes TX-100 (polioxietileno glicol terc-octilfenil éter), Brij 98 (polioxietileno 20-oleil éter, $C_{20}E_{18:1}$) e Brij 58 (polioxietileno 20-cetil éter, $C_{20}E_{16:0}$).....	41
Figura 5. Esquema de possíveis eventos envolvidos na interação de detergente com membrana biológica. Os processos correspondem à: 1 - solubilização do detergente; 2 - equilíbrios entre monômero-agregado; 3 - ligação do monômero à membrana; 4 - equilíbrios do detergente entre micela-membrana. Após a saturação da membrana, moléculas do detergente saem da membrana carregando componentes da membrana (lipídios e proteínas). As constantes representam cada processo. Os prováveis eventos resultantes da interação detergente-membrana estão listados no esquema (adaptado de Schreier et al., 2000.	45
Figura 6. Esquema de um diagrama de fase de um sistema misto lipídio-detergente.....	46
Figura 7. Determinação do C^{sat} e C^{sol} a partir da curva hemolítica. As setas indicam as concentrações para início (C^{sat}) e 100% de hemólise (C^{sol}).....	49
Figura 8. Representação do radical nítróximo (a) covalentemente ligado ao carbono 5 do ácido esteárico (b) e espectro de EPR do marcador 5-SASL em membranas (b), indicando medida dos parâmetros espectrais $2A_{//}$ e $2A_{\perp}$	56
Figura 9. Efeito hemolítico de Brij 98 sobre eritrócitos humanos. Ht=0,15 (■), 0,30% (○), 0,45% (▲) e 0,60% (▼). Os experimentos foram feitos em triplicata.....	57
Figura 10. Efeito hemolítico de Brij 58 sobre eritrócitos humanos. Ht=0,15 (■), 0,30% (○), 0,45% (▲) e 0,60% (▼). Os experimentos foram feitos em triplicata.....	57
Figura 11. Razões molares efetivas de Brij 98/Lipídio para saturação e solubilização da membrana eritrocitária. Valores de C^{sat} (■) e C^{sol} (○) foram graficados em função da concentração lipídica dos hematócitos (Ht 0,15%=13μM, Ht 0,30%=26μM, Ht 0,45%=39μM e Ht 0,60%=52μM), calculada segundo Malheiros e cols. (2000).....	59
Figura 12. Razões molares efetivas de Brij 58/Lipídio para saturação e solubilização da membrana eritrocitária. Valores de C^{sat} (■) e C^{sol} (○) foram graficados em função da concentração lipídica dos hematócitos (Ht 0,15%=13μM, Ht 0,30%=26μM, Ht 0,45%=39μM e Ht 0,60%=52μM), calculada segundo Malheiros e cols. (2000).....	60

Figura 13. Gradiente de sacarose após ultracentrifugação de eritrócitos humanos tratados com Brij 98 e Brij 58 à 4°C (A) e 37°C (B). Na Figura (A) observa-se também o aspecto do gradiente de sacarose e DRMs obtidas a partir de células com menor conteúdo de colesterol (tratadas com M β CD). A seta indica a posição de DRMs, na região do gradiente de baixa densidade. Os números 5%, 30% e 40% indicam a concentração da solução de sacarose, formando um gradiente descontínuo.	66
Figura 14. Quantificação do conteúdo de colesterol nas frações de DRM obtidas com TX-100, Brij 98 e Brij 58 e em membrana de eritrócitos (RBC). O conteúdo de colesterol dos eritrócitos equivale ao número de células presentes inicialmente na preparação das DRMs correspondendo a $2,5 \times 10^9$ (eritrócitos íntegros). Os dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão; **p<0,001, teste T de <i>student</i> não pareado, n=3-6.....	67
Figura 15. Quantificação do conteúdo protéico das frações de DRM obtidas com TX-100, Brij 98 e Brij 58. Aproximadamente $2,5 \times 10^9$ células de eritrócitos íntegros (RBC) foram utilizadas para preparo das DRMs. A quantidade de proteína presente nas membranas intactas de eritrócitos foi estimada a partir da razão de massas proteínas:lipídio (1:1,2) e da concentração lipídica total (calculada de acordo com Dodge et al., 1963; Malheiros et al.,2000). Dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão; *p<0,05 e **p<0,001, teste T de <i>student</i> não pareado, n=3-6. ...	69
Figura 16. Razão (m:m) colesterol/proteína em DRMs obtidas com TX-100, Brij 98 e Brij 58. Aproximadamente $2,5 \times 10^9$ células de eritrócitos íntegros (RBC) foram utilizadas para preparo de DRMs. A quantidade de proteína presente no eritrócito foi estimada a partir da razão de massas proteínas:lipídio (1:1,2) e da concentração lipídica total (calculada de acordo com Dodge et al., 1963; Malheiros et al., 2000). Os dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão (n= 3-6).....	71
Figura 17. Eletroforese SDS-PAGE de proteínas presentes em DRMs preparadas com TX-100 (A), com Brij 98 e Brij 58 (B) a 4°C (A = coluna 2; B = colunas 2 e 4), 37°C (A = coluna 4; B = colunas 6 e 7) e a partir de células com conteúdo reduzido de colesterol e lisadas a 4°C (A = coluna 3; B = coluna 3 e 5). Uma quantidade de amostra de ghosts proporcional à quantidade da fração de DRMs foi usada como controle (A). PM (coluna 1) indica os padrões de peso molecular das proteínas.....	72
Figura 18. Detecção por <i>western blotting</i> das proteínas marcadoras de <i>lipid rafts</i> , estomatina e flotilina-2, presentes nas DRMs e ghosts; 10 ug de proteínas foram aplicadas para todas amostras exceto para a DRM de TX-100 onde foi aplicado 5 ug.....	73
Figura 19. Perfil de distribuição dos fosfolipídios presentes em ghosts de eritrócitos e em DRMs de Brij 98, Brij 58 e TX-100. O padrão 1 é uma mistura lipídica de esfingomiéline (SM), fosfatidilcolina (PC) e fosfatidiletanolamina (PE). O padrão 2 contém fosfatidilserina (PS). A placa foi corada com azul de molibdênio, para visualização dos fosfolipídios.	76
Figura 20. Distribuição dos fosfolipídios (SM=esfingomiéline, PC=fosfatidilcolina, PE=fosfatidiletanolamina) de ghosts e de DRMs de TX-100, Brij 98 e Brij 58, obtidos das medidas de HPTLC. Os valores estão expressos em mol% e correspondem a uma média de 3 experimentos independentes.	77
Figura 21. Razão esfingomiéline/glicerofosfolipídios (SM/Glicerof.) encontradas nas frações de DRM de TX-100, Brij 98 e Brij 58, preparadas a 4°C. Glicerofosfolipídios representam PC e PE. Os dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão; *p<0,05 e **p<0,001, teste T de <i>student</i> não pareado, n=3-6.....	79

Figura 22. Razão colesterol/glicerofosfolípídios (COL/Glicerof.) encontradas nas frações de DRM de TX-100, Brij 98 e Brij 58, preparadas a 4°C. Glicerofosfolípídios estão representam PC e PE. Os dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão; *p<0,05 e **p<0,001, teste T de <i>student</i> não pareado, n=3-6.....	79
Figura 23. Composição das espécies de ácidos graxos presentes em esfingomielina (SM). Ácido palmítico (16:0), ácido esteárico (18:0), ácido oléico (18:1), ácido linoléico (18:2), ácido eicosatetraenoico (20:4), ácido beênico (22:0), ácido lignocérico (24:0), ácido nervônico (24:1). • representa p<0,05 entre DRMs. * representa p<0,05, e # representa p<0,001 para DRMs comparadas com os ghosts. Teste T de <i>student</i> não pareado, n=3.	82
Figura 24. Composição das espécies de ácidos graxos presentes em fosfatidilcolina (PC). Ácido palmítico (16:0), ácido esteárico (18:0), ácido oléico (18:1), ácido linoléico (18:2), ácido eicosatetraenoico (20:4), ácido beênico (22:0), ácido lignocérico (24:0). • representa p<0,05 entre DRMs. * representa p<0,05, e # representa p<0,001 para DRMs comparadas com os ghosts. Teste T de <i>student</i> não pareado, n=3.	82
Figura 25. Composição das espécies de ácidos graxos presentes em fosfatidiletanolamina (PE). Ácido palmítico (16:0), ácido esteárico (18:0), ácido oléico (18:1), ácido linoléico (18:2), ácido eicosatetraenoico (20:4), ácido beênico (22:0), ácido lignocérico (24:0). Os dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão (n= 3). * representa p<0,05, e # representa p<0,001 para DRMs comparadas com os ghosts. Teste T de <i>student</i> não pareado, n=3.	83
Figura 26. Razão ácidos graxos saturados/insaturados dos principais fosfolípídios encontrados na membrana do eritrócito e em suas DRMs. • representa p<0,05 entre DRMs. # representa p<0,001 para DRMs comparadas com os ghosts. Teste T de <i>student</i> não pareado, n=3.	84
Figura 27. Determinação da viscosidade encontrada nas diferentes concentrações de sacarose utilizadas para formação do gradiente. A seta indica a viscosidade encontrada nas amostras de DRMs. Os dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão (n=3) As medidas foram realizadas a 25°C.....	85
Figura 28. Espectros experimentais de EPR da sonda paramagnética 5-SASL incorporada em DRMs de eritrócitos íntegros tratados TX-100, Brij 98 e Brij 58 a 4°C. As setas indicam picos isotrópicos devidos ao marcador livre em água. Medidas feitas a 25 °C, 9,7 GHz e janela espectral de 100 gauss.....	88
Figura 29. Parâmetro de ordem (S) calculados a partir dos espectros de EPR com o marcador 5-SASL incorporados na membrana de eritrócitos íntegros (RBC) ou reduzidas de colesterol (RBC – M β CD) e em DRMs preparadas a 4°C, 37°C e a partir de células integras reduzidas de colesterol (DRM – M β CD – 4°C). Dados foram expressos como média $\pm$ SD; *p<0,05 e **p<0,001, teste T de <i>student</i> não pareado, n=3-6.....	88
Figura 30. Parâmetro de ordem (S) calculados a partir dos espectros de EPR com o marcador 16-SASL incorporados na membrana de eritrócitos íntegros (RBC) ou reduzidas de colesterol (RBC – M β CD) e em DRMs preparadas a 4°C, 37°C e a partir de células integras reduzidas de colesterol (DRM – M β CD – 4°C). Dados foram expressos como média $\pm$ SD; *p<0,05 e **p<0,001, teste T de <i>student</i> não pareado, n=3-6.....	89

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Distribuição de tamanhos de <i>rafts</i> determinados por várias técnicas bioquímicas e biofísicas em diferentes membranas modelo e biológicas.....	31
Tabela 2. Propriedades físico-químicas dos detergentes* (massa molecular – MM; balanço hidrofílico/lipofílico – HLB; concentração micelar crítica – CMC).....	43
Tabela 3. Efeito hemolítico (C^{sat} e C^{sol}) dos detergentes TX-100, Brij 98 e Brij 58 em membranas de eritrócito humano, sob condições isotônicas, pH 7,4 e 37 °C.....	58
Tabela 4. Razões molares efetivas detergente/lipídio e parâmetros relacionados com a lise de eritrócitos induzida por Brij 98, Brij 58 e TX-100. Condições experimentais como descritas nas Figuras 9 e 10.....	60
Tabela 5. Tamanho das vesículas de ghosts e de DRMs de TX-100, Brij 98 e Brij 58.	85

RESUMO

A visão atual sobre membranas biológicas abarca descrições cada vez mais complexas devido, principalmente, à descoberta de novos papéis atribuídos aos lipídios e sua heterogeneidade. Em particular a associação de esfingolipídios e colesterol, acrescida de proteínas específicas, constitui a base da formação de domínios membranares conhecidos como *lipid rafts*. *Rafts* são microdomínios funcionais de biomembranas e estão envolvidos em diversos processos biológicos como reconhecimento celular, endocitose, transdução de sinal, entre outros processos. Uma estratégia experimental para estudar esses domínios é a preparação de frações de membrana parcialmente resistentes ao tratamento com detergentes, a baixa temperatura (4°C). Neste trabalho demonstramos pela primeira vez o preparo e caracterização de frações resistentes a detergente (DRMs) extraídas de membranas de eritrócito humano, a partir do tratamento com os detergentes não iônicos polioxietileno 20-oleil éter (Brij 98) e polioxietileno 20-cetil éter (Brij 58), seguida de separação por ultracentrifugação em gradiente de sacarose. Essas DRMs foram obtidas a 4°C e 37°C, a partir de membranas intactas e com conteúdo reduzido de colesterol (após tratamento com metil- β -ciclodextrina) e foram comparadas com DRMs de Triton X-100 (TX-100) em relação ao tamanho, conteúdo proteico e lipídico e grau de organização da bicamada. As frações de DRM de Brij mostraram-se enriquecidas em colesterol e fosfolipídios com ácidos graxos de cadeia saturada (em especial ácido lignocérico das esfingomielinas), características consistentes com *lipid rafts*. No entanto, DRMs de TX-100 apresentaram maior proporção de esfingomielinas/glicerofosfolipídios que as frações obtidas com Brij, além de menor proporção de fosfatidiletanolamina, um lipídio preferencial da monocamada interna da membrana de eritrócitos. Em relação à solubilização proteica, a membrana do eritrócito foi mais resistente ao tratamento com Brij 98 do que aos outros dois detergentes. Flotilina-2 e estomatina foram encontradas nas frações de DRMs de Brij 98 e Brij 58, porém a redução do conteúdo de colesterol da membrana eritrocitária resultou numa menor associação da flotilina-2 àquelas DRMs. Resultados de Ressonância Paramagnética Eletrônica, com uso de marcadores de spin do tipo

doxil-estearato não acusaram variação significativa no grau de empacotamento dos lipídios nas bicamadas de DRMs de Brij 98 e Brij 58 em relação à membrana eritrocitária, diferentemente do observado em DRMs de TX-100 e do que seria esperado para domínios lipídicos na fase líquido-ordenada. Em conclusão, DRMs de eritrócitos humanos, com características compatíveis aos domínios funcionais de biomembranas (*rafts*), foram obtidas tanto a 4°C quanto a 37°C; essas frações resistentes aos Brij apresentaram tamanho, composição proteica e lipídica e grau de empacotamento da bicamada diferente das DRMs de TX-100, indicando um processo de extração diferencial dos componentes da membrana eritrocitária induzida por esses detergentes.

Abstract

Depiction of biological membranes has been turning more and more complex lately due to the new roles assigned to their lipid components and their heterogeneity. The association between sphingolipids and cholesterol is the basis of lipid rafts formation. Rafts are functional microdomains of biological membranes which have been associated to different biological processes such as cellular recognition, endocytosis and signal transduction, among others. An useful experimental approach to study lipid rafts is the preparation of membrane fractions partially resistant to detergents under low temperature (4°C). In this work we report the isolation of detergent resistant membranes (DRMs) from human erythrocytes treated with the non-ionic detergents polioxyethylene 20-oleoyl ether (Brij 98) and polioxyethylene 20-cetyl ether (Brij 58) followed by sucrose gradient ultracentrifugation. Such DRMs were obtained at 4°C and 37°C, from cholesterol-depleted (treated with methyl- β -cyclodextrin) and intact erythrocyte membranes and they compared to DRMs obtained with Triton X-100 (TX-100) regarding the size, protein and lipid content and membrane fluidity. Brij DRMs were found to be enriched in cholesterol and phospholipids containing saturated fatty acids (especially those from sphingomyelin), features commonly associated to lipid rafts. Nevertheless, TX-100 DRMs presented higher sphingomyelin/phospholipid ratios and lower phosphatidylethanolamine content (a glycerophospholipid mainly present in the inner leaflet) than the Brij's. As for protein solubilization, erythrocyte membranes were more resistant to Brij 98 than to the other two detergents. Flotillin-2 and stomatin were found in both Brij 98 and Brij 8 DRMs. However, flotillin-2 was partially solubilized when DRMs were prepared from cholesterol-depleted erythrocyte membrane. Electron paramagnetic resonance experiments, with doxyl stearic acid spin labels incorporated in the DRMs showed no significant changes in the bilayer compactness of Brij 98 and 58 DRMs in comparison to intact membrane, a unexpected result for lipid domains existing in a liquid-ordered phase, and in contrast to results previously observed with TX-100 DRMs. Altogether, these results show the isolation of DRMs from human erythrocytes treated with Brij 98 and Brij 58 at low (4°C) and physiological temperature (37°C). These

detergent-resistant membrane fractions, obtained with Brij 98 and 58 presented some lipid rafts features, although with differences in protein and lipid contents, size and membrane fluidity in comparison to TX-100 DRMs. Besides, these results suggest that TX-100, Brij 98 and Brij 58 induced a different solubilization process on the erythrocyte membrane.

INTRODUÇÃO

1. Membranas biológicas

As membranas biológicas abrigam uma variedade de processos bioquímicos vitais nas células. Elas agem não somente definindo o limite celular e dividindo a célula em compartimentos discretos, mas também constituem o ambiente necessário para a atividade de inúmeras proteínas. Além disso, elas organizam sequências de reações complexas, atuam na recepção/transdução de sinais e nas transformações de energia para a célula. Em especial, as membranas plasmáticas formam a barreira que separa o citoplasma do meio que circunda a célula. Nutrientes e sinais externos que são essenciais para a proliferação e atividade celular devem atravessar essa barreira para entrar na célula, sendo a membrana plasmática um importante sítio para eventos de sinalização celular onde muitas proteínas de interesse terapêutico estão localizadas (Rajendran et al., 2010).

As membranas plasmáticas são compostas por uma bicamada de lipídios onde proteínas estão inseridas e, apesar de conter uma grande fração de massa de proteínas, a bicamada lipídica é a chave da construção da membrana biológica formando uma matriz estrutural e oferecendo estabilidade mecânica e seletiva à permeação de íons e moléculas grandes (Machan & Hof, 2010). A composição e distribuição lipídica-proteica fazem das membranas biológicas estruturas fluídas, assimétricas e dinâmicas (Berg et al., 2007), cujas combinações variáveis de lipídios e proteínas são específicas para cada espécie e tipo celular (Nelson & Cox, 2006). As membranas possuem ainda uma porção de carboidratos, que aparecem em menor quantidade em relação aos outros componentes e são encontrados na forma de glicoproteínas e glicolipídios. Os componentes lipídicos das membranas formam uma barreira de permeabilidade e suas proteínas agem como um sistema de bombas e canais que conferem à membrana a permeabilidade seletiva (Berg et al., 2007). A passagem da água pela membrana, por exemplo, é facilitada por uma família de proteínas conhecidas como aquaporinas. Mais de dez aquaporinas diferentes de

mamíferos já foram identificadas, sendo a aquaporina-1 de eritrócitos humanos a primeira a ser descoberta e, provavelmente, a mais estudada (Benga, 2006).

As duas monocamadas das membranas celulares são compostas por centenas de lipídios distribuídos assimetricamente, além de diversos tipos de proteínas. Em mamíferos, os glicerofosfolipídios e os esfingolipídios são os principais componentes lipídicos das biomembranas, além do colesterol que é uma das moléculas mais importantes na organização das membranas como uma barreira física. Esses lipídios expõem seus grupos polares ao meio aquoso, enquanto as cadeias de ácidos graxos e o núcleo da molécula do colesterol estão orientados para o interior de cada uma das monocamadas lipídicas, formando uma lamela de caráter hidrofóbico. O comprimento e o grau de insaturação dos ácidos graxos, constituintes dos glicerolipídios e esfingolipídios, são os principais determinantes da fluidez ou compactação da bicamada lipídica, seguidos pelo teor de colesterol, interações entre as cabeças polares de lipídios e associação com proteínas específicas (Yeagle, 2005).

Os lipídios e a maioria das proteínas são livres para se difundirem lateralmente dentro da membrana enquanto o movimento de translocação entre as monocamadas é inexistente nas proteínas e menos frequente nos lipídios. O movimento dos lipídios entre as duas monocamadas pode ocorrer de forma ativa através de enzimas translocases ATP-dependentes conhecidas como flipases e flopases ou por uma espontânea translocação dos lipídios de um lado para o outro da bicamada, entretanto, esse último processo é extremamente lento devido à alta barreira energética imposta pela resistência da passagem dos grupamentos polares através do interior hidrofóbico da bicamada e também pela resistência adicional imposta pelo aumento da tensão lateral desenvolvida quando lipídios em translação se inserem na outra monocamada (Sackmann, 1995; Devaux et al., 2008; Contreras et al., 2010).

Os lipídios que constituem as membranas apresentam uma grande variedade de cadeias acilas e grupos polares, em várias combinações. Além disso, a composição diferencial de lipídios e proteínas nas monocamadas interna e externa intensifica a

assimetria das membranas, que é fundamental para que as mesmas exerçam seus papéis estruturais e funcionais.

Na membrana plasmática de mamíferos, dos tipos de lipídios majoritários, a fosfatidilcolina (PC) e a esfingomielina (SM) estão principalmente localizadas na monocamada externa enquanto a fosfatidiletanolamina (PE) e a fosfatidilserina (PS) estão exclusivamente presentes na monocamada interna (Contreras et al., 2010). Em pH fisiológico, PC, PE e SM são moléculas zwitteriônicas, com carga negativa no grupo fosfato ($\text{pKa PO}_4^- \leq 1$) e carga positiva no grupo amino ($\text{pKa NH}_3^+ = 11,25$), enquanto PS são moléculas com carga negativa ($\text{pKa PO}_4^- \leq 1$, $\text{pKa NH}_3^+ = 11,25$, $\text{pKa COO}^- = 5,5$). Lipídios como PE e PS não são apenas componentes estruturais das bicamadas, mas também desempenham um importante papel como reguladores de fase de outros lipídios de membrana; outros lipídios como fosfatidilinositol (PI), fosfatidilglicerol (PG) e ácido fosfatídico (PA) participam de processos cruciais para o funcionamento celular (por exemplo, transdução de sinal, transporte ativo e atividades de enzimas) (Wydro, 2011a). Já a distribuição do colesterol entre as monocamadas ainda não é bem conhecida, mas sabe-se que ele está presente nas duas monocamadas. A manutenção da assimetria lipídica é um processo importante para uma variedade de processos celulares (Pomorski & Menon, 2006), por exemplo, a exposição de PS na superfície celular é observada em células vasculares tumorais, mas não em células normais (Ran et al., 2002); outro exemplo é a apoptose celular: macrófagos reconhecem células com PS exposta na superfície e iniciam a fagocitose da célula. A estrutura química dos grupos polares dos fosfolipídios de membrana e do colesterol estão representadas na Figura 1.

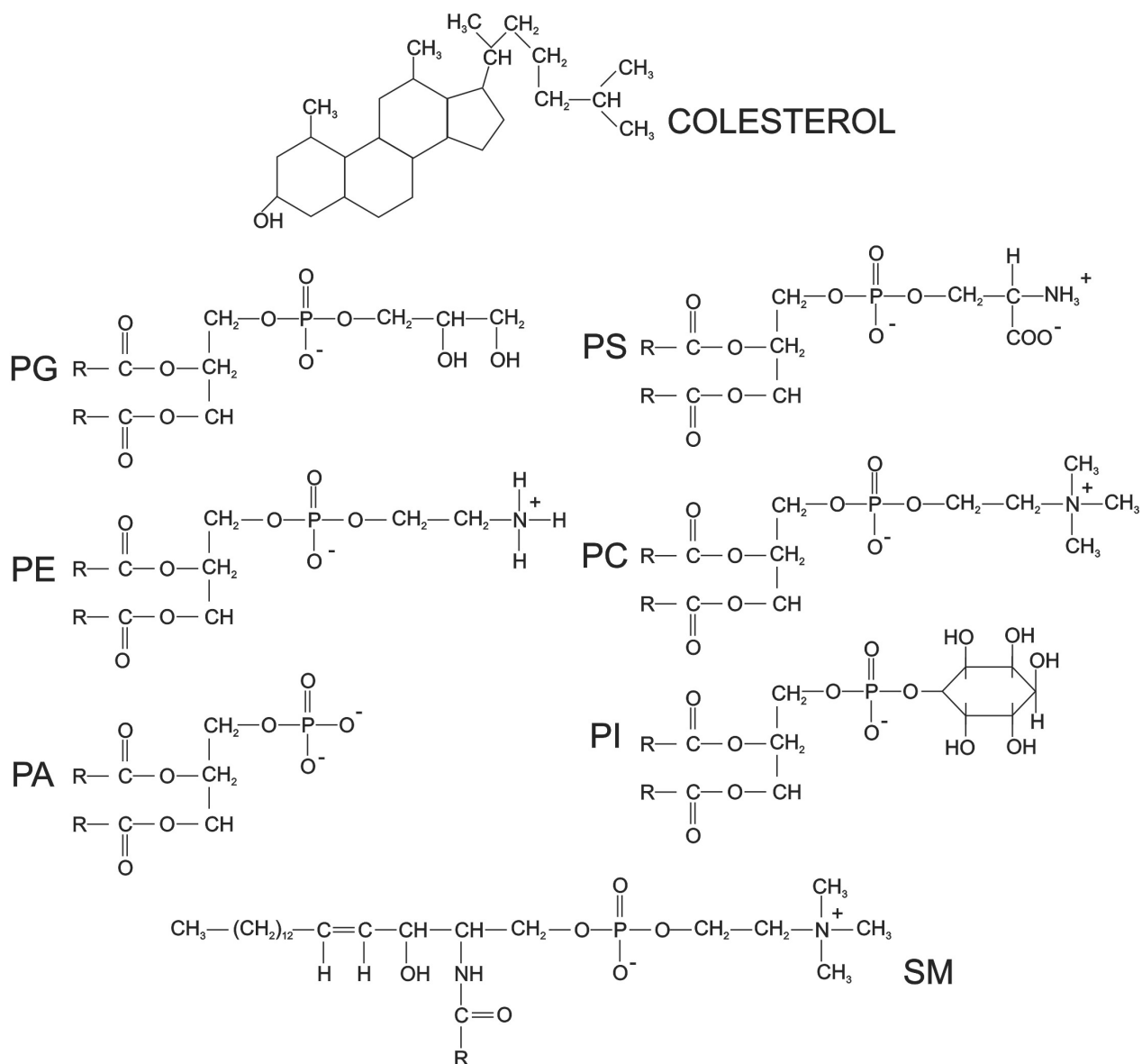


Figura 1. Estrutura química do colesterol e dos fosfolipídios: fosfatidilglicerol (PG), fosfatidiletanolamina (PE), ácido fosfatídico (PA), fosfatidilserina (PS), fosfatidilcolina (PC), fosfatidilinositol (PI) e esfingomielina (SM), onde R representa a cadeia hidrocarbônica.

Já as proteínas de membrana são classificadas de acordo com sua disposição na membrana: as integrais ou intrínsecas e as periféricas ou extrínsecas. A remoção das proteínas integrais, que estão fortemente associadas com a bicamada, só ocorre por agentes capazes de romper interações hidrofóbicas entre proteínas e lipídios, como os detergentes, solventes orgânicos ou outros agentes desnaturantes. Já as proteínas

periféricas, por estarem associadas com a membrana através de interações eletrostáticas ou ligações de hidrogênio, podem ser removidas por tratamentos moderados como alterações no pH, na força iônica e ainda pelo tratamento com uréia ou carbonato (Santos & Ciancaglini, 2000; Yeagle, 2005). Além disso, algumas proteínas associadas à membrana pelo lado citoplasmático, juntamente com proteínas integrais, formam uma malha rígida, o citoesqueleto, que ajuda a manter a integridade da célula (Murador & Deffune, 2007; Chichili & Rodgers, 2009).

O modelo do mosaico fluído de Singer e Nicolson (1972), proposto há quase 40 anos, foi e ainda é muito importante para compreensão da membrana plasmática. Neste modelo, proteínas se difundem lateralmente, em um ambiente lipídico homogêneo. Este modelo encontrou suporte no trabalho de Frye e Edidin (1970), que demonstraram a difusão de proteínas através da membrana plasmática de células fundidas. Por diversas décadas, pesquisadores foram dominados pela idéia de que as proteínas de membranas eram o fator chave para a funcionalidade da membrana, enquanto os lipídios eram considerados como agentes passivos, servindo apenas como um solvente fluído para aquelas (Simons & Gerl, 2010). Embora após quase 4 décadas da publicação de Singer e Nicolson (1972) a elegância do modelo do mosaico fluído ainda seja fascinante, a membrana plasmática têm sido gradualmente envolvida em descrições mais complexas, principalmente pela elucidação do papel dos lipídios e sua heterogeneidade.

Em 1974, os estudos sobre efeito da temperatura no comportamento da membrana biológica levaram alguns pesquisadores a propor a presença de agregados lipídicos em membranas (Lee et al., 1974). No ano seguinte, Wunderlich e cols. (1975), sugeriram que esses agregados lipídicos representavam regiões mais organizadas da membrana (fase “quase-cristalina”) cercadas por uma região mais fluida (líquido-cristalina). Em 1978, essa idéia foi refinada como sendo uma região onde os lipídios estariam num estado mais ordenado (Wunderlich et al., 1978). O conceito de domínios lipídicos foi formalizado somente alguns anos mais tarde, quando Karnovsky e cols (1982) observaram heterogeneidade no decaimento do tempo de vida do fluoróforo 1,6-

difenil-1,3,5 hexatrieno (DPH) incorporado em diferentes tipos de membranas biológicas, indicando assim a presença de várias fases no ambiente lipídico da membrana (Karnovsky et al., 1982).

A partir daí vários modelos de domínios de membrana foram descritos e em 1997, Simons e Ikonen, estabeleceram o modelo dos *lipid rafts* em que associações entre esfingolipídios, colesterol e proteínas específicas poderiam atuar em processos de sinalização, infecção viral e tráfego celular. Assim *lipid rafts* ou simplesmente *rafts*, são microdomínios existentes em biomembranas e que se diferenciam em composição lipídica, proteica e em parâmetros estruturais e dinâmicos. O conceito de *rafts* trouxe à tona o papel dos lipídios, dando-lhes uma função e especificidade química dentro do plano da bicamada (Simons & Gerl, 2010).

Além do modelo de *lipid rafts*, baseado nas interações lipídio-proteína, outros modelos de domínio de membrana, como aqueles baseados nas interações proteína-proteína e lipídio-lipídio, também têm sido descritos (Quinn, 2010). Além disso, o envolvimento do citoesqueleto é considerado em apenas alguns desses modelos.

1.1. *Lipid Rafts*

A hipótese de *lipid rafts* foi originalmente desenvolvida como uma explicação para a distribuição lipídica heterogênea no plano da bicamada, com o enriquecimento de glicosfingolipídios e proteínas específicas nos pólos da membrana apical de células epiteliais (Simons & Van Meer, 1988). Ao contrário do sinal específico usado por proteínas, não se conhecia o fator que pode organizar a distribuição lateral de lipídios na membrana. Para os domínios das células epiteliais polarizadas, Simons e Van Meer (1988) hipotetizaram que as propriedades associativas dos glicosfingolipídios como sua capacidade de formar pontes de hidrogênio, poderiam levar à formação de microdomínios de membranas.

Para compreensão do conceito de *lipid rafts* é necessário levar em consideração as características físico-químicas fundamentais das membranas: sob

aquecimento, bicamadas compostas de fosfolipídios puros apresentam duas principais fases que são dependentes da temperatura. Em temperaturas baixas (abaixo da temperatura de transição de fases principal (T_m), que é dependente do comprimento e do grau de insaturação da cadeia acila), a bicamada se encontra na fase gel (S_o), que possui um ordenado arranjo das cadeias acilas e mobilidade restrita dos lipídios. Acima da T_m a bicamada está na fase líquido-desordenada (L_d) onde as cadeias acilas em conformação *trans-gauche* movimentam-se com alto coeficiente de difusão e alta amplitude de rotação ao redor destas ligações dentro do plano da bicamada, conferindo caráter fluido e desordenado à bicamada (Brown & London, 1998; van Meer et al., 2008).

Além desses conceitos fundamentais, diversos estudos biofísicos que utilizam membranas modelo constituídas de dois ou três componentes lipídicos diferentes têm dado suporte a teoria dos *lipid rafts*, especialmente no que diz respeito à formação de uma fase intermediária entre as S_o e L_d , característica de *lipid rafts*. Quando a bicamada é formada por dois tipos de lipídios com diferentes T_m , a separação de fases pode ocorrer, e as fases S_o e L_d podem coexistir. A fase gel (S_o) não existe em membranas biológicas (compostas por uma mistura de lipídios), mas a separação de fases entre duas fases fluídas pode ocorrer quando o colesterol está presente (Wiśniewska et al., 2003; van Meer et al., 2008). Na presença de colesterol e lipídios com cadeia longa e saturada, uma terceira fase pode ser formada, a fase líquida ordenada (L_o) caracterizada não somente pela limitada ordem das cadeias acilas, mas também pelo alto grau de difusão lateral pela bicamada, como ocorre na fase L_d (Veatch & Keller, 2005; Brown, 2006).

Em membranas modelo, domínios na fase L_o podem coexistir com domínios na fase L_d e com domínios na fase gel (onde os lipídios apresentam as cadeias acila extremamente ordenadas e são praticamente estáticos) (Brown, 2006). Numa mistura de três componentes lipídicos reconstituídos em vesículas unilamelares gigantes (GUVs), por exemplo, pode-se variar o tamanho da fase L_o e L_d mudando sua composição (Veatch & Keller, 2002), obtendo-se microdomínios que varia de tamanhos

maiores até os microscopicamente indetectáveis. De forma semelhante, domínios como *lipid rafts* foram visualizados em GUVs isoladas a partir de lipídios extraídos da membrana de rins de ratos (Dietrich et al., 2001). No entanto, é importante ressaltar que membranas modelos não são afetadas pela atividade de processos celulares, tais como tráfego de vesículas e não são sustentadas pelo citoesqueleto (Fan et al., 2010) como ocorrem em sistemas *in vivo*, e, portanto, esses sistemas podem apresentar comportamentos distintos daquele em biomembranas. Um outro aspecto bastante importante, tem sido demonstrado tanto em sistemas de membrana modelo quanto em membrana plasmática, em que a subunidade B da toxina da cólera ligada ao gangliosídeo GM₁ pode induzir a separação lateral de fases. Essa observação chama a atenção para o papel crítico da interação proteína-lipídio na formação de microdomínios (*rafts*) *in vivo* (Lingwood et al., 2009).

Atualmente, os *lipid rafts* são definidos como microdomínios existentes *in vivo*, altamente dinâmicos, funcionais e que são constituídos por esfingolipídios, colesterol e proteínas específicas que se associam e se dissociam na escala de segundos (Pike, 2009). Esses microdomínios se encontram no estado L₀ e a maioria dessas proteínas é ancorada à membrana via GPI (glicosilfosfatidilinositol) localizado na monocamada externa, ou via dupla acilação (Quinn, 2010; Salaun et al., 2010). Além disso, *lipid rafts* também contêm proteínas específicas, como por exemplo, estomatinas, flotilinas e aquaporina-1, que preferencialmente particionam dentro desses microdomínios (Schnitzer & Oh, 1996; Pike, 2004; Staubach & Hanisch, 2011). Essas e outras proteínas apresentam, portanto, alta afinidade por ambientes lipídicos organizados, como os domínios na fase L₀.

Embora muitos estudos tenham sido feitos descrevendo a natureza das proteínas que estão inseridas nos *rafts*, a inclusão dessas proteínas nos *rafts* ainda carece de maiores elucidações (Lingwood et al., 2009). No entanto, sabe-se que proteínas ancoradas ao GPI, além de aciladas por palmitoilação e miristoilação são as principais formas de associação das proteínas dos *lipid rafts* (Pike, 2009) (Figura 2).

Recentes estudos têm demonstrado a interação entre o citoesqueleto e os *lipid rafts*. Nesses estudos, o papel do citoesqueleto como agente estabilizador dos *rafts*, proveria um caminho para a formação desses domínios, de maneira a favorecer ou inibir as funções desses microdomínios (Chichili & Rodgers, 2009; Owen et al., 2009; Pike, 2009; Simons & Gerl, 2010). Entretanto, mais estudos são necessários para entender a relação do citoesqueleto com os microdomínios lipídicos.

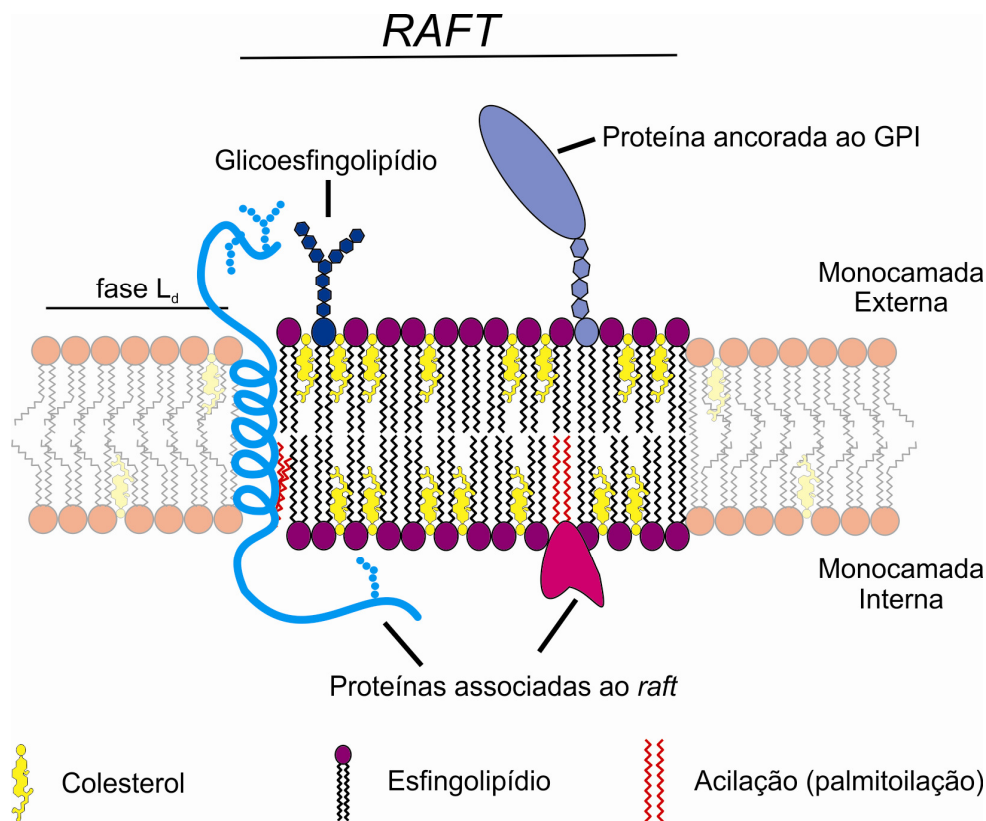


Figura 2. Modelo esquemático da estrutura lipídica-protéica de *lipid rafts*. Associação de colesterol com lipídios tais como esfingolipídios, formam domínios de fase L_o com propriedades físicas e biológicas únicas. Proteínas associadas a esses domínios são frequentemente aciladas ou ancoradas ao GPI. Proteínas transmembranares se localizam nas bordas dos rafts com os domínios voltados para a fase L_d enquanto as cadeias de palmitato se posicionam adjacentes ao domínio L_o .

Apesar da dificuldade para observar os *lipid rafts* in vivo, muitas evidências, embora indiretas, corroboram sua existência (Simons & Gerl, 2010). É consenso atual que *in vivo* os *rafts* são microdomínios altamente dinâmicos, com características de dimensão linear na ordem de 20-200 nm, com tempo de vida entre 10^{-2} s a 10^3 s e

distribuição espacial que pode depender da ligação das proteínas desses microdomínios com o citoesqueleto (Lillemeier et al., 2006).

O mecanismo de infecção de vários patógenos está relacionado com a formação de *lipid rafts*, no qual utilizam proteínas e lipídios constituintes dos *rafts* para poder entrar na célula (Rajendran et al., 2010). Como exemplos do mecanismo de infecção estão o antígeno protetor (proteína da toxina causadora do antraz) que se liga a proteínas ancoradas ao GPI para entrar na célula e a toxina da cólera que utiliza os gangliosídios (Gruenberg & van der Goot, 2006). Outro exemplo seriam os receptores CD4 e quimioninas (envolvidos na entrada do vírus HIV na célula hospedeira) que se encontram particionados em *lipid rafts* (Popik et al., 2002). Os *rafts* também estão presentes em membranas de fungos como exemplo *Histoplasma capsulatum* e *Paracoccidioides brasiliensis* (Maza et al., 2008; Ywazaki et al., 2011) e em protozoários como os da espécie *Leishmania* (Tanaka et al., 2007; Suzuki et al., 2008) e *Trypanosoma cruzi* (Fernandes et al., 2007; Takahashi et al., 2009). Dessa forma, as propriedades funcionais dos domínios de membranas que estão envolvidas na viabilidade celular e nas patologias, ressaltam a importância de compreender a estrutura detalhada das membranas e os mecanismos de formação dos domínios.

Devido à formação e partição de proteínas específicas dentro desses domínios de membranas serem processos altamente dinâmicos e devido ao pequeno tamanho e a natureza transiente destes, existe uma grande dificuldade em visualizar os *lipid rafts in vivo* (Rajendran et al., 2010). Uma das estratégias para estudar sua existência e função tem sido obtida por meios bioquímicos e técnicas indiretas tais como a extração de frações de membranas resistentes a detergente (DRMs) a 4°C (Schuck et al., 2003; Pike, 2004; Pike et al., 2005; Brown, 2006; Ingelmo-Torres et al., 2009). Essa estratégia foi combinada com o uso de metil- β -ciclodextrina (M β CD) para extrair colesterol das membranas celulares. O fato de proteínas encontradas nas DRMs serem solubilizadas após tratamento com M β CD, indica possível associação com *rafts* e, dessa forma, a funcionalidade dessas proteínas dependeria da presença desses domínios enriquecidos de colesterol *in vivo* (Simons & Gerl, 2010).

1.2. Membranas Resistentes a Detergente (DRMs)

A caracterização bioquímica dos microdomínios de membranas, constituídos principalmente de esfingolipídios e colesterol, é tradicionalmente baseada na sua extração, através do tratamento de células ou de membranas celulares com o detergente não-iônico TX-100 à 4°C. Esse tratamento resulta na geração de estruturas conhecidas como membranas resistentes a detergente (DRMs). Brown & Rose (1992) relataram o primeiro trabalho onde esfingolipídios e proteínas ancoradas ao GPI presentes em membranas de células epiteliais, insolúveis ao tratamento com TX-100 à 4°C e foram separadas por apresentar baixa densidade após ultracentrifugação em gradiente de sacarose.

Essas frações resistentes apresentam baixa densidade (aproximadamente 1,09-1,12 g/mL) devido à maior massa de lipídios em relação às proteínas, diferentemente do encontrado na membrana intacta (Brown & Rose, 1992; Hope & Pike, 1996; Locke et al., 2005). Outros detergentes, além do TX-100, também têm sido utilizados para isolar DRMs, tais como colato de sódio, CHAPS, Tween-20, pluronic F-127, Brij 96, Brij 98, Brij 58, Lubrol WX e C₁₂E₈ (Schuck et al., 2003; Delaunay et al., 2008; Crepaldi Domingues et al., 2009; Jakop et al., 2009; Waugh & Hsuan, 2009; Domingues et al., 2010).

Em relação a sua constituição, DRMs são geralmente pobres em proteínas transmembranares que apresentam α -hélices hidrofóbicas, mas são enriquecidas em proteínas ancoradas ao GPI, alguns receptores transmembranares e canais (Benting et al., 1999; Moffett et al., 2000; Ridyard & Robbins, 2003), além de proteínas aciladas por ácido mirístico e ácido palmítico (Luna et al., 2005). Portanto, flotilinas que são proteínas miristoiladas e multiplamente palmitoiladas (Neumann-Giesen et al., 2004) são frequentemente encontradas em DRMs de diferentes membranas plasmáticas (Ciana et al., 2005; Pike et al., 2005; Delaunay et al., 2008; Crepaldi Domingues et al., 2009). Já entre as proteínas transmembranares comumente excluídas das DRMs encontram-se algumas tirosina fosfatases (Janes et al., 1999; Young et al., 2005).

Estudos com membranas modelo demonstraram que a detecção de domínios na fase L_o após tratamento de determinadas misturas de lipídios ricas em colesterol com TX-100 somente é possível quando essas misturas já apresentavam domínios na fase L_o , antes da ação do detergente (Ahmed et al., 1997). Já o tratamento de bicamadas lipídicas compostas de fosfolipídios, colesterol e esfingomielina, contendo domínios nas fases L_d e L_o , com TX-100 resultou na solubilização seletiva dos domínios na fase L_d e relativa preservação dos domínios na fase L_o (Dietrich et al., 2001). Outros estudos revelaram ainda que a separação das fases L_d e L_o pode ocorrer a 37°C, em misturas lipídicas com concentrações fisiológicas dos tipos de lipídios que formam essas fases (colesterol, fosfolipídios insaturados e esfingolipídios), de modo que a separação de fases seria plausível de ocorrer também em membranas biológicas (Silvius, 2003). Juntamente, esses resultados sugerem que DRMs isoladas de membranas biológicas poderiam, também, ser formadas a partir de domínios (*rafts*) pré-existentes (Brown, 2006). Além disso, a presença de proteínas em DRMs sugere que as mesmas encontram-se concentradas em microdomínios naturais nas membranas biológicas, conferindo um importante papel funcional aos *rafts* (Brown, 2006).

Baseado-se na importância que tem o colesterol na formação da fase L_o e na estabilidade de proteínas ali contidas, experimentos têm sido realizados com membranas com conteúdo reduzido (*depletadas*) de colesterol, como meio de desorganizar estruturas na fase L_o , presentes em *rafts* de membranas biológicas (Hancock, 2006). Mudanças no conteúdo de colesterol podem resultar em alterações no ambiente físico dos *rafts* remanescentes e, conseqüentemente, nos tipos de lipídios que podem particionar nesses domínios (Pike, 2004).

1.3. *Lipid rafts* versus DRMs

Embora muitos trabalhos utilizem a detecção de proteínas específicas em frações de DRMs para avaliar sua afinidade por *rafts* de membranas biológicas, ainda há muita controvérsia sobre a relação existente entre *rafts* e DRMs. O centro da polêmica é se existe relação entre a composição e estrutura de DRMs preparadas com

detergentes a 4°C e os domínios que são componentes funcionais das membranas de células vivas (Lichtenberg et al., 2005).

Existem dois aspectos principais que dão origem a essa discussão. Primeiramente o método convencional de isolamento de DRMs envolve o tratamento de membranas a 4°C por períodos de tempo relativamente longos. A temperatura é conhecida por ser o maior fator na dinâmica de lipídios e temperaturas baixas são conhecidas por provocar associações lipídio-lipídio e lipídio-proteína, que não ocorreriam *in vivo*, em temperaturas maiores. Diversos exemplos na literatura descrevem que as frações obtidas à 4°C seriam solubilizadas a 37°C (Sot et al., 2006). Além disso, mesmo membranas contendo esfingomielina e colesterol seriam solubilizados mais facilmente a baixas temperaturas devido ao fato da bicamada acomodar uma quantidade menor de monômeros do detergente antes da ruptura e formação de micelas mistas (lipídio-detergente) (Sot et al., 2002). Segundo Heerklotz (2002), o detergente usado para obtenção de DRMs poderia estar criando domínios e causando a mistura e retenção de proteínas e lipídios, independentemente da sua afinidade por ambientes ordenados. Sabe-se que existe uma forte tendência do TX-100 solubilizar seletivamente fosfolipídios presentes na monocamada externa da membrana celular, podendo ser esta a razão da fusão de domínios enriquecidos em esfingolipídios e colesterol (Koumanov et al., 2005; Lichtenberg et al., 2005; Ingelmo-Torres et al., 2009), nos *rafts*.

Lichtenberg e cols. (2005) descreveram aspectos do fenômeno da resistência de componentes da membrana à detergentes e concluíram que DRMs não podem ser identificadas como entidades *in vivo* (*rafts*), presentes nas membranas biológicas. De acordo com aqueles autores, DRMs seriam apenas o resultado da solubilização incompleta de membranas por detergentes e essa resistência seria determinada por fatores termodinâmicos e cinéticos; enquanto os *rafts* foram definidos como microdomínios transientes de membrana, existentes *in vivo* e constituídos, principalmente, de esfingolipídios e colesterol. Neste raciocínio, a presença de uma determinada molécula em DRMs não necessariamente significaria sua localização em

rafts. De qualquer maneira, segundo esses autores, a tendência de uma molécula em se inserir em DRMs pode ocorrer por diversas razões como: preferência por um ambiente de membrana mais organizado; interação preferencial com o colesterol ou glicolipídios; ou favorecimento da formação de uma região de maior compactação na membrana (Lichtenberg et al., 2005), o que também determinam a composição dos *rafts*. Outras limitações atribuídas às DRMs se baseiam na definição do tamanho, propriedades e dinâmica de microdomínios existentes nas membranas biológicas, uma vez que para a formação das DRMs se emprega a ruptura da membrana, sob condições pré-determinadas (uso de detergente e baixa temperatura).

Nos últimos anos, porém, algumas estratégias diferentes da usual têm sido adotadas no intuito de isolar frações de membrana (domínios) na ausência de artefatos. Uma delas é o tratamento de membranas com detergente a 37°C, o que evitaria mudanças de fase dependentes de temperatura e garantiria que as membranas permanecessem em temperatura fisiológica (Drevot et al., 2002; Chen et al., 2009b; Domingues et al., 2010) durante a solubilização.

Outros métodos, ainda, evitam o uso de detergentes por completo. Porém, esses métodos não estão excluídos das críticas associadas aos tratamentos a baixa temperatura. Normalmente, esses métodos dependem de irradiação ultra-sônica, sempre realizada a baixas temperaturas, sendo que o tratamento de ultra-som em si tem conseqüências ainda não totalmente conhecidas sobre os componentes da membrana (Kim et al., 2009). Para isolar microdomínios de membranas ricos em caveolina na ausência de detergentes, Song et al. (1996) descreveram o uso de carbonato de sódio em suas preparações com células renais de cães - MDCK (*Madin-Darby canine kidney*), enquanto Smart et al. (1995), a partir de células de fibroblastos humanos, utilizaram um método de preparação consistindo de um processo de purificação em duas etapas, baseado na densidade dessas estruturas em gradiente de OptiPrep (solução de iodixanol - relativamente inerte do ponto de vista osmótico e empregado na separação de organelas celulares) em substituição ao gradiente de sacarose; em ambos os processos as membranas foram sonicadas para obtenção de

pequenos fragmentos, antes da separação por centrifugação em gradiente de densidade. Curiosamente, as frações de baixa densidade (supostamente *rafts*) obtidas por esses métodos revelaram também ser enriquecidas em esfingolipídios e colesterol, em relação às membranas originais. No entanto, diferentemente das frações obtidas com uso de detergentes, essas frações de membrana não se mostraram com menor conteúdo de glicerofosfolipídios (Pike, 2004). Um método mais simples e que também utiliza OptiPrep na ausência de detergente foi descrito por Macdonald & Pike (2005) para membranas de diferentes tipos celulares (células de ovário de hamster chinês, células HeLa, e células tumorais MDA-231 de mama). De acordo com esses autores, o ponto crítico da preparação foi à remoção do quelante de cálcio EDTA (conhecido por alterar a distribuição de proteínas em DRMs) e a inclusão de cátions de sódio e magnésio nos tampões de lavagem e lise das membranas, a fim de promover um ambiente catiônico semelhante ao fisiológico encontrado no citoplasma dessas células e, assim, preservar a estabilidade da bicamada. Outra técnica alternativa é o isolamento de frações de membrana através de qualquer método que não utilize detergentes, seguido do imunoisolamento que se caracteriza pelo uso de anticorpos, tais como anti-flotilina, anti-caveolina e outras proteínas marcadoras de *rafts*, naquelas frações de membrana purificadas (Pike, 2006; Shah & Sehgal, 2007), permitindo um maior detalhamento do microambiente associado a essas proteínas específicas, considerando a existência de possíveis subgrupos dos *rafts*.

Considerando que diferentes metodologias de isolamento de domínios de membrana podem resultar em diferentes composições destes, Pike (2004) propôs que os *rafts* devem ser definidos pelas suas funções e não pelo método pelo qual são isolados das membranas biológicas. Ainda de acordo com aquela autora, a utilização do termo DRMs como definição operacional dos *rafts* deve ser evitado. Esta definição operacional é bastante difusa nos dias atuais, uma vez que muitos pesquisadores lançam mão dessa propriedade das membranas de resistência a detergentes (em baixa temperatura) para caracterização bioquímica dos *rafts*.

Considerando-se então as definições para *rafts* e as limitações existentes nas metodologias empregadas para seu isolamento e identificação, é evidente a dificuldade de estabelecer uma correlação entre os microdomínios detectados por diferentes técnicas, explicando assim o motivo pelo qual aspectos bioquímicos e biofísicos destes microdomínios tem sido alvo de tantos debates na literatura. No campo da biofísica, as técnicas espectroscópicas mais utilizadas para estudo dos *rafts* e DRMs são: fluorescência (supressão, microscopia, transferência de energia de ressonância de fluorescência-TERF, espectroscopia de correlação de fluorescência) (Glebov & Nichols, 2004; Sharma et al., 2004; Hess et al., 2005; Kahya, 2006; He & Marguet, 2010; Mikhalyov & Samsonov, 2011), ressonância paramagnética eletrônica, EPR (Rivas & Gennaro, 2003; Subczynski & Kusumi, 2003; Domingues, 2009; Domingues et al., 2010), ressonância magnética nuclear, RMN (Polozov & Gawrisch, 2004; Veatch et al., 2004), microscopia de força atômica, MFA (Garcia-Manyes & Sanz, 2010; Giocondi et al., 2010), *single-particle tracking*, SPT (Lommerse et al., 2004; Douglass & Vale, 2005; Jin & Verkman, 2007) e *optical trapping* (Pralle et al., 2000).

Técnicas biofísicas juntamente com técnicas bioquímicas permitem a caracterização desses microdomínios. Algumas dessas técnicas permitiram detectar o tamanho dos *rafts* em membranas intactas (tabela 1). No entanto, o tamanho dos *rafts* ainda é motivo de controvérsias, por isso muitos estudos estão em andamento para elucidar o tamanho, forma e tempo de vida.

Análises proteômicas feitas em microdomínios isolados com e sem detergentes revelaram que as DRMs apresentam uma menor diversidade protéica apresentando material bastante puro para análise proteômica, com grande quantidade de proteínas dependentes de colesterol e proteínas envolvidas na sinalização e tráfego celular, onde se incluem as proteínas G, tirosinas quinases e proteínas fosfatases (Foster et al., 2003; Stanislas et al., 2009; Zheng & Foster, 2009). Outras proteínas consideradas como marcadoras de *lipid rafts* como flotilina, caveolina e âncoras-GPI também são observadas em análises proteômicas e *western blotting* de DRMs.

Tabela 1. Distribuição de tamanhos de *rafts* determinados por várias técnicas bioquímicas e biofísicas em diferentes membranas modelo e biológicas.

Membrana	Método de detecção	Tamanho (nm)	Referência
RBL ^a	Imunodeteção (Thy-1)	<100nm	Wilson et al., 2000
Fibroblastos	TERF	6-900nm	Hess et al., 2005
CHO ^b	TERF	4-5nm	Sharma et al., 2004
Levedura	Confocal	~300nm	Malínská et al., 2003
<i>Jurkat T-cell</i>	SPT	<250nm	Douglass & Vale, 2005
<i>3T3 cells</i>	SPT	~200nm	Lommerse et al., 2004

^a Rat basophilic leukaemia^b Chinese hamster ovary

1.4. Membrana Eritrocitária

O eritrócito é um bom modelo para estudo de membrana celular porque ele é uma célula de fácil obtenção, em grande quantidade, não contém núcleo nem organelas internas e a desestabilização da estrutura de sua membrana é facilmente monitorada pela liberação da hemoglobina intracelular (Malheiros et al., 2004). Por todas essas características, o eritrócito tem sido extensivamente estudado e é uma das células mais bem conhecidas em termos de estrutura, função e genética.

Eritrócitos humanos são células bicôncavas discóides com diâmetro de aproximadamente 8 μm , superfície da área cerca de 140 μm^2 e um volume de 100 μm^3 . Seu tempo de vida médio é de 120 dias na circulação sanguínea e o excesso da área da superfície do eritrócito juntamente com a elasticidade de sua membrana, conferem a flexibilidade necessária para essas células passarem pelos capilares sinusóides, de dimensões inferiores a delas (Chasis & Shohet, 1987; Maier et al., 2009). Essas propriedades dinâmicas da membrana do eritrócito se dão devido à existência de sua rede protéica submembranar, o citoesqueleto (Maier et al., 2009).

De fato, os primeiros relatos do uso de eritrócitos para estudo das propriedades de inchamento e plasmólise de membranas datam da segunda metade do séc. XIX. Um importante trabalho a citar é o de Gorter & Grendel (1925) que, ao calcularem a área de uma monocamada contendo lipídios extraídos de eritrócitos e dividí-la pela área da superfície dos eritrócitos (calculada a partir do diâmetro destas) chegaram a uma razão

de ca. 2, o que lhes permitiu concluir que as membranas eram formadas por uma bicamada de lipídios (Datta, 1987).

A membrana do eritrócito é facilmente isolada e apesar de tratar-se de uma célula simples, a distribuição lipídica e protéica da membrana é bastante complexa. Além de isolar o conteúdo celular do meio exterior, a membrana do eritrócito regula concentrações intracelulares de íons e interage com o ambiente via receptores de membrana (Low et al., 2002). Devido a sua resistência mecânica e flexibilidade, a membrana plasmática permite ao eritrócito percorrer o sistema vascular enquanto mantém sua forma bicôncava, que propicia máxima troca gasosa. O nível intracelular de ATP regula as propriedades dinâmicas da membrana (Salzer et al., 2008) e sabe-se que, durante seu tempo de vida na circulação a membrana eritrocitária sofre alterações no seu conteúdo lipídico e protéico, o que modifica sua fluidez, atividade enzimática, permeabilidade iônica e tamanho.

A membrana eritrocitária é constituída de uma bicamada lipídica que contém várias proteínas integrais, uma rede protéica (citoesqueleto) e uma pequena porção de carboidratos ligados às proteínas e aos lipídios. A proporção, em peso, de proteínas:lipídios:carboidratos na membrana eritrocitária é 49:43:8 (Montgomery, 1994). Os fosfolipídios compõem a principal classe de lipídios da membrana eritrocitária, englobando glicero e esfingolipídios (65%), além de glicolipídios (10%) e colesterol (25%) (Storch & Kleinfeld, 1985). Dentre os fosfolipídios, os mais encontrados na membrana eritrocitária humana são PC (29 mol%), SM (27 mol%), PE (26 mol%), PS (17 mol%) e PI (2 mol%) (Leidl et al., 2008). Esses fosfolipídios se arranjam assimetricamente pela bicamada lipídica. A distribuição assimétrica nas monocamadas interna e externa da membrana eritrocitária é absoluta para a PS com todas suas moléculas localizadas na camada interna; de maneira semelhante, a maioria das moléculas de PE se situa preferencialmente na monocamada interna. Por outro lado a PC e a esfingomielina localizam-se, preferencialmente, na monocamada externa (Connor et al., 1990). A manutenção da distribuição assimétrica dos fosfolipídios, em particular de PS na monocamada interna, tem diversas implicações funcionais. A

restrição de PS na monocamada interna inibe a adesão das células vermelhas nas células endoteliais vasculares, garantindo livre trânsito pela microvasculatura e a perda da assimetria, que leva a exposição de PS na monocamada externa, desempenha um papel na prematura destruição dos glóbulos vermelhos por macrófagos (Mohandas & Gallagher, 2008)

As proteínas da membrana eritrocitária também são bastante abundantes e a relação em massa proteína:lipídio é cerca de 1:1 (Cooper, 1997). Entre os 500 *spots* protéicos já detectados por eletroforese bidimensional em membranas de eritrócitos, 59 polipeptídios diferentes já foram identificados ao lado de suas 43 isoformas (Low et al., 2002). Essas proteínas, juntamente com aquelas identificadas exclusivamente por eletroforese monodimensional (SDS-PAGE), totalizam um número estimado em 84 proteínas associadas à membrana do eritrócito, o que corresponderia a cerca de 30% do número total de proteínas presentes no eritrócito (Low et al., 2002).

As proteínas integrais interagem com os lipídios da membrana através de suas porções hidrofóbicas, que penetram ou atravessam a bicamada lipídica. Entre as proteínas integrais do eritrócito se destacam: a banda 3 (proteína transportadora de íons) e as glicoforinas, que possuem receptores de membrana e antígenos e que participam do reconhecimento célula-célula na face externa da membrana. Já as proteínas periféricas (principalmente espectrina, actina, proteína 4.1 e 4.9) formam o citoesqueleto eritrocitário, um extenso retículo submembranar que é responsável pela forma bicôncava do eritrócito e pela organização dos componentes da membrana, representando 60% da massa protéica desta (Murador & Deffune, 2007), pela durabilidade e pela deformabilidade sem causar fragmentação celular (Maier et al., 2009). As proteínas que compõem o citoesqueleto interagem entre si e com certas proteínas integrais da membrana do eritrócito (Figura 3).

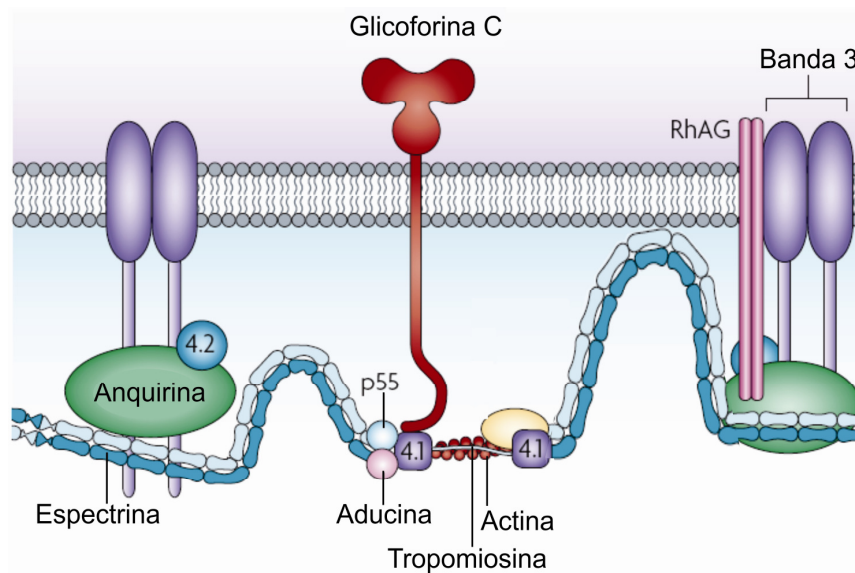


Figura 3. Representação da membrana plasmática e do citoesqueleto de eritrócitos. A cabeças dos dímeros da espectrina são unidos para formar tetrâmeros e suas caudas formam complexos com actina que são estabilizados pela proteína 4.1 e outras moléculas. Interações verticais conectam o citoesqueleto à bicamada lipídica através do complexo banda 3-anquirina-espectrina, entre o complexo proteína 4.1-p55-glicoforina C e entre a espectrina e a bicamada lipídica (esquema adaptado de Maier et al., 2009).

Abaixo segue uma breve descrição das principais proteínas integrais e periféricas que constituem a membrana eritrocitária.

Proteínas integrais

- **Banda 3:** é a glicoproteína integral mais abundante, representando 25-30% de todas as proteínas da membrana com 10^6 cópias por eritrócito. Seu nome vem da separação eletroforética em SDS-PAGE e sua função principal é mediar a troca de íons cloreto e bicarbonato através da membrana, além de contribuir na manutenção da morfologia eritrocitária. A banda 3 é constituída de três domínios: o domínio transmembranar de 52 kDa que atravessa de 12 a 13 vezes a bicamada lipídica; o domínio citoplasmático N-terminal, que é responsável pela interação com a proteína 4.1, 4.2, anquirina, enzimas da via glicolítica e desoxihemoglobina, através de seus resíduos carregados negativamente; e o domínio citoplasmático C-terminal que se liga à anidrase carbônica II. Além da banda 3 contribuir para a interação da bicamada com o citoesqueleto, ela tem um importante papel na eficiência do

transporte de gases respiratórios (Mandal et al., 2003; Daniels, 2007). Na presença de água, a anidrase carbônica II hidrata o dióxido de carbono (CO_2) formando HCO_3^- e H^+ . A banda 3, num antiporte, transfere os íons HCO_3^- em troca de Cl^- . O próton interage com hemoglobina promovendo a liberação de O_2 para as células. Como o HCO_3^- é mais solúvel que o CO_2 , esse processo auxilia a liberação de O_2 aos tecidos, com o processo inverso ocorrendo nos pulmões (Mairhofer et al., 2009).

- Glicoforinas: são glicoproteínas que apresentam um único domínio transmembranar e são divididas em 4 tipos, designadas pelas abreviações GPA, GPB, GPC e GPD. Elas apresentam um domínio externo, onde estão os oligossacarídeos, um segmento incluído no interior da bicamada e um segmento interno citoplasmático. A GPA, o principal tipo de glicoproteína, é a maior sialoglicoproteína e corresponde a 2-4% das proteínas dessa membrana, além de ser a segunda proteína integral mais abundante. Sua alta concentração nos eritrócitos é responsável por 80% da carga negativa destas células, devida ao ácido siálico presente em sua constituição. Essa superfície externa negativa ajuda a minimizar a interação célula-célula e a prevenir a aglutinação eritrocitária (Murador & Deffune, 2007). A GPC é responsável por um dos pontos de ancoramento entre o citoesqueleto e a membrana plasmática. As outras glicoforinas se encontram em pequenas quantidades e não possuem uma caracterização bem definida.

Além da banda 3 e das glicoforinas, outras proteínas integrais como receptores hormonais como o da insulina e o transportador da glicose (banda 4.5) estão presentes em concentração significativa na membrana eritrocitária (Low et al., 2002; Daniels, 2007).

Proteínas do citoesqueleto

- Espectrina: é a proteína mais importante do citoesqueleto apresentando 10^5 cópias por eritrócito. A espectrina apresenta papel fundamental no formato e deformabilidade do eritrócito. É uma proteína longa e fibrilar constituída por duas

cadeias polipeptídicas α (280 kDa) e β (246 kDa). Fisiologicamente a espectrina se encontra na forma de tetrâmero sendo que a interação dos dímeros ocorre pela região N-terminal de uma cadeia α que faceia a região C-terminal de uma cadeia β do dímero oposto (Mandal et al., 2003). Outras proteínas do citoesqueleto como a anquirina, actina e proteína 4.1 se associam à espectrina (Figura 3). Filamentos de espectrina são ligados a actina em pontos de junção; a anquirina faz a ligação da espectrina com membrana (Czogalla & Sikorski, 2010). A espectrina também se liga a alguns aminofosfolipídios, incluindo fosfatidilserina e esse ligação é responsável por modular a estabilidade da membrana (Baines, 2010). Uma menor parte de espectrinas β é palmitoilada, o que parece reforçar sua ligação com a membrana (Baines, 2010).

- Anquirina: também conhecida por sindeína, a anquirina representa a banda 2.1 no perfil eletroforético de membranas de eritrócito; ela possui 210 kDa e apresenta o mesmo número de cópias que a espectrina (10^5 cópias por célula). As anquirinas formam o principal elo entre proteínas transmembranares e proteínas do citoesqueleto. Possui três domínios estruturais, sendo um domínio ligado à subunidade β da espectrina, um segundo domínio que interage com proteínas transmembranares e um domínio regulador que controla a função dos outros dois domínios (Murador & Deffune, 2007). A anquirina pode se ligar a inúmeras proteínas transmembranares incluindo a banda 3. Mais recentemente foi descoberto que essa proteína liga-se ao complexo Rh, onde provavelmente funciona como um transportador para pequenas substâncias neutras (Baines, 2010). É essencial que a anquirina permaneça em contato com a espectrina durante os processos celulares normais, e defeitos nessa ligação dão origem a uma variedade de patologias, como se vê em doenças hereditárias como a doença hemolítica e arritmia cardíaca (Czogalla & Sikorski, 2010).
- Proteína 4.1: também chamada como 4.1R por ser abundante nos eritrócitos, está presente numericamente em 2×10^5 cópias por célula e possui 80 kDa. No perfil

eletroforético a 4.1 aparece como 2 bandas com pesos moleculares bastante próximos, conhecidas como forma a e b. O maior ponto de ligação da proteína 4.1 na membrana eritrocitária é com as GPC e GPD. Uma das principais proteínas do citoesqueleto, essa proteína contribui na manutenção e modulação da morfologia do eritrócito, bem como com as propriedades mecânicas da membrana, através das suas múltiplas ligações com outras proteínas do citoesqueleto (espectrina, actina, p55) e proteínas transmembranares (banda 3 e GPC) (Baines, 2010).

- Actina: essa proteína corresponde à banda 5 no perfil eletroforético e se encontra ligada à espectrina e à proteína 4.1. Forma um complexo juncional com proteína 4.1, aducina e tropomiosina, favorecendo sua ligação com a espectrina (Figura 3) (Murador & Deffune, 2007).

1.5. Membrana do eritrócito e suas frações resistentes a detergentes

Embora *lipid rafts* e DRMs de diferentes tipos celulares tenham sido bastante descritos nas últimas duas décadas, somente nos últimos anos DRMs de eritrócitos foram isoladas e caracterizadas. Nesses trabalhos, há ainda muita divergência sobre a composição proteica e lipídica dessas estruturas (Salzer & Prohaska, 2001; Samuel et al., 2001; Ciana et al., 2005; Kamata et al., 2008).

No entanto, se retomarmos aos trabalhos da década de 70 (Yu et al., 1973; Sheetz & Singer, 1974), veremos que as frações da membrana eritrocitária resistentes a detergente não iônicos já eram conhecidas desde aquela época. Porém, as frações isoladas até então eram ricas em proteínas do citoesqueleto e, portanto, apresentavam alta densidade sendo conhecidas como "*triton shell*". Pode-se dizer então, que aquelas frações ("*triton shell*"), também ricas em esfingolipídios, foram as precursoras do que depois chamaríamos de *DRMs*.

A composição protéica em DRMs de eritrócitos, descrita por Salzer & Prohaska (2001), revelou que a flotilina-1 e 2 e estomatina são as principais proteínas integrais dessas DRMs, enquanto outras proteínas como espectrina, actina, proteína 4.1 e

proteína 4.2 foram encontradas parcialmente associadas às DRMs. De fato, as proteínas flotilina, estomatina, Gs α , proteínas ligadas ao glicosilfosfatidilinositol, além do gangliosídeo GM1 têm sido usadas como marcadores da presença de *rafts*/DRMs em eritrócitos (Salzer & Prohaska, 2001; Ciana et al., 2005; Kamata et al., 2008; Mrówczyńska et al., 2010). No entanto, vários estudos demonstraram que a concentração e o tipo de detergente utilizado resultam em variações qualitativas e quantitativas nas proteínas de DRMs (Schuck et al., 2003; Murphy et al., 2004; Crepaldi Domingues et al., 2009; Domingues et al., 2010).

Embora a espectrina seja observada em DRMs de eritrócitos e de outros tipos celulares, sua presença em DRMs ainda é bastante discutida. Particularmente para eritrócitos, sua associação a DRMs pode depender da concentração do detergente empregado, do pH e da concentração de proteína na amostra inicial (Ciana et al., 2005; Murphy et al., 2007). De acordo com os resultados de Ciana et al. (2005) grande parte das frações de DRMs enriquecidas pelos marcadores de *lipid rafts*, como flotilina-2 e GM1, está ancorada ao citoesqueleto eritrocitário através de interações eletrostáticas que podem ser rompidas pelo aumento simultâneo de pH e força iônica do meio de solubilização. Esta associação de DRMs com proteínas do citoesqueleto também foi encontrada por nós em DRMs de eritrócito, utilizando o detergente C₁₂E₈ (Crepaldi Domingues et al., 2009). No entanto, nenhum modelo experimental mais consistente foi proposto para explicar essa associação de DRMs e/ou *rafts* com o citoesqueleto. Um achado bastante interessante foi o estudo publicado por Ciana e cols. (2011) que demonstraram variabilidade da composição protéica, particularmente da espectrina, ocorre em DRMs de eritrócitos quando existe contaminação das preparações por leucócitos na suspensão de células submetidas à ação de detergente. Dessa forma, alguns procedimentos metodológicos se fazem indispensáveis para prevenir a ação proteolítica na organização supramolecular encontrada no citoesqueleto eritrocitário.

Duas proteínas são frequentemente encontradas em DRMs de eritrócitos: flotilinas e estomatina.

As flotilinas, divididas em flotilina-1 e -2, são também conhecidas por reggie-2 e -1, respectivamente. O nome flotilina é devido a sua flotação em gradientes de sacarose, estando associadas as DRMs. Essas proteínas apresentam peso molecular de 47 kDa e pertencem à família das proteínas SPFH (S = *Stomatin*; P = *Prohibiting*; F = *Flotillin*; H = HflK/C - proteínas bacterianas) apresentando um domínio de sequência comum (SPFH) na região N-terminal (Langhorst et al., 2005). Encontradas principalmente na membrana plasmática, essas proteínas não possuem domínio transmembranar e tanto a região C- quanto a N-terminal faceiam o citossol (Morrow & Parton, 2005). A inserção das flotilinas na monocamada interna das membranas se dá através de acilação nos seus grupos N-terminais. Enquanto a flotilina-2 é miristoilada e palmitoilada, a flotilina-1 é apenas palmitoilada (Neumann-Giesen et al., 2004). A estrutura tridimensional do domínio SPFH da flotilina-2, encontrada no banco de dados PDB (Protein Data Bank - código de acesso = 1win) revela uma estrutura compacta e elipsóide-globular. Em relação à região C-terminal da flotilina-2 sabe-se que ela é essencial para a formação de homo e hetero-oligômeros (Neumann-Giesen et al., 2004). Devido ao fato de a flotilina-2 ser irreversivelmente miristoilada e, portanto, apresentar menor mobilidade em relação à flotilina-1 (que é reversivelmente palmitoilada e mais versátil em termos de transição entre a membrana plasmática e várias organelas intracelulares) ela tem sido mais utilizada como um marcador de *rafts* do que a sua análoga flotilina-1 (Langhorst et al., 2008). Alguns estudos indicam o envolvimento dessas proteínas em várias vias de transdução de sinal, no tráfego de vesículas e no rearranjo do citoesqueleto. Além disso, muitas proteínas interagem com as flotilinas (Langhorst et al., 2005; Langhorst et al., 2008). Em eritrócito, particularmente, a função dessas proteínas é desconhecida.

A estomatina, assim como as flotilinas, não está presente exclusivamente em eritrócitos, como se pensava no início dos anos 90. A estomatina é uma proteína integral (100.000 cópias/célula), possui peso molecular de 31 kDa e compõe a banda 7 (7.2b) de acordo com sua mobilidade eletroforética em amostras de membranas isoladas de eritrócitos (código de acesso ao PDB = 3bk6). É uma proteína oligomérica,

palmitoilada, que se liga ao colesterol da membrana e, por isso, ela é associada com os *lipid rafts* (Simons & Vaz, 2004) ou com as DRMs (Crepaldi Domingues et al., 2009; Domingues et al., 2010) servindo como marcador dessas estruturas. Essa proteína possui as regiões N- e C-terminal faceando o citoplasma, enquanto sua associação com a membrana se faz por palmitoilação. Além disso, o domínio hidrofóbico da estomatina está inserido apenas na monocamada interna da membrana (Mairhofer et al., 2009). Embora a função dessa proteína seja ainda alvo de investigação, estudos demonstraram seu envolvimento no controle da permeabilidade de canais iônicos e organização de domínios lipídicos (Mairhofer et al., 2009). Curiosamente, a estomatina troca a especificidade do GLUT-1 por glicose pelo o ácido ascórbico, aumentando assim a reciclagem de vitamina C e compensando a incapacidade humana de sintetizá-la (Montel-Hagen et al., 2008).

Considerando a associação de processos patológicos e *rafts*, estudos têm demonstrado que os *rafts* da membrana do eritrócito podem estar envolvidos com o processo de invasão celular pelo parasita causador da malária, *Plasmodium falciparum* (Samuel et al., 2001; Murphy et al., 2004; Murphy et al., 2007). Samuel e cols. (2001) demonstraram que o tratamento das membranas dos eritrócitos com M β CD inibi a infecção pelo parasita e a ausência de proteínas ancoradas por GPI não afeta a infecção, concluindo que a infecção pelo parasita é mais dependente da fase lipídica do que de proteínas específicas do *rafts*. Além disso, um estudo recente demonstrou que o anestésico local lidocaína interage com *rafts* de eritrócitos e, dessa forma, inibe a infecção pelo parasita da malária (Koshino & Takakuwa, 2009).

2. Detergentes e solubilização de membranas eritrocitárias

Detergentes ou surfatantes são moléculas anfifílicas, com uma porção hidrofóbica e uma porção hidrofílica. Em virtude desta anfipaticidade, os detergentes possuem a capacidade de se agregar, mostrando sua porção hidrofóbica para o ar ou para a fase apolar, enquanto expõem sua porção polar para o meio aquoso. Moléculas com propriedades tensoativas incluem os detergentes sintéticos e compostos

fisiológicos tais como sais biliares, lisofosfolípidios, alguns peptídios e outros compostos anfifílicos.

De acordo com a natureza do grupamento hidrofílico dos detergentes, eles podem ser classificados como não-iônicos, iônicos e zwitteriônicos. Os detergentes não-iônicos TX-100, Brij 98 e Brij 58, apresentam uma cauda hidrofóbica, consistindo de uma cadeia hidrocarbonada, e uma cabeça hidrofílica consistindo de várias unidades de grupos polioxietileno (Figura 4). No caso do TX-100, um anel benzênico une as porções hidrofóbicas e hidrofílicas da molécula.

Os detergentes não iônicos têm sido utilizados em aplicações farmacêuticas, bioquímicas e químicas com grande enfoque na solubilização de membranas biológicas e modelo. Os detergentes da série Brij, particularmente, têm sido empregados em sistemas de liberação controlada de fármacos (Kapoor & Chauhan, 2008), como facilitadores da biodegradação por contaminantes de diesel (Franzetti et al., 2008), em nanopartículas dependentes de pH (Filippov et al., 2008) e têm sido considerado os mais adequados na síntese de proteínas integrais de membrana em processos artificiais em escala, de expressão independente de células (Klammt et al., 2005).

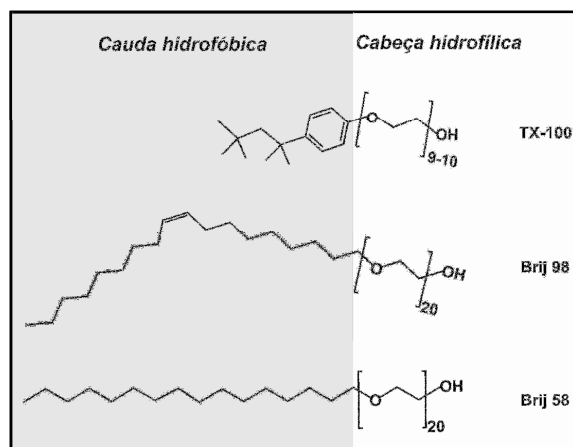


Figura 4. Estrutura dos detergentes TX-100 (polioxietileno glicol terc-octilfenil éter), Brij 98 (polioxietileno 20-oleil éter, C₂₀E_{18:1}) e Brij 58 (polioxietileno 20-cetil éter, C₂₀E_{16:0}).

2.1. Propriedades físico-químicas dos detergentes

A natureza anfifílica dos detergentes não-iônicos pode ser expressa em termos do balanço entre o grupo hidrofóbico e hidrofílico da molécula (HLB). De acordo com a escala empírica proposta por Griffin (1949) quanto menor o valor de HLB mais lipofílico é o composto e quanto maior o número, mais hidrofílico, sendo, o composto, definido pela razão molar da fase hidrofílica/lipofílica $\times 20$ (levando a uma escala de valores de 0 a 20).

Em solução aquosa, os grupos polares dos detergentes não iônicos formam pontes de hidrogênio com moléculas de água, enquanto sua fração apolar se agrega devido a interações hidrofóbicas. Essa propriedade permite que o detergente seja solúvel em água. Em solução, as moléculas formam agregados esféricos, cilíndricos ou discóides organizados, chamados de micelas.

A estreita faixa de concentração em que as primeiras micelas são formadas é chamada de concentração micelar crítica (CMC). A agregação em micelas é um evento que ocorre abruptamente e as moléculas de detergentes adicionadas a uma solução que já se encontra na sua CMC são incorporadas nas micelas. No entanto, a ideia de formação de micelas como um processo abrupto é um conceito que não pode ser generalizado, já que vários trabalhos têm descrito a formação de agregados pré-micelares, durante o processo de solubilização de alguns detergentes (Schreier et al., 1978; Schreier et al., 2000; Sowmiya et al., 2010).

Outro parâmetro utilizado para descrever o processo de agregação dos detergentes é o número de agregação, que descreve o número de moléculas de detergentes contidas numa única micela e que pode ser obtido pela razão da massa molecular micelar/massa molecular monomérica do detergente.

A tabela 2 descreve algumas propriedades físico-químicas dos detergentes estudados nesse trabalho.

Tabela 2. Propriedades físico-químicas dos detergentes* (massa molecular – MM; balanço hidrofílico/lipofílico – HLB; concentração micelar crítica – CMC).

DETERGENTE	MM	HLB	CMC (M)	Nº de Agregação
TX-100 (polioxietileno glicol terc-otilfenil éter)	625	13,5	$2,5 \cdot 10^{-4}$	100-155
Brij 98 (polioxietileno 20-oleil éter)	1150	15,3	$2,5 \cdot 10^{-5}$	-----
Brij 58 (polioxietileno 20-cetil éter)	1128	15,7	$7,7 \cdot 10^{-5}$	70

*Hait e Moulik (2001).

2.2. Quantificação do efeito hemolítico

Conhecer a interação dos detergentes com membranas biológicas é muito importante para definir possíveis aplicações dessas moléculas. Geralmente, os detergentes não iônicos como os polioxietilenos são utilizados como agentes solubilizadores de membrana para evitar grandes alterações estruturais em proteínas que se deseja purificar, uma vez que possuem um baixo efeito desnaturante (le Maire et al., 2000).

A ação de detergentes clássicos em sistemas biológicos como agentes promotores de lise, extratores de componentes hidrofóbicos (proteínas e lipídios) ou ainda como solubilizadores de membrana tem sido amplamente estudada (Lichtenberg, 1985; le Maire et al., 2000; Lichtenberg et al., 2000; Preté et al., 2002a; Preté et al., 2002b; Preté et al., 2011).

Baseado na existência de uma íntima relação entre formação de micelas, partição ou constante de ligação (K_b) e efeito de ruptura de membrana (Lichtenberg, 1985; Lichtenberg et al., 2000), o produto entre a constante de ligação e a concentração micelar crítica ($K_b \cdot \text{CMC}$) foi proposto como um parâmetro para classificar os detergentes em relação ao potencial de ruptura da membrana (Heerklotz & Seelig, 2000), tal que: $K_b \cdot \text{CMC} < 1$ indica um forte agente solubilizador, enquanto que $K_b \cdot \text{CMC} > 1$ indica um fraco agente solubilizador. Outra forma de classificar os detergentes

em relação ao potencial de ruptura da membrana, proposta por nosso grupo de pesquisa, seria o uso da razão molar efetiva detergente:lipídio (R_e) necessária para solubilizar a membrana (Preté, 2006).

Em misturas contendo detergente e fosfolípidios, não ocorre a coexistência de micelas puras de detergente e bicamadas puras de fosfolípido, por uma questão entrópica (Lichtenberg et al., 2005). De fato, a mistura desses compostos anfifílicos leva à solubilização da membrana, o que pode ser descrito como um processo de transição membrana-micela, em que: 1) inicialmente monômeros do detergente particionam na bicamada; 2) membranas mistas, i.e., saturadas pela incorporação dos monômeros de detergente, coexistem em equilíbrio termodinâmico com micelas mistas (detergente-fosfolípidios/proteínas); e 3) componentes da membrana são totalmente solubilizados nas micelas do detergente (Lichtenberg et al., 2000). Dessa forma, o processo de solubilização por detergentes depende da razão molar efetiva detergente/lipídio (R_e) alcançada na membrana.

Considerando que R_e^{sat} e R_e^{sol} correspondem às razões críticas que descrevem o início e a completa solubilização da membrana, respectivamente, estes parâmetros representam o limite para a coexistência de membranas mistas e micelas mistas (Lichtenberg, 1985; Lichtenberg et al., 2000). Além da composição da membrana e do detergente utilizado, os valores de R_e^{sat} e R_e^{sol} dependem também de outros fatores como a composição da fase aquosa e a temperatura (Lichtenberg et al., 2005). Os valores de R_e^{sat} e R_e^{sol} dependem ainda da CMC do detergente e da sua partição na membrana, como demonstraram Heerklotz & Seelig (2000) e podem também ser usados para a classificação de seu efeito solubilizador, tal que detergentes com $R_e^{\text{sat}} < 1$ seriam considerados fortes e com $R_e^{\text{sat}} > 1$ fracos (Preté, 2006). A abordagem proposta por Lichtenberg aplica-se também à solubilização de membranas biológicas (Preté et al., 2002a; Preté et al., 2002b; Domingues et al., 2008) e, como mostra a Figura 5 vários equilíbrios entre o detergente (monomérico ou micelar) e componentes da membrana coexistem, durante o processo de solubilização.

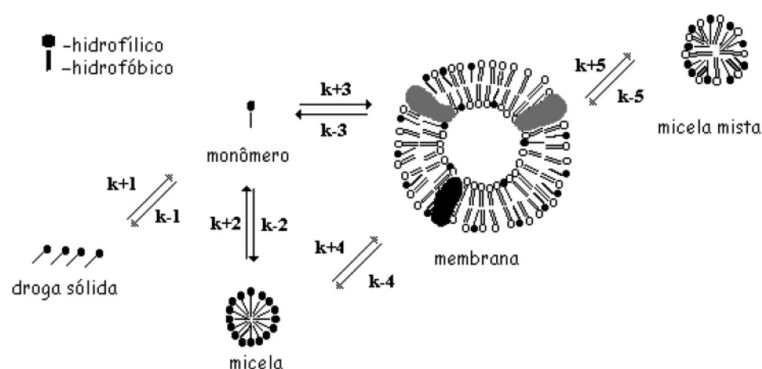


Figura 5. Esquema de possíveis eventos envolvidos na interação de detergente com membrana biológica. Os processos correspondem à: 1 - solubilização do detergente; 2 - equilíbrios entre monômero-agregado; 3 - ligação do monômero à membrana; 4 - equilíbrios do detergente entre micela-membrana. Após a saturação da membrana, moléculas do detergente saem da membrana carregando componentes da membrana (lipídios e proteínas). As constantes representam cada processo. Os prováveis eventos resultantes da interação detergente-membrana estão listados no esquema (adaptado de Schreier et al., 2000).

No caso de eritrócitos, a determinação dos valores de R_e^{sat} e R_e^{sol} é feita através de ensaios hemolíticos onde inicialmente se determina o C^{sat} e o C^{sol} (concentração de detergente necessária para início e total solubilização da membrana, respectivamente). O valor de R_e é determinado pela inflexão da reta da curva da concentração total de lipídios pela concentração de detergentes (Lichtenberg, 1985; Lichtenberg et al., 2000; Preté et al., 2002b; Malheiros et al., 2004; Domingues et al., 2008):

Os valores de R_e^{sat} e R_e^{sol} representam ainda o limite, em termos de razão detergente/lipídio, para a coexistência de membranas mistas e micelas mistas (Lichtenberg et al., 2000) como mostra a Figura 6.

De acordo com Lichtenberg (1985), os interceptos nas ordenada referente às linhas apresentadas na Figura 6 correspondem à concentração de detergente livre em água (D_w), que guardaria correlação com a CMC do detergente. Esses dados permitem, ainda, determinar a constante de ligação molar (K_b) do detergente com a membrana (Lichtenberg, 1985).

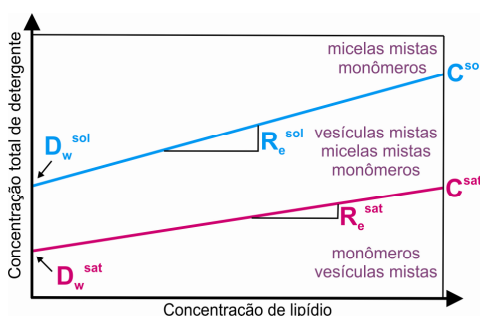


Figura 6. Esquema de um diagrama de fase de um sistema misto lipídio-detergente.

Neste estudo, o efeito dos detergentes não iônicos Brij 58 e Brij 98 sobre a membrana eritrocitária teve duas abordagens: a quantificação do efeito hemolítico e análise das frações da membrana resistentes a esses detergentes.

A obtenção de DRMs a partir de Brij 58 a 4°C tem sido descrita para diferentes tipos celulares como células Jurkat (Bini et al., 2003; Schuck et al., 2003), derivadas da leucemia/linfoma de células T do homem adulto, células MDCK (*Madin Darby canine kidney*) (Schuck et al., 2003), derivadas do epitélio do rim de cachorros, HeLa (*Henrietta Lacks*) (Locke et al., 2005) derivadas do epitélio de câncer cervical. Já o Brij 98 tem sido usado em preparações de DRMs a 37°C a partir de linfócitos e timócitos de ratos (Drevot et al., 2002; Schuck et al., 2003; Gil et al., 2006; Lenne et al., 2006), células Jurkat (Schuck et al., 2003), células MDCK (Schuck et al., 2003), membrana sinaptosomal de cérebro de rato (Sprague-Dawley) (Gil et al., 2006) e células COS-7 (*Cercopithecus aethiops, origin-defective SV-40*) (Lenne et al., 2006), derivadas do fibroblasto do rim de *Cercopithecus aethiops* (macaco verde africano). Drevot e col. (2002) postularam que a cabeça polar volumosa e a cadeia acila monoinsaturada do Brij 98 poderiam causar maior solubilização da fase fluida da membrana e deixar a fase L_o mais empacotada, em relação ao TX-100.

OBJETIVO

O objetivo desse trabalho foi compreender os mecanismos determinantes da associação entre lipídios e proteínas de membranas biológicas, que levam a separação lateral de fases (formação de domínios lipídicos ou *lipid rafts*, relacionados a diversas respostas celulares) através da caracterização de frações de membrana resistentes a detergente (DRMs) isoladas de eritrócito humano a partir do tratamento com os detergentes não-iônicos Brij 98 e Brij 58.

Objetivos específicos

- Quantificar o efeito hemolítico dos detergentes Brij 98 e Brij 58
- Quantificar a composição lipídica e protéica total de domínios da membrana eritrocitária (DRMs) obtidas com uso dos detergentes Brij 98 e Brij 58 e compará-las com aquelas de DRMs obtidas com TX-100.
- Verificar o efeito da temperatura no isolamento destas DRMs.
- Verificar a existência de proteínas marcadoras destes *rafts*.
- Caracterizar a composição lipídica destas DRMs, utilizando cromatografia de camada delgada (HPTLC) e cromatografia gasosa.
- Determinar o tamanho destas DRMs por espalhamento de luz dinâmico (DLS).
- Determinar o grau de organização destas DRMs obtidas com Brij 98 e Brij 58, através de ressonância paramagnética eletrônica, com uso de marcadores de spin.

MATERIAIS E MÉTODOS

Neste projeto utilizamos eritrócitos obtidos de sangue humano provenientes do Hemocentro da UNICAMP a partir de bolsas de concentrado de hemácias com até 7 dias de coleta e testes de sorologia negativa para chagas, sífilis, HIV, HBV e HCV. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp (parecer CEP nº 227/2009).

1. Preparo dos eritrócitos

Os eritrócitos foram ressuspensos em PBS (4 mM Na_2HPO_4 , 1mM NaH_2PO_4 , 154 mM NaCl, 4,5 mM KCl, pH 7,4) e centrifugados por 5 min a 1000 x g. Em seguida, a suspensão foi filtrada em α -celulose/celulose microcristalina para isolar os eritrócitos das plaquetas e leucócitos (Beutler et al., 1976). A suspensão de eritrócitos purificada foi lavada por 3 vezes com tampão TN (25 mM de Tris e 150mM de NaCl, pH 7,4) e o concentrado de células foi então usado para preparar DRMs.

Para obtenção de ghosts (membrana plasmática isolada do conteúdo intracelular), os eritrócitos purificados foram diluídos 1:10 v:v em tampão fosfato hipotônico (4 mM Na_2HPO_4 , 1 mM NaH_2PO_4 , 0,5 mM EDTA, 0,1 mM de inibidor de protease PMSF, pH 8,0) a 4°C, e centrifugados por 20 min a 26000 x g. O sobrenadante foi aspirado e a lavagem foi repetida por pelo menos mais 4 vezes com o mesmo procedimento, de acordo com Dodge e cols. (1963), resultando em amostras de membranas livres de hemoglobina (um contaminante comum dessas preparações). Após o isolamento das membranas, a amostra foi lavada com PBS por 2 ou 3 vezes e o conteúdo de proteínas foi determinado pelo método de Lowry modificado, através do kit colorimétrico para dosagem de proteínas compatível com detergente (Ensaio de proteína BCA - Bioagency – cód: 600-0510N). As amostras de ghosts foram utilizadas imediatamente ou congeladas a -80°C, para uso futuro.

2. Hemólise em meio isosmótico

Os eritrócitos foram ressuspensos em PBS (4 mM Na_2HPO_4 , 1mM NaH_2PO_4 , 154 mM NaCl, 4,5 mM KCl, pH 7,4) e centrifugados por 5 min a 1000 x g por 3 vezes.

MATERIAIS E MÉTODOS

Suspensões de eritrócito (hematócrito 0,15, 0,30, 0,45 e 0,60%) em tampão PBS pH 7,4 foram incubadas com diferentes concentrações dos detergentes Brij 98 e Brij 58 durante 15 min, a 37°C. Após esse tratamento as amostras foram centrifugadas durante 3 min a 10000 x g e o teor de hemoglobina foi determinado fotometricamente (412 nm).

As medidas foram feitas em triplicata, com os seguintes controles: negativo (controle de hemólise mecânica = eritrócitos em PBS 5 mM, pH 7,4) e positivo (eritrócitos em água destilada - 100% hemólise). A porcentagem de hemólise (%H) foi obtida de acordo com a equação 1:

$$\%H = \frac{(A_a - A_{cn})}{(A_{cp} - A_{cn})} \times 100 \quad \text{Equação 1}$$

onde A_a , A_{cn} e A_{cp} são respectivamente as absorbâncias das amostras e dos controles negativo e positivo respectivamente, em 412 nm (Preté et al., 2011)

A partir da porcentagem de hemólise (%H) se obtêm uma curva hemolítica para cada hematócrito testado, que nos permite calcular a concentração de detergente necessária para início (C^{sat}) e total (C^{sol}) solubilização da membrana (0 e 100% de hemólise, respectivamente) conforme indicado Figura 7.

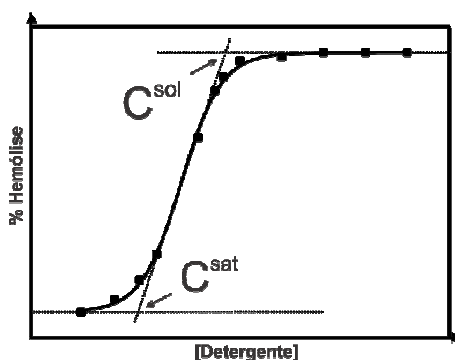


Figura 7. Determinação do C^{sat} e C^{sol} a partir da curva hemolítica. As setas indicam as concentrações para início (C^{sat}) e 100% de hemólise (C^{sol}).

Os valores de C^{sat} e C^{sol} determinados para diferentes concentrações de membrana (Ht 0,15, 0,30, 0,45 e 0,60%) foram graficados em função da concentração lipídica da membrana do eritrócito, calculados como descrito anteriormente (Malheiros

et al., 1998) permitindo a determinação do R_e , a razão molar efetiva detergente/lipídio para início (R_e^{sat}) e total hemólise (R_e^{sol}), que é dado pela inflexão da reta, de acordo com a equação 2 (Lichtenberg, 1985):

$$D_t = R_e \cdot \left[\frac{L + 1}{K_b (R_e + 1)} \right] \quad \text{Equação 2}$$

onde D_t é a concentração total de detergente (C^{sat} e C^{sol}) e L é a concentração molar de lipídios da membrana (Malheiros et al., 2000). Finalmente, a constante de ligação detergente-membrana (K_b (M^{-1})) foi calculada pela equação 3 (Lichtenberg, 1985):

$$R_e^{sat} = \frac{K_b \times D_w^{sat}}{(1 - K_b \times D_w^{sat})} \quad \text{Equação 3}$$

onde D_w^{sat} é a concentração de detergente em solução, na ausência de membrana.

3. Remoção de colesterol das membranas de eritrócito

Para depleção de colesterol os eritrócitos lavados e purificados foram ressuspensos (Ht = 20%) em 5 mM M β CD (metil- β -ciclodextrina) diluída em PBS e incubados por 30 min a 37°C. Em seguida, as células foram lavadas por 3 vezes com PBS e centrifugadas para remoção de complexos M β CD-colesterol (solubilizadas no sobrenadante). Este procedimento leva a remoção de cerca de 40% do colesterol total das células (Domingues et al., 2010).

4. Isolamento de DRMs

DRMs foram preparadas a partir de eritrócitos intactos, de acordo com protocolo anteriormente descrito (Crepaldi Domingues et al., 2009; Domingues et al., 2010) com algumas pequenas modificações. Os eritrócitos ($2,50 \times 10^9$ células) obtidos após a filtração em celulose foram lavados em tampão TN. Em seguida o concentrado de eritrócitos foi lisado no mesmo tampão TN contendo 16mM TX-100, Brij 98 ou Brij 58. Essa concentração equivale a 1% de TX-100 e a 1,8% de Brij. Depois de 30 min foi adicionado à amostra um volume igual ao seu, de uma solução de sacarose 80% contendo 0,3 M de Na₂CO₃. A amostra foi transferida para tubos de ultracentrífuga e foram adicionadas soluções de 30% e 5% de sacarose em TN, cuidadosamente sobre a mesma, de forma a se criar um gradiente não linear de sacarose. As amostras foram,

então, submetidas à centrifugação em rotor SW 41 a $288000 \times g$, por 16 h a 4°C. A incubação das células com detergente foi conduzida tanto a 4°C quanto a 37°C e os demais procedimentos foram executados a 4°C. Alíquotas da fração insolúvel, de baixa densidade, obtida após centrifugação do gradiente de sacarose foram fracionadas e imediatamente usadas ou estocadas a -80°C para uso futuro.

5. Dosagens de proteínas totais e colesterol

A quantificação protéica e de colesterol das amostras de DRMs isoladas e ghosts foram realizadas através de kits comerciais disponíveis.

A dosagem de colesterol foi realizada com auxílio de um kit de dosagem de colesterol por método enzimático (Laborlab, Brasil – cod: 01400). Este kit contém reativo padrão (solução de colesterol a 200 mg/dL), reativo enzimático (contendo lipase 300U/mL; colesterol oxidase 3 U/mL e peroxidase POD 20U/mL), reativo de cor 1 (4-aminofenazona 0.025mol/L) e reativo de cor 2 (Fenol 0,055mol/L). O peróxido de hidrogênio formado pela oxidação específica do colesterol por catálise enzimática, reage como fenol e a 4 aminofenazona é oxidada, formando a um cromóforo róseo, com absorvidade ao redor de 500 nm (Castelli, 1977).

A dosagem de proteína foi realizada com auxílio de um kit colorimétrico para dosagem de proteínas compatível com detergentes (kit ensaio de proteína BCA - Bioagency – cód: 600-0510N), que se baseia no método de Lowry modificado (Hartree, 1972). Sob condições alcalinas, a proteína reduz o cobre ($\text{Cu}^{+2} \rightarrow \text{Cu}^{+1}$); o cátion monovalente reage com duas moléculas de ácido bicínico resultando num cromóforo púrpura que absorve à 562 nm (Brown et al., 1989). Esse método é apropriado ao uso de amostras contendo detergentes não-iônicos e, para eliminar a interferência de lipídios foi adicionado 2% de SDS (Kessler & Fanestil, 1986).

6. Eletroforese em SDS-PAGE

As frações de DRMs obtidas no gradiente de sacarose foram dissociadas em 0,5 volume de tampão dissociante (Tris 50 mM pH 6,8, SDS 5%, azul de bromofenol, 0,01% EDTA, DTT 200 mM e sacarose 35%) e aquecidas por 15 min a 60°C. As amostras dissociadas (cerca de 7-15 µg de proteínas) foram aplicadas em gel de

poliacrilamida (4% *stacking* gel e 12% *resolving* gel), preparado segundo método de Laemmli (1970); em paralelo aplicou-se marcadores de pesos moleculares conhecidos. As condições de corrida foram 15 mA na fase inicial (gel 4%) e 45 mA após entrada das amostras no gel de corrida. A coloração dos géis foi feita com azul de Coomassie R-250.

7. Western Blotting

Proteínas específicas foram visualizadas pela técnica “*Western Blotting*”. Alíquotas contendo 10 µg de proteínas de ghosts e das DRMs foram dissociadas em tampão dissociante (Tris 50 mM pH 6,8, SDS 5%, azul de bromofenol, 0,01% EDTA, DTT 200 mM e sacarose 35%) e aplicadas em gel de corrida 12%. Após separação eletroforética (SDS-PAGE), as proteínas dos géis foram transferidas para membrana de fluoreto de polivinidileno (PVDF) 0,45 µm (BioRad), previamente ativada em metanol, através do sistema de *Blotting* (BioRad) aplicando-se uma corrente de 200 mA por 2 horas a 4°C em tampão de transferência (Tris 25 mM, glicina 190 mM, SDS 0,7 mM e 20% de metanol). A membrana de PVDF foi previamente ativada em metanol. Após a transferência, a membrana de PVDF foi incubada por 2 horas em solução bloqueadora TBS-T/leite (Tris 25mM, KCl 40 mM, NaCl 4 mM, pH 7,4, Tween-20 0,05%, leite em pó desnatado 5%) para diminuir a ligação inespecífica de proteínas em outros sítios da membrana. A seguir, as membranas foram incubadas com os seguintes anticorpos primários policlonais diluídos em TBS/T: anti-flotilina-2 (1:1000, BD Biosciences) e anti-estomatina (1:1000, Santa Cruz), overnight à 4°C. Após o tempo de incubação, os anticorpos primários foram removidos e a membrana foi lavada por 6 vezes de 5 min. cada uma. Em seguida as membranas foram incubadas com seus respectivos anticorpos secundário conjugado (anti-goat e anti-mouse - Healbiotech) na proporção 1:1000 em TBS-T por 1 hora. Após remoção do anticorpo secundário e 6 lavagens, de 5 min cada, as membranas foram incubadas com reagentes de quimioluminescência (Pierce) e colocadas junto a filmes radiográficos (Kodak) para auto-radiografia (Batista et al., 2011).

8. Extração dos lipídios

A extração total dos lipídios dos ghosts e DRMs foi realizada através do tratamento das amostras com clorofórmio:metanol:água (2:1:1, v/v/v) em temperatura ambiente. As amostras foram agitadas por 1 hora e depois centrifugadas durante 10 min a 10000x g. Esse procedimento foi repetido por 3 vezes. Os 3 extratos foram unificados e secos em nitrogênio.

Para extração dos lipídios dos eritrócitos íntegros e com colesterol reduzido (pós tratamento com M β CD) inicialmente as amostras foram lisadas com água (5:7, v/v). Um volume 120 μ L desse lisado foi coletado e agitado por 1 hora com isopropanol (6:33, v/v). Após agitação, foi adicionado clorofórmio, resultando numa proporção de 6:33:23 (lisado:isopropanol:clorofórmio, v/v/v) e agitado novamente, por mais 1 hora. As amostras foram centrifugadas a 1000 g/10 min e o sobrenadante (fase orgânica) foi seco em nitrogênio e colocado no vácuo por 2 horas. As amostras foram ressuspensas em 150 μ L de isopropanol para dosagem de colesterol (Rose & Oklander, 1965).

9. Cromatografia em camada delgada de alta resolução - HPTLC

A identificação e a separação dos fosfolipídios foram realizadas em placas de cromatografia em camada delgada de alta resolução, HPTLC, obtidas da J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, EUA).

As amostras de lipídios extraídos de ghosts e DRMs foram então secas e ressuspensas em 50 μ L de clorofórmio para análise dos fosfolipídios. Os componentes fosfolipídicos foram separados na placa de HPTLC usando a mistura clorofórmio:etanol:água:triethylamina (35:35:7:35, v/v/v) (Fuchs et al., 2008). Os diferentes fosfolipídios foram visualizados como bandas azuis, após borrifamento das placas com o reagente azul de molibdênio (Sigma) (Toledo et al., 1995).

A quantificação dos fosfolipídios foi feita pela análise das imagens das placas de HPTLC coradas com azul de molibdênio, comparando-as com padrões conhecidos de lipídios purificados (SM, PC, PE e PS, 1mg/mL), por densitometria das placas utilizando o programa *Scion Image Beta 4.02* (Scion Corporation) (Toledo et al., 2004).

10. Composição em ácidos graxos por cromatografia a gás (CG)

Os ácidos graxos das amostras dos lipídios extraídos por HPTLC foram analisados por cromatografia à gás após a metilação com reagente esterificante BF_3 -metanol, segundo método descrito por AOAC (1995). Em um tubo de ensaio contendo os fosfolipídios foram adicionados 2 mL de solução 0,5M de NaOH em metanol. O tubo, fechado, foi submetido a banho de água fervente por aproximadamente 5 minutos e após resfriamento em água corrente, foi adicionado à mistura 2,5 mL de reagente esterificante BF_3 -metanol e levado novamente ao banho de água fervente e resfriado em água corrente. Foram adicionados 2 mL de solução saturada de NaCl e o tubo foi agitado em vórtex por 30 segundos. Após a agitação, acrescentou-se 1,0 mL de hexano e a solução foi novamente agitada por 30 segundos (esse processo foi repetido por três vezes). Após repouso e separação das camadas, o sobrenadante, contendo os ésteres metílicos de ácidos graxos foram armazenados em freezer (-20°C) e analisados no mesmo dia.

Os ésteres metílicos de ácidos graxos foram analisados por cromatografia a gás em um cromatógrafo da marca CHROMPACK, modelo CP9001, com detector de ionização de chama (FID) e coluna capilar Chrompack (CP- Sil 88 50mx 0,25 mm). A temperatura do detector foi de 280°C , a do injetor 250°C e a temperatura inicial da coluna de 180°C por 7 minutos, com programação de aumento de $10^\circ\text{C}/\text{min}$ até temperatura máxima de 210°C . O gás de arraste utilizado foi o hidrogênio (H_2) com fluxo de 2,0 mL/min na coluna e a pressão utilizada foi de 50 kPa. A identificação dos ácidos graxos foi realizada por comparação do tempo de retenção dos componentes da amostra com os de padrões autênticos de ésteres metílicos de ácidos graxos (Sigma), injetados nas mesmas condições. Também foi utilizada a técnica da co-eluição. A quantificação foi realizada por normalização das áreas calculadas por meio de integrador (*Chromato-Integrator*) e expressa a porcentagem relativa de cada ácido graxo, em relação aos ácidos graxos totais.

As medidas foram realizadas na Universidade São Francisco, Bragança Paulista, SP, em colaboração com a Dra Patrícia de Oliveira Carvalho.

11. Medidas de Viscosidade

A medida da viscosidade das amostras de DRMs foi feita no equipamento *Vibro Viscosimeter* SV-10. Como parâmetro de comparação medimos a viscosidade de diferentes concentrações de sacarose em tampão TN a pH 7,4. As medidas foram realizadas a 25°C. O viscosímetro utiliza a frequência de 30 Hz, mantida numa amplitude constante. Há um efeito de amortecimento relacionado com a viscosidade do fluido, o que reduz a amplitude, de forma que a força necessária para manter os sensores vibrando na amplitude original é medida e convertida em viscosidade.

12. Determinação do tamanho das DRMs e ghosts de eritrócito

O tamanho das DRMs (assumidas como vesículas) de eritrócitos e de ghosts foi determinado através de espalhamento de luz dinâmico (DLS) usando o instrumento Zetasizer Nano-ZS em ângulo fixo de 90°C, na temperatura ambiente (25°C). As amostras foram devidamente diluídas previamente à aquisição das medidas. A viscosidade das soluções utilizadas nessas medidas também foi considerada na determinação do tamanho das vesículas.

13. Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR)

Alíquotas de DRMs obtidas no gradiente de sacarose, eritrócitos intactos ou depletados de colesterol foram adicionadas a tubos contendo um filme de marcadores de spin do tipo nitróxido-ácido esteárico (5-SASL ou 16-SASL, SIGMA), de forma a obter uma concentração final de aproximadamente 1-2 mol% de marcador de spin (em relação à concentração total de lipídios da membrana) e incubados por 30 min a 37°C.

Os marcadores de spin usados possuem um elétron desemparelhado, pertencente ao radical nitróxido num grupo doxil (Figura 8A). Este anel doxil está covalentemente ligado ao carbono 5 (5-SASL, Figura 8B) ou 16 (16-SASL) de uma molécula de ácido esteárico, tornando esses marcadores apropriados para monitorar ambientes hidrofóbicos como o interior da bicamada lipídica. Através dos espectros dos marcadores SASL intercalados nas bicamadas (dos eritrócitos, ghosts ou DRMs) foi determinado o parâmetro de ordem segmentar, S , (Hubbell & McConnell, 1971) que reflete a amplitude angular do movimento anisotrópico da molécula marcada (e a orientação dos lipídios da membrana), de acordo com equação abaixo:

$$S = \frac{2A_{//} - 2A_{\perp}}{2 [A_{zz} - (A_{xx} + A_{yy})/2]} \quad \text{Equação 4}$$

onde $A_{//}$ e $A_{\perp}$ referem-se aos desdobramentos hiperfinos, correspondentes aos marcadores orientados com seus eixos longos moleculares de forma paralela e perpendicular, respectivamente, em relação ao campo magnético externo. Os valores de $A_{//}$ e $A_{\perp}$ foram determinados diretamente dos espectros de EPR dos marcadores SASL, como mostra a Figura 8C (Hubbell & McConnell, 1971). Já os valores de A_{zz} , A_{xx} e A_{yy} (32, 6 e 6 gauss, respectivamente) correspondem aos principais componentes do tensor hiperfino do radical nitróxido, determinados em baixíssima temperatura estando o radical nitróxido totalmente imobilizado, isto é, perfeitamente orientado em relação ao campo magnético. Os valores do parâmetro de ordem segmentar podem variar de 0, em sistemas isotrópicos, até 1 para moléculas perfeitamente orientadas (Schreier et al., 1978).

As medidas de EPR foram realizadas no Instituto de Física da USP- São Paulo e determinadas a 25°C, no laboratório da Profa. Dra. Teresa Lammy, utilizando-se um equipamento Bruker EMX, operando na frequência de microondas de 9,7 GHz (banda X).

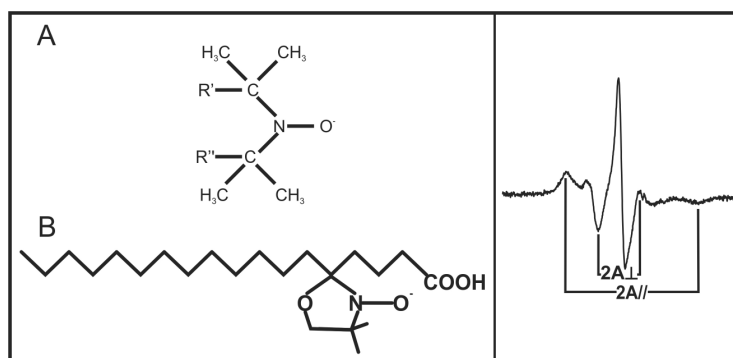


Figura 8. Representação do radical nitróxido (a) covalentemente ligado ao carbono 5 do ácido esteárico (b) e espectro de EPR do marcador 5-SASL em membranas (b), indicando medida dos parâmetros espectrais $2A_{//}$ e $2A_{\perp}$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Hemólise

As Figuras 9 e 10 apresentam as curvas hemolíticas obtidas por efeito do Brij 98 e Brij 58, respectivamente, em suspensões de eritrócitos (Ht=0,15%, 0,30%, 0,45% e 0,60%), sob condições isotônicas, pH 7,4 e 37°C. Através desses experimentos foi possível determinar a concentração de detergente necessária para saturação (C^{sat}) e solubilização total (C^{sol}) da membrana eritrocitária (início e 100% de hemólise, respectivamente) nas diferentes concentrações de eritrócitos.

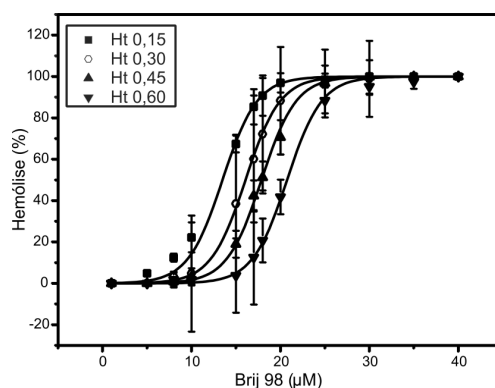


Figura 9. Efeito hemolítico de Brij 98 sobre eritrócitos humanos. Ht=0,15 (■), 0,30% (○), 0,45% (▲) e 0,60% (▼). Os experimentos foram feitos em triplicata.

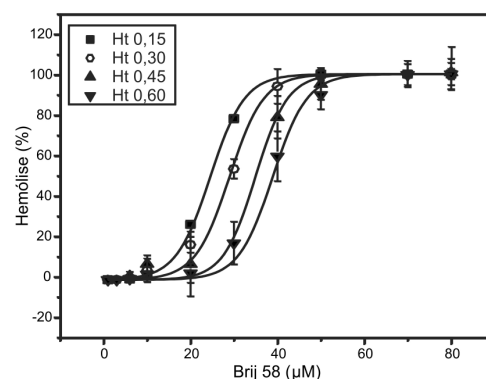


Figura 10. Efeito hemolítico de Brij 58 sobre eritrócitos humanos. Ht=0,15 (■), 0,30% (○), 0,45% (▲) e 0,60% (▼). Os experimentos foram feitos em triplicata.

As curvas hemolíticas obtidas (Figuras 9 e 10) descrevem um comportamento característico, onde se observa inicialmente a incorporação de pequenas quantidades de detergente sem provocar rompimento das membranas até que a concentração C^{sat} é

RESULTADOS E DISCUSSÃO

atingida. A partir daí, a adição de mais moléculas do detergente inicia um processo de ruptura da membrana, até solubilização total (C^{sol}), coincidente com a liberação de 100% da hemoglobina contida nos eritrócitos e determinada fotometricamente no sobrenadante. A tabela 3 mostra os valores de C^{sat} e C^{sol} obtidos para os detergentes Brij 98 e Brij 58. Valores obtidos anteriormente com TX-100, são mostrados, para fins de comparação (Preté et al., 2002a).

Os valores de C^{sat} e C^{sol} encontrados para o Brij 98 e Brij 58 são inferiores aos descritos para o TX-100 (Preté et al., 2002a) nas mesmas condições, refletindo o alto poder lítico dos Brij. Esses valores mostram que o poder lítico dos Brij é cerca de 5-10 vezes maior do que o TX-100 (tabela 3).

Tabela 3. Efeito hemolítico (C^{sat} e C^{sol}) dos detergentes TX-100, Brij 98 e Brij 58 em membranas de eritrócito humano, sob condições isotônicas, pH 7,4 e 37°C.

Ht	L (μ M) ^a	C^{sat}			C^{sol}		
		TX-100 (μ M) ^b	Brij 98 (μ M)	Brij 58 (μ M)	TX-100 (μ M) ^b	Brij 98 (μ M)	Brij 58 (μ M)
0,15%	13	131	9,11	16,46	222	17,38	32,15
0,30%	26	169	11,78	20,34	213	20,41	37,61
0,45%	39	184	13,56	26,51	255	22,19	43,08
0,60%	52	---	16,32	30,56	---	25,12	46,95

^a L= concentração de lipídios (fosfolipídios + colesterol) em membranas de eritrócitos correspondente a cada hematócrito, calculado de acordo com Malheiros et al. (2000).

^b dados de Preté et al., 2002^a

Relacionando o HLB dos detergentes da série Brij (tabela 2) com os valores de C^{sat} e C^{sol} na tabela 3, observa-se que o Brij 98 com menor HLB (15,3) requer menores concentrações para solubilização da membrana do que o Brij 58 (HLB = 15,7). Os menores valores de C^{sat} e C^{sol} encontrados para o Brij 98 em relação ao Brij 58 reflete a importância do caráter hidrofóbico no processo hemolítico, tal que quanto menor o HLB, menor a concentração de detergente necessária para desestabilizar a membrana, de igual forma para a CMC ou outro parâmetro de hidrofobicidade (Tabela 2). A habilidade de um detergente em se ligar na membrana e, portanto, ser um bom agente lítico pode

RESULTADOS E DISCUSSÃO

ser indicado pelo HLB. Preté et al. (2002b) demonstraram que dentro da série C_nE_m , quanto maior o comprimento da cauda acila, menor o HLB e maior o potencial lítico do detergente. Resultados semelhantes foram demonstrados com série homóloga de detergentes Renex (Preté, 2006) e, ASB (Domingues et al., 2008) entre outros (Galembeck et al., 1998; Preté et al., 2002b).

Já em relação ao TX-100, os Brij são mais hidrofílicos (sua porção polar tem o dobro de unidades polioxietileno que o TX-100) e, mesmo assim, mostram um potencial lítico bem superior ao daquele, indicando que outros fatores estão envolvidos no processo de lise desfavorecendo a inserção do TX-100 na bicamada lipídica (em relação aos Brij) como, por exemplo, um possível impedimento estérico, conferido ao TX-100 pelo seu anel benzênico, na interface polar-apolar da molécula (Figura 4).

Os valores de C^{sat} e C^{sol} obtidos das curvas hemolíticas foram representados graficamente em função da concentração de lipídios da membrana (Figuras 11 e 12) permitindo a determinação da razão molar efetiva detergente/lipídio para o início (R_e^{sat}) e total solubilização (R_e^{sol}) da membrana, de acordo com a equação (1) descrita na metodologia.

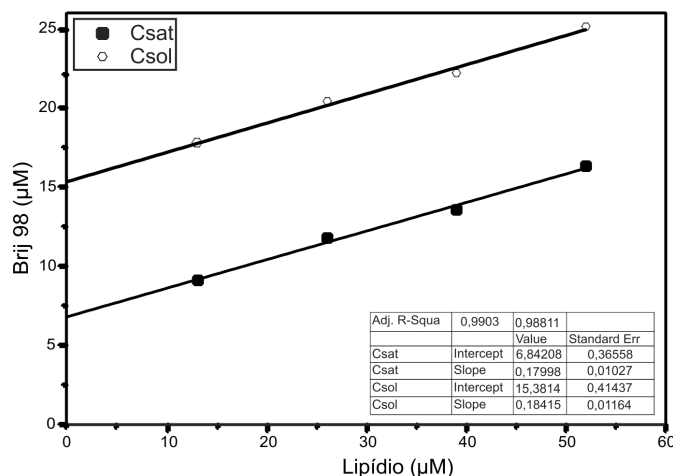


Figura 11. Razões molares efetivas de Brij 98/Lipídio para saturação e solubilização da membrana eritrocitária. Valores de C^{sat} (■) e C^{sol} (○) foram graficados em função da concentração lipídica dos hematócitos (Ht 0,15%=13µM, Ht 0,30%=26µM, Ht 0,45%=39µM e Ht 0,60%=52µM), calculada segundo Malheiros e cols. (2000).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

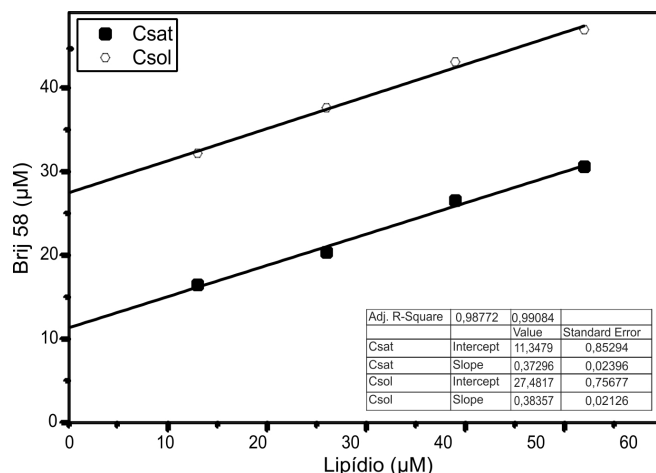


Figura 12. Razões molares efetivas de Brij 58/Lipídio para saturação e solubilização da membrana eritrocitária. Valores de C^{sat} (■) e C^{sol} (○) foram graficados em função da concentração lipídica dos hematócitos (Ht 0,15%=13µM, Ht 0,30%=26µM, Ht 0,45%=39µM e Ht 0,60%=52µM), calculada segundo Malheiros e cols (2000).

A tabela 4 reúne os parâmetros obtidos a partir das Figuras 11 e 12 além de valores para o TX-100, adicionados para comparação.

Tabela 4. Razões molares efetivas detergente/lipídio e parâmetros relacionados com a lise de eritrócitos induzida por Brij 98, Brij 58 e TX-100. Condições experimentais como descritas nas Figuras 9 e 10.

	Brij 98	Brij 58	TX-100 ^a
R_e^{sat}	0,18	0,37	1,58
R_e^{sol}	0,18	0,38	2,15
D_w^{sat}	6,8 µM	11,3 µM	100 µM
D_w^{sol}	15,4 µM	27,58 µM	180 µM
K_b (M ⁻¹)	22302	23957	5900

^a dados de Preté et al., 2002a.

As propriedades agregativas dos detergentes têm sido consideradas um fator extremamente relevante na solubilização de membranas (Lichtenberg, 1985; Heerklotz & Seelig, 2000; Lichtenberg et al., 2000; Schreier et al., 2000; Domingues et al., 2008). No modelo proposto por Le Maire et al (2000), a solubilização envolve um número de estágios intermediários, iniciando-se pela desestabilização dos componentes lipídicos

RESULTADOS E DISCUSSÃO

da membrana, em concentrações do detergente abaixo da CMC e culminando na ruptura total dessa, em concentrações próximas a CMC.

Segundo Lichtenberg (2000), os valores de D_w , obtidos pelo intercepto das ordenadas nas Figuras 11 e 12, correspondem à concentração de detergente livre em água, e em particular no caso dos valores de D_w^{sat} há uma correlação com a CMC dos detergentes. No entanto, esses valores são geralmente menores do que os valores de CMC, uma vez que os lipídios da membrana oferecem uma contribuição adicional para a agregação do detergente, diminuindo a concentração mínima de monômeros para formação da micela. Já os valores de D_w^{sol} podem ser influenciados pela formação de micelas mistas formadas a altas concentrações de detergente e, portanto, não guardam qualquer relação com a CMC.

De fato, os valores de D_w^{sat} encontrados (tabela 4) para o Brij 98 e Brij 58 são menores que as respectivas CMC desses detergentes (Tabela 2), como discutido acima, porém estão na mesma ordem de grandeza.

Os valores de R_e determinados (tabela 4) demonstram que os análogos Brij 98 e Brij 58 solubilizam membranas biológicas em razões molares detergente/lipídio menores que aquelas requeridas pelo TX-100. Isto significa que estes dois detergentes apresentam alto potencial lítico e podem ser explorados nos processos de solubilização de lipídios e proteínas de membranas, conforme já tem sido apontado em alguns estudos (Johansson et al., 1995; Drevot et al., 2002; Schuck et al., 2003; Pike et al., 2005). Esses resultados evidenciam mais uma vez a relação existente entre hidrofobicidade dos detergentes (HLB, CMC) e solubilização de membrana (potencial lítico), de forma que quanto menor a CMC maior é o potencial de solubilização.

Os valores de R_e do Brij 58 são cerca de duas vezes maiores que os valores do Brij 98, o que reflete a contribuição da maior porção hidrofóbica do Brij 98 para a lise (Figura 4), o que está de acordo com observações feitas em outras séries homólogas de detergentes (Preté, 2006; Domingues et al., 2008). Os valores encontrados para o

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Brij 98 estão próximos dos determinados para o $C_{12}E_8$ (Preté et al., 2002b) que tem cadeia acila e cabeça polar mais curtas.

Os valores de K_b determinados (tabela 4) para o Brij 98 e Brij 58 evidenciam a alta afinidade desses detergentes pela membrana eritrocitária, explicando o grande potencial lítico desses detergentes. A constante de associação dos Brij 98 e Brij 58 é cerca de 2 vezes maior que a dos homólogos polioxietileno 8-etil éteres de cabeça polar mais curta ($C_{16}E_8$ e $C_{18}E_8$) e cadeia acila equivalente (Preté et al, 2002b). No entanto, Brij 98 que demonstrou ser mais lítico que Brij 58 apresentou um K_b ligeiramente menor. Isto poderia ser explicado pelo fato, de que na faixa de concentração de hemólise, ambos detergentes se apresentam numa concentração pré-micelar. Sowmiya e cols (2010) verificaram que a fase micelar dos Brij 98 e Brij 58 é precedida pela formação de pequenos agregados conhecidos como agregados pré-micelares. Na fase pré-micelar, diferentemente da fase micelar, o Brij 58 é mais hidrofóbico e, conseqüentemente, menos polar que o Brij 98. A existência desses agregados pré-micelares da série Brij poderia também favorecer uma interação detergente-membrana de maneira particular tal que, através das condições utilizadas nesse trabalho para determinar os parâmetros hemolíticos, não pudemos observar uma diferença entre os valores de R_e^{sat} e R_e^{sol} para cada detergente usado. Portanto, o efeito hemolítico provocado pelos Brij parece ser um fenômeno fortemente associado aos monômeros e pré-micelas, além da fase micelar desses detergentes.

A existência de uma íntima correlação entre formação de micela, partição e ruptura de membrana tem sido descrita na literatura (Lichtenberg, 1985; Lichtenberg et al., 2000; Heerklotz, 2008). Desta forma, o produto de $K_b \cdot CMC$ foi proposto para classificar os detergentes em relação ao potencial de ruptura de membrana (Heerklotz & Seelig, 2000), ou seja, detergentes com $K_b \cdot CMC < 1$ são considerados fortes, enquanto aqueles que apresentam $K_b \cdot CMC > 1$ são considerados fracos. De acordo com esta classificação, o Brij 98 é considerado forte ($K_b.CMC = 0,56$) e o Brij 58 é considerado fraco (1,8). Preté (2006) propôs classificar os detergentes em relação ao potencial de ruptura de membranas substituindo o parâmetro proposto por Heerklotz &

Seelig (2000) pelos valores de R_e^{sat} . Esse último método demonstrou ser eficiente para descrever o efeito hemolítico da maioria dos 27 detergentes estudados por aquele autor e, dessa forma, pode ser uma alternativa para a classificação de um grande número de compostos em relação ao seu efeito lítico em sistemas membranares complexos, contendo lipídios e proteínas. Considerando os valores de R_e^{sat} , tanto o Brij 98 quanto o Brij 58 são considerados fortes solubilizadores ($R_e^{sat} < 1$) enquanto o TX-100 é considerado fraco ($R_e^{sat} > 1$). Esses resultados, sobre o forte potencial de solubilização dos Brij, reforçam ainda mais os resultados sobre o efeito hemolítico obtidos em que Brij 98 e Brij 58 foram mais potentes em relação ao clássico TX-100. Além disso, esses resultados podem ajudar a explicar a solubilização diferencial de lipídios da membrana eritrocitária, como será demonstrado nos próximos itens.

2. Membranas Resistentes a Detergentes (DRMs)

Para preparação das DRMs foi utilizado tampão TN pH 7,4. Optou-se em não incluir o uso de EDTA de forma a evitar quelação de alguns cátions bivalentes e, portanto, evitar possível desestabilização da monocamada interna que é dependente desses íons (Quinn, 2010). Dessa forma, evitou-se uma possível redistribuição das proteínas na membrana eritrocitária e nas suas respectivas DRMs. Além disso, não encontramos diferenças no conteúdo proteico e de colesterol em DRMs preparadas com ou sem uso de EDTA (Domingues, 2009).

Inicialmente, foram testadas duas concentrações dos detergentes Brij 98 e Brij 58 para lise dos eritrócitos e formação das DRMs. As concentrações foram de 8,6 mM e 8,9 mM para Brij 98 e Brij 58, respectivamente, (que correspondem a cerca de 1%) e 16 mM para ambos (que corresponde a cerca de 1,8%). Ambas concentrações as DRMs foram analisadas quanto ao conteúdo de colesterol e proteína total, além do perfil eletroforético. Obtivemos resultados semelhantes para ambas concentrações e, por isso, para poder melhor comparar DRMs obtidas com os detergentes da série Brij e DRMs de TX-100, optamos em utilizar a concentração de 16 mM que corresponde a concentração geralmente utilizada de TX-100 no preparo de DRMs. Dessa forma, a razão molar detergente/lipídios da membrana de eritrócitos foi de aproximadamente

12:1, conforme descrito em nossos estudos prévios (Crepaldi Domingues et al., 2009; Domingues et al., 2010).

Para obtenção das DRMs de TX-100, Brij 98 e Brij 58 houve a necessidade de usar carbonato de sódio para romper possíveis interações eletrostáticas existentes entre os domínios de membrana e as proteínas do citoesqueleto. Ciana e col. (2005) demonstraram que DRMs de ghosts de eritrócitos estão associadas ao citoesqueleto através de interações eletrostáticas que podem ser dissociadas pelo aumento do pH e da força iônica do meio, através do uso de carbonato de sódio. A necessidade dessas condições específicas (alto pH e força iônica) foram também demonstradas em trabalho anterior de nosso laboratório, utilizando eritrócitos intactos (Crepaldi Domingues et al., 2009). No entanto, outros grupos nunca descreveram o uso de carbonato de sódio ou alteração de força iônica e pH na preparação de DRMs de eritrócitos. A fim de explicar a necessidade do uso de carbonato de sódio, Minetti e cols. (Ciana et al., 2011) mostraram recentemente, que o uso de filtros de celulose e do agente inibidor de proteases diisopropilfluorofosfato (DFP) são indispensáveis para prevenir a ação proteolítica dos leucócitos contaminantes das suspensões de eritrócitos.

Neste estudo, embora as DRMs tenham sido preparadas sem o uso de DFP, tivemos o cuidado de usar filtro de celulose em todas as preparações dos eritrócitos, além de realizar lavagem dos eritrócitos, antes e após a filtração, evitando a contaminação por leucócitos. Além disso, aqueles autores (Ciana et al., 2011) demonstraram que DRMs obtidas com ou sem uso de DFP foram similares quantitativa (conteúdo de colesterol igual a 30% em relação à membrana de eritrócito intacta) e qualitativamente (ambos continham flotilina-2 e estomatina, marcadores protéicos de *lipid rafts*), confirmando nossos resultados anteriores em relação a presença de marcadores de rafts e conteúdo de colesterol em DRMs obtidas sem o uso de DFP (Crepaldi Domingues et al., 2009; Domingues et al., 2010). A ação proteolítica (sem uso de DFP) foi observada principalmente para banda 3, GPC, anquirina, proteína 4.1 e espectrina (Ciana et al., 2011).

2.1. Preparo de DRMs isoladas em diferentes condições de temperatura e a partir de células tratadas com M β CD

A Figura 13 mostra o gradiente de sacarose, após a ultracentrifugação de eritrócitos lisados com Brij 98 e Brij 58 a 4°C e a 37°C e também eritrócitos tratados com M β CD e lisados a 4°C com os mesmos detergentes. Visualmente observa-se uma fração de baixa densidade encontrada na interface 5% - 30% de sacarose. Essa fração corresponde à porção de membrana insolúvel aos detergentes (DRMs). Para análise das amostras foi coletado 1 mL das referidas frações de baixa densidade, de modo que toda fração de DRMs de cada tubo estava contida naquele volume.

Neste estudo demonstramos, pela primeira vez, o preparo de DRMs de eritrócitos a partir de detergentes Brij embora a obtenção de DRMs a partir de Brij 98 e Brij 58 já tenham sido descrita anteriormente, para outros tipos celulares (Drevot et al., 2002; Bini et al., 2003; Schuck et al., 2003; Locke et al., 2005; Gil et al., 2006; Lenne et al., 2006).

De acordo com a Figura 13, foi possível preparar DRMs tanto a 4°C quanto a 37°C. Portanto, assim como demonstramos anteriormente para TX-100 e C₁₂E₈ (Domingues et al., 2010) a preparação de DRMs também se dá em temperatura fisiológica com uso de Brij. Recentemente Mikhalyov e Samsonov (2011) utilizando fluorimetria e microscopia de fluorescência, detectaram *lipid rafts* em membranas de eritrócitos em temperatura fisiológica. Aqueles autores demonstraram que domínios da membrana de eritrócitos intactos ocorrem tanto a 4°C quanto a 23°C e 37°C, embora os microdomínios foram menos evidentes nas temperaturas maiores. Outro dado interessante desse último estudo foi a determinação da mobilidade de domínios na membrana eritrocitária: esses microdomínios apresentaram velocidade de difusão lateral de lipídios na faixa de 0,3-0,5 μ m/s a temperatura ambiente. Baseado em nossos resultados e na literatura, podemos então afirmar que tanto rafts quanto DRMs de eritrócitos podem ser caracterizados em diferentes temperaturas, incluindo 37°C, permitindo análises comparativas entre essas estruturas de membranas (*rafts* e DRMs).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após uma depleção de colesterol foram obtidas frações de membranas que resistiram à ação do detergente, indicando que a quantidade de colesterol extraída (cerca de 40% do total de colesterol da membrana do eritrócito) não alterou a propriedade de baixa densidade dessas frações. A redução do conteúdo de colesterol também foi conduzida por Mikhalyov e Samsonov (2011), os domínios foram monitorados através de uma sonda fluorescente e após o tratamento dos eritrócitos com M β CD a 4°C, esses autores observaram uma diminuição dos microdomínios em função do tempo de incubação com M β CD e uma conseqüente diminuição no conteúdo de colesterol na membrana eritrocitária. Embora esses resultados evidenciem que a presença do colesterol é essencial para a separação de fase e formação de domínios na membrana, nossos resultados demonstraram que a propriedade de baixa densidade é mantida nessas DRMs.

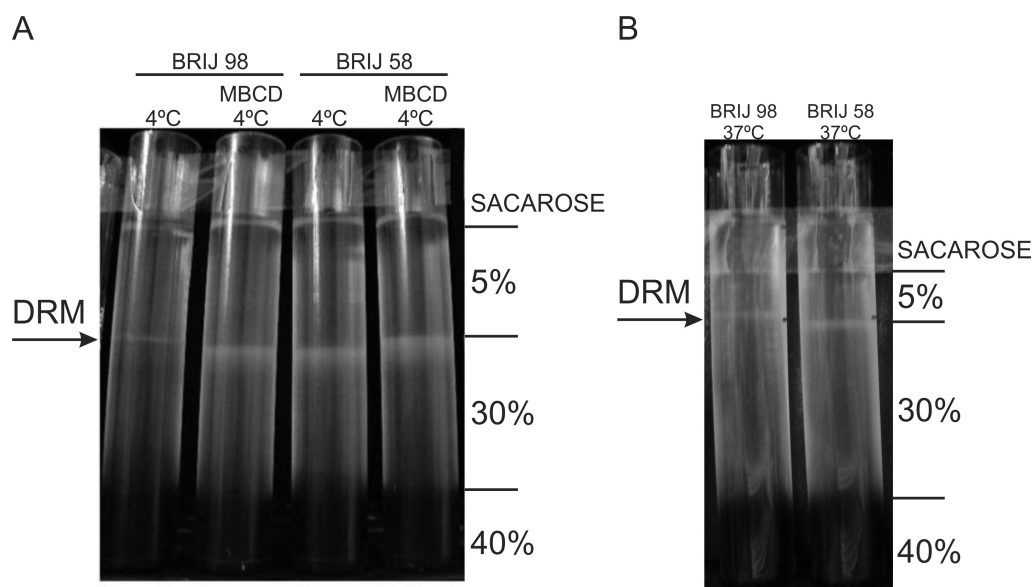


Figura 13. Gradiente de sacarose após ultracentrifugação de eritrócitos humanos tratados com Brij 98 e Brij 58 à 4°C (A) e 37°C (B). Na Figura (A) observa-se também o aspecto do gradiente de sacarose e DRMs obtidas a partir de células com menor conteúdo de colesterol (tratadas com M β CD). A seta indica a posição de DRMs, na região do gradiente de baixa densidade. Os números 5%, 30% e 40% indicam a concentração da solução de sacarose, formando um gradiente descontínuo.

Locke e col. (2005) encontraram que a densidade da fração de DRMs isoladas a partir de células HeLa com uso de TX-100 variou de aproximadamente 1,076 a 1,100

g/cm³ e de 1,058 a 1,089 g/cm³ em DRMs de Brij 58. As DRMs obtidas na Figura 13 correspondem a densidades similares àquelas descritas por Locke e col. (2005) uma vez que os valores descritos por aqueles autores se referem a densidades encontradas na interface 5-30% do gradiente de sacarose.

2.2. Caracterização do conteúdo de colesterol e proteínas de DRMs

DRMs são caracterizadas pelo alto teor de colesterol e esfingolipídios (em relação às membranas de origem), além da presença de proteínas específicas. Inicialmente, as frações resistentes a detergentes foram analisadas quanto ao conteúdo de colesterol (Figura 14) e proteínas totais (Figura 15), e comparadas com DRMs preparadas com TX-100

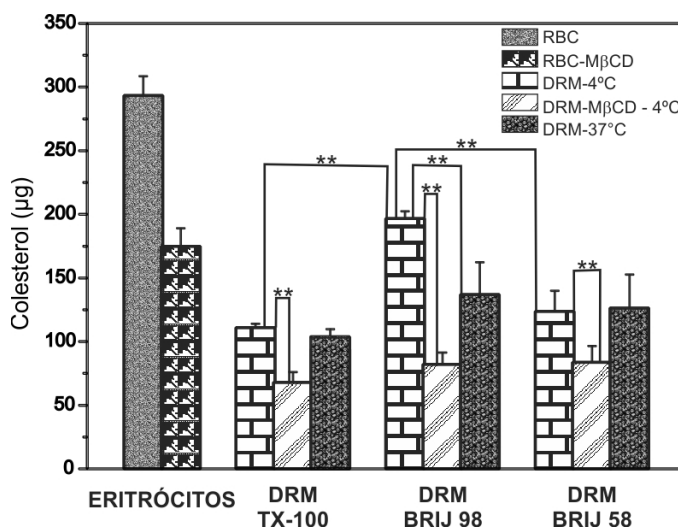


Figura 14. Quantificação do conteúdo de colesterol nas frações de DRM obtidas com TX-100, Brij 98 e Brij 58 e em membrana de eritrócitos (RBC). O conteúdo de colesterol dos eritrócitos equivale ao número de células presentes inicialmente na preparação das DRMs correspondendo a $2,5 \times 10^9$ (eritrócitos íntegros). Os dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão; ** $p < 0,001$, teste T de *student* não pareado, $n=3-6$.

Aproximadamente 40% do conteúdo de colesterol da membrana do eritrócito ficou confinado nas DRMs preparados com TX-100 e Brij 58, tanto a 4°C quanto a 37°C. Já para o Brij 98, esses valores foram mais elevados: a 4°C, cerca de 67% do conteúdo de colesterol foi encontrado nos DRMs, enquanto a 37°C, cerca de 47%. Esses resultados indicam que o colesterol foi mais resistente ao tratamento com Brij 98 que aos demais detergentes. Além disso, a temperatura foi um fator relevante no conteúdo

RESULTADOS E DISCUSSÃO

de colesterol apenas para o Brij 98. Embora o efeito hemolítico do Brij 98 tenha sido maior que o do Brij 58 (tabelas 3 e 4), não se observou uma relação direta entre o efeito lítico e a solubilização do colesterol nas membranas de eritrócitos, indicando que esses processos são fenômenos independentes.

Após o tratamento com M β CD, observou-se uma diminuição de 40% no conteúdo de colesterol presente nas células de eritrócitos. Quando essas células, com menor conteúdo de colesterol foram tratadas com detergentes e submetidas à ultracentrifugação, a fração de DRM obtida apresentou proporcionalmente 40% a menos de colesterol (em relação as DRMs obtidas a partir da membrana intacta), tanto para o tratamento com TX-100 quanto com Brij 58. Já para o Brij 98, houve uma diminuição de 58% do conteúdo de colesterol presente nas DRMs obtidas a partir de membranas com conteúdo reduzido em colesterol, em relação ao conteúdo de colesterol inicial presente em eritrócitos tratados com M β CD (Figura 14). Dessa forma, o conteúdo de colesterol em DRMs obtidas a partir de eritrócitos tratados com M β CD foi praticamente o mesmo, independente do detergente utilizado.

O enriquecimento de colesterol em DRMs tem sido encontrado tanto em membranas modelo quanto em membranas biológicas. Recentemente, foi proposto por Ahyayauch e col. (2009) que a resistência de membranas à detergentes é devida, principalmente, à formação de complexos colesterol-esfingolipídio que possuem um curvatura espontânea negativa, ao contrário de outros lipídios que, assim, sofreriam solubilização. Naquele estudo, com membranas modelo compostas de PC, SM e colesterol, foi demonstrado que a solubilização de esfingomieline por detergente é diminuída na presença de colesterol. O teor de esfingolipídios em DRMs de eritrócitos será discutido adiante.

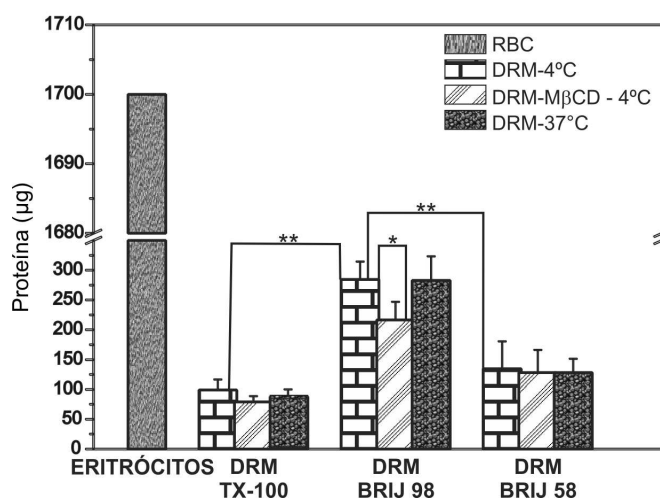


Figura 15. Quantificação do conteúdo protéico das frações de DRM obtidas com TX-100, Brij 98 e Brij 58. Aproximadamente $2,5 \times 10^9$ células de eritrócitos íntegros (RBC) foram utilizadas para preparo das DRMs. A quantidade de proteína presente nas membranas intactas de eritrócitos foi estimada a partir da razão de massas proteínas:lipídio (1:1,2) e da concentração lipídica total (calculada de acordo com Dodge et al., 1963; Malheiros et al., 2000). Dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão; * $p < 0,05$ e ** $p < 0,001$, teste T de *student* não pareado, $n = 3-6$.

A Figura 15 mostra que aproximadamente 5-7% do conteúdo protéico da membrana do eritrócito foi confinado em DRMs preparadas com TX-100 e Brij 58 (4°C e 37°C) e cerca de 17% em DRMs de Brij 98 (4°C e 37°C). Esses percentuais indicam que o teor protéico das frações de DRMs preparadas a partir de TX-100, Brij 98 e Brij 58 praticamente não se alterou em função das temperaturas testadas (4°C e 37°C). Schuck e cols. (2003) utilizando células MDCK (*Madin-Darby canine kidney*) encontraram cerca de 10 vezes mais proteína em DRMs de Brij 58 do que em DRMs de TX-100; segundo esses autores, o Brij 58 teria uma ação menos seletiva sobre a membrana, pois romperia menos interações lipídio-proteína, justificando a associação de DRMs com um número maior de proteínas. Nossos resultados, no entanto, indicam que o Brij 98 foi menos seletivo que o TX-100, resultando em DRMs com maiores concentrações de colesterol e proteína.

Além disso, a solubilização de proteínas e de colesterol de eritrócitos induzida por Brij 98 apresentou um comportamento diferencial para cada um desses componentes frente à variação de temperatura. Enquanto o colesterol mostrou-se

menos resistente a 37°C, as proteínas apresentaram resistência muito similar tanto a 4°C quanto a 37°C.

Após o tratamento com M β CD, não se observou diferença no conteúdo protéico entre as DRMs preparadas com células intactas e com conteúdo reduzido de colesterol, utilizando TX-100 e Brij 58. Já para DRMs de Brij 98 observou-se uma diminuição de cerca de 20% no conteúdo protéico, quando células com menor conteúdo de colesterol foram utilizadas. Dessa forma, nossos resultados demonstram que o tipo de detergente e o teor de colesterol podem regular a composição proteica das DRMs, evidenciando que a associação da proteína com DRMs (e, por extrapolação, com os rafts) pode estar relacionada à sua habilidade de se ligar com colesterol.

Outro aspecto importante que caracteriza as DRMs em geral é o aumento da razão de massas colesterol/proteína (Crepaldi Domingues et al., 2009; Quinn et al., 2010). A Figura 16 mostra as razões colesterol/proteína da membrana de eritrócito intacta e das frações de DRMs obtidas com os diferentes detergentes. Assim como observado para DRMs de eritrócitos obtidas com TX-100 e C₁₂E₈ (Crepaldi Domingues et al., 2009), encontramos um aumento significativo na razão colesterol/proteína para DRMs de Brij 98 e Brij 58, em relação as células intactas (Figura 16). Para DRMs obtidas em diferentes condições (temperatura e a partir de células reduzidas de colesterol) esse aumento variou de 3 a 4 vezes para Brij 98, enquanto que para Brij 58 essa variação foi de 4 a 6 vezes.

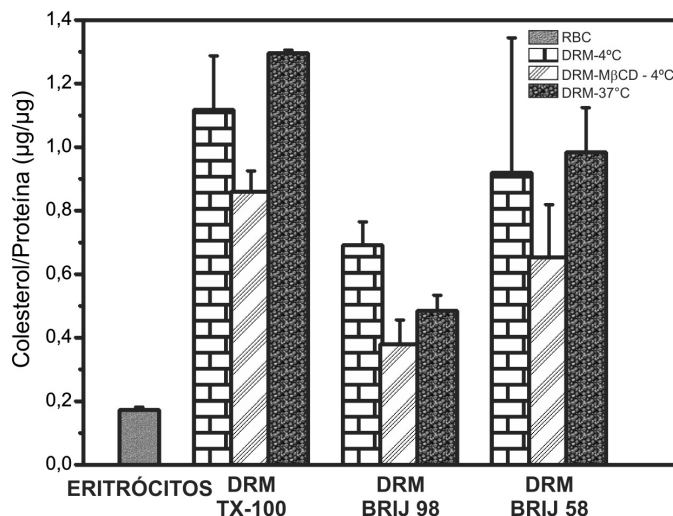


Figura 16. Razão (m:m) colesterol/proteína em DRMs obtidas com TX-100, Brij 98 e Brij 58. Aproximadamente $2,5 \times 10^9$ células de eritrócitos íntegros (RBC) foram utilizadas para preparo de DRMs. A quantidade de proteína presente no eritrócito foi estimada a partir da razão de massas proteínas:lipídio (1:1,2) e da concentração lipídica total (calculada de acordo com Dodge et al., 1963; Malheiros et al., 2000). Os dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão (n= 3-6)

A presença de proteínas do citoesqueleto associadas às DRMs tem também sido alvo de muito debate na literatura (Ciana et al., 2011) e ainda é um tema bastante controverso. Neste sentido, medidas de eletroforese monodimensional foram utilizadas na tentativa de caracterizar, qualitativamente, o conteúdo proteico das DRMs. O perfil eletroforético (SDS-PAGE) de DRMs obtidas com TX-100, Brij 98, Brij 58 é mostrado na Figura 17.

A presença de espectrina, observada nas DRMs de TX-100 e Brij 98 (Figura 17), provavelmente se deve a presença de leucócitos contaminantes em nossas preparações. Conforme descrito por Ciana e cols. (2011), o uso de DFP juntamente com a filtração em celulose evitaria este tipo de contaminação. Dessa forma, um resultado falso-positivo pode ter ocorrido em nossos experimentos. Mesmo assim, ficou evidente que tanto a remoção de colesterol quanto o aumento da temperatura (dados a 37°C) promoveram uma diminuição acentuada no conteúdo de espectrina em DRMs de TX-100 e Brij 98.

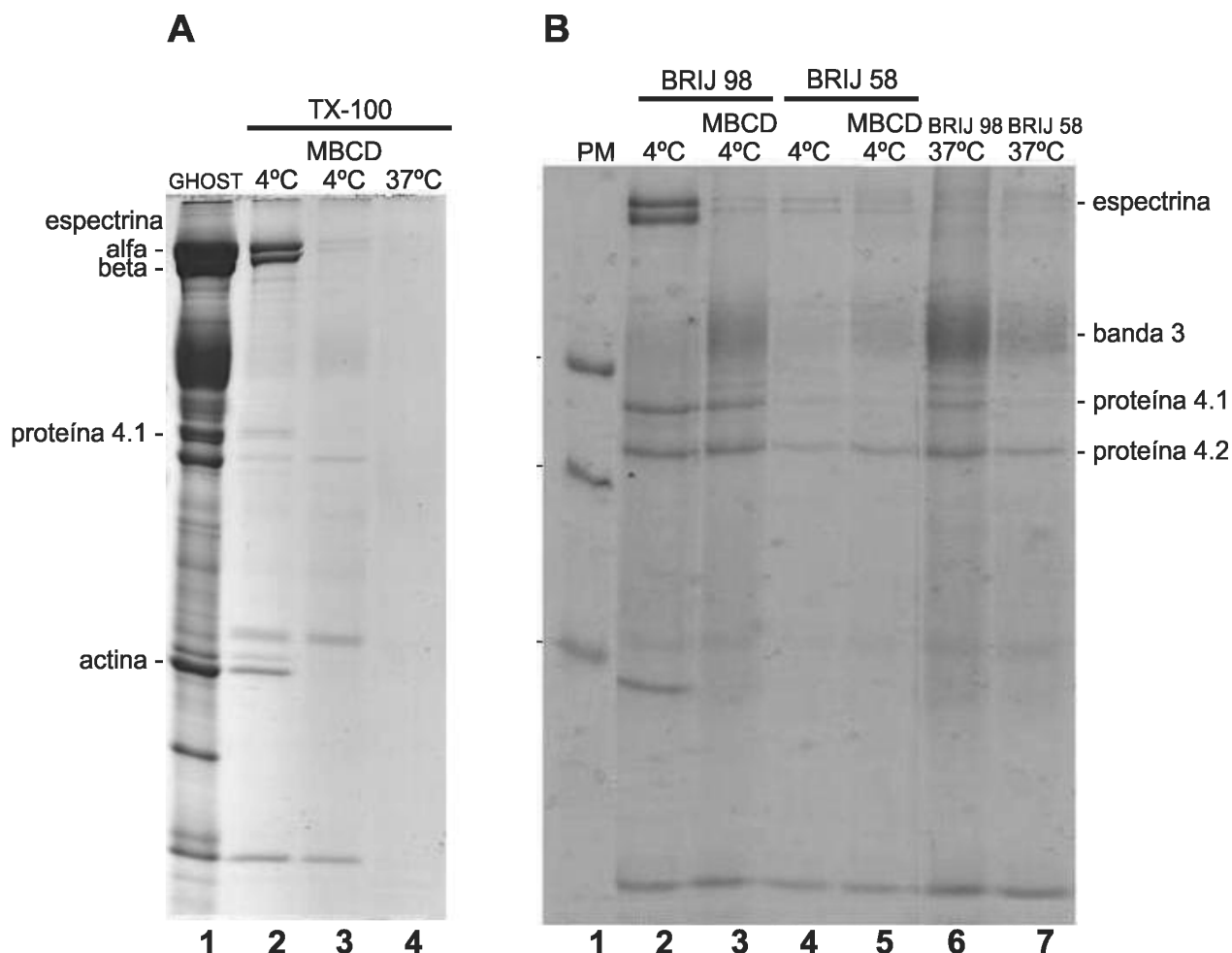


Figura 17. Eletroforese SDS-PAGE de proteínas presentes em DRMs preparadas com TX-100 (A), com Brij 98 e Brij 58 (B) a 4°C (A = coluna 2; B = colunas 2 e 4), 37°C (A = coluna 4; B = colunas 6 e 7) e a partir de células com conteúdo reduzido de colesterol e lisadas a 4°C (A = coluna 3; B = coluna 3 e 5). Uma quantidade de amostra de ghosts proporcional à quantidade da fração de DRMs foi usada como controle (A). PM (coluna 1) indica os padrões de peso molecular das proteínas.

Curiosamente, a presença de banda 3 ficou mais evidente em DRMs preparadas com Brij do que com TX-100. Embora tenha sido demonstrado anteriormente que a banda 3 não deve estar envolvida na associação entre DRM-citoesqueleto de eritrócito (Crepaldi Domingues et al., 2009), nossos resultados com Brij (principalmente Brij 98) revelam uma seletividade por essa proteína (banda 3) não encontrada em DRMs de TX-100. Isso indica, mais uma vez, que a composição de DRMs é dependente da capacidade solubilizante específica do detergente utilizado.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para completar a análise qualitativa das proteínas presentes nas diferentes DRMs estudadas, medidas de Western blotting foram conduzidas, na tentativa de identificar proteínas marcadoras de DRMs, como flotilina-2 e estomatina (Crepaldi Domingues et al., 2009; Domingues et al., 2010).

2.3. Western Blotting

O uso de diferentes detergentes e temperatura de extração de DRMs podem levar a inclusão e exclusão de proteínas nas DRMs (Pike et al., 2005; Domingues et al., 2010) principalmente nas proteínas marcadoras de *lipid rafts* (Domingues et al., 2010). Flotilina-2 e estomatina são duas proteínas presentes em DRMs da membrana de eritrócito (Samuel et al., 2001; Murphy et al., 2007; Crepaldi Domingues et al., 2009; Domingues et al., 2010). A distribuição dessas proteínas nas DRMs obtidas com Brij 98 e Brij 58 e em ghosts de eritrócitos está demonstrada na Figura 18.

Para comparação, foram aplicadas 10 µg de proteínas totais para as DRMs e ghosts, somente para a DRM de TX-100 foi aplicado 5 µg. Como observado (Figura 18) todas as preparações de DRMs apresentam estomatina e flotilina-2, no entanto, visualmente há diferenças no conteúdo dessas proteínas entre as DRMs.

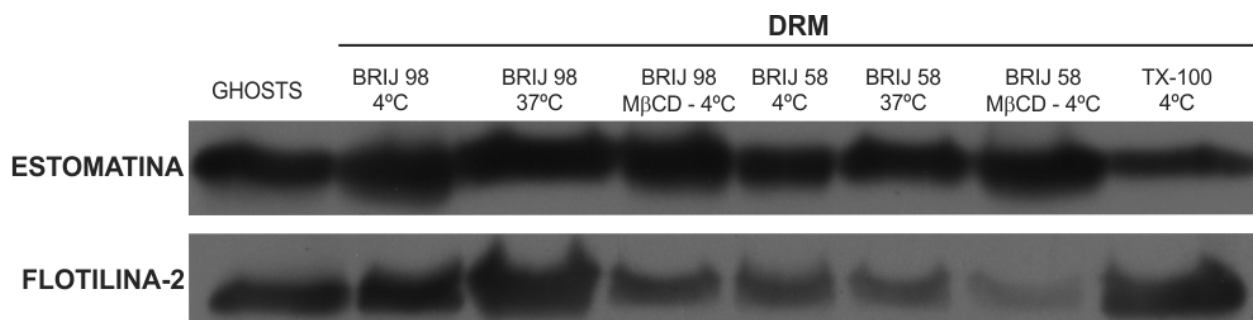


Figura 18. Detecção por *western blotting* das proteínas marcadoras de *lipid rafts*, estomatina e flotilina-2, presentes nas DRMs e ghosts; 10 ug de proteínas foram aplicadas para todas amostras exceto para a DRM de TX-100 onde foi aplicado 5 ug.

A flotilina-2 foi essencialmente afetada após o tratamento com MβCD e a consequente diminuição de colesterol nas DRMs de Brij 98 e Brij 58 quando comparadas com suas respectivas DRMs preparadas a partir de células intactas à 4°C. Resultados semelhantes foram encontrados por Samuel e cols (2001) e Domingues e

cols (2010) para DRMs de eritrócitos lisados com TX-100. Entretanto, a estomatina não teve seu perfil de solubilização alterado pela diminuição do colesterol. Esses resultados estão de acordo com aqueles encontrados por Domingues e cols (2009) para DRMs isoladas de dois diferentes detergentes (TX-100 e $C_{12}E_8$). Considerando nossos resultados parece que os domínios onde encontra-se flotilina-2 são fortemente dependentes de colesterol, diferentemente dos domínios de estomatina. No entanto, Samuel e cols (2001), utilizando uma metodologia de preparação dos eritrócitos diferentes daquela utilizada neste trabalho, não encontraram associação de estomatina com DRMs após a depleção do colesterol.

É importante ressaltar que apesar de não haver diferença significativa no conteúdo proteico total entre as DRMs de Brij 58 a 4°C e as DRMs de Brij 58 preparada a partir de células com conteúdo de colesterol diminuído, o conteúdo de flotilina foi diminuído nessas ultimas frações.

A temperatura de lise das células não foi um fator determinante na presença dessas proteínas nas DRMs, em oposição aos resultados descritos por Domingues e cols (2010) para DRMs de TX-100 e $C_{12}E_8$ preparadas a 37°C, onde a flotilina-2 e a estomatina foram parcialmente solubilizadas por esses detergentes.

2.4. Análise dos fosfolipídios de DRMs

Alguns trabalhos na literatura evidenciaram menor tendência do Brij 98 em solubilizar fosfolipídios localizados na monocamada interna das membranas e conservar a assimetria da membrana (Schuck et al., 2003; Quinn, 2010).

Embora o comportamento de fases dos lipídios em membranas modelo venha sendo explorado (Almeida, 2009; Wydro, 2011a; Wydro, 2011b), é comum analisar apenas certos tipos de lipídios da membrana, a saber: esfingolipídios (esfingomielina) e colesterol, que são os principais responsáveis pela fase líquido ordenada dos rafts, e ainda a fosfatidilcolina. De acordo com o comprimento das cadeias N-acila dos ácidos graxos presentes nos esfingolipídios, estes últimos podem ser chamados de simétricos (quando possuem entre 16-18 átomos de carbono) e assimétricos (quando possuem

RESULTADOS E DISCUSSÃO

entre 22-26 átomos de carbono). O tamanho dessas cadeias N-acila dos esfingolipídios influencia fortemente a formação dos domínios em membranas celulares. Os glicerofosfolipídios preferencialmente se associam à esfingolipídios assimétricos. Já a associação de esfingolipídios simétricos com colesterol prevalece sobre os glicerofosfolipídios (Quinn, 2010). A relação entre a variedade de esfingolipídios assimétricos e suas respectivas funções em *rafts* é ainda alvo de investigação.

Como poucos estudos tem explorado DRMs em eritrócitos, pouco se sabe sobre sua composição lipídica diferencial. Dessa forma, os lipídios da membrana do eritrócito e de suas respectivas DRMs foram extraídos para identificação de diferentes tipos de fosfolipídios e ainda para obter uma análise mais detalhada dos ácidos graxos presentes nessas frações. A extração de lipídios com solvente orgânico, conforme descrito em materiais e métodos foi conduzido da mesma forma para ghosts e DRMs.

Inicialmente os fosfolipídios de DRMs preparadas a partir de células lisadas a 4°C foram analisados por HPTLC (Figura 19). Nessas placas foram aplicados cerca de 10^{-4} M de lipídios (cálculos estimados, a partir da dosagem de proteína e usando-se a razão de massas existente entre proteína e lipídio, na membrana de eritrócito). Como podemos observar na Figura 19, as principais bandas encontradas em DRMs de Brij foram: esfingomielina (SM), fosfatidilcolina (PC) e fosfatidiletanolamina (PE). Como a banda de fosfatidilserina (PS) apresentou baixa resolução e não foi reprodutível em DRMs, ela não foi considerada nas análises subsequentes.

A distribuição dos fosfolipídios (em mol%) presentes na membrana do eritrócito e em DRMs, obtida através das análises das placas de HPTLC, é dada na Figura 20. A distribuição em mol% de PC e PE em ghosts foi praticamente a mesma (34%, Figura 20) enquanto a razão SM:PC encontrada foi de 0,82:1, em concordância com os resultados descritos por Koumanov e cols (2005): 0,7-0,8:1, e Leidl e cols. (2008): 0,9:1.

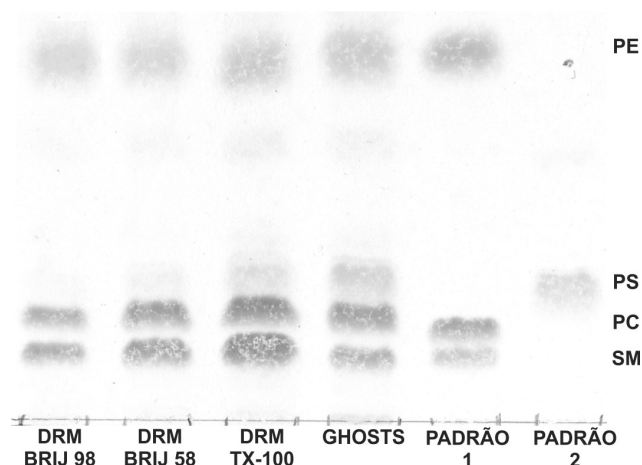


Figura 19. Perfil de distribuição dos fosfolipídios presentes em ghosts de eritrócitos e em DRMs de Brij 98, Brij 58 e TX-100. O padrão 1 é uma mistura lipídica de esfingomielina (SM), fosfatidilcolina (PC) e fosfatidiletanolamina (PE). O padrão 2 contém fosfatidilserina (PS). A placa foi corada com azul de molibdênio, para visualização dos fosfolipídios.

Embora a SM seja o fosfolípido predominante nas DRMs de TX-100 (45 mol%), esse enriquecimento não foi observado em DRMs de Brij. Diferentemente do esperado, DRMs de Brij 98 e Brij 58 apresentaram uma distribuição de SM e glicerofosfolipídios bem similar à encontrada na membrana de eritrócitos. Os resultados da Figura 20 evidenciam ainda que além de SM, as DRMs de eritrócitos obtidas com Brij e TX-100 também apresentam um alto conteúdo dos glicerofosfolipídios majoritários (PC e PE).

Na membrana do eritrócito, PE e PS são lipídios localizados principalmente na monocamada interna (80% do total de PE e 100% das PS estão presentes no lado citossólico da bicamada) (Sackmann, 1995). Os resultados na Figura 20 indicam outra diferença encontrada entre fosfolipídios de DRMs de TX-100 e DRMs de Brij, referente ao conteúdo de PE. Assim como observado em outros estudos (Schuck et al., 2003; Pike et al., 2005) fosfolipídios da monocamada interna (neste caso PE) foram mais resistentes ao Brij do que ao TX-100. Enquanto a razão PC:PE variou entre 1-1,3 para DRM de Brij, essa razão foi de 2,2 para DRM de TX-100. Esses resultados indicam que a habilidade de solubilizar lipídios da monocamada interna não é a mesma para todos os detergentes e sim uma característica particular de cada composto (Pike et al., 2005). Segundo Pike et al. (2005), os lipídios da monocamada interna seriam menos estáveis

RESULTADOS E DISCUSSÃO

que os da monocamada externa, devido à ausência ou diminuição de interações entre esfingolípídios e colesterol, já que SM distribui-se preferencialmente na monocamada externa das biomembranas e não estaria presente na monocamada intracelular de *rafts* (Niu & Litman, 2002; Pike et al., 2005).

A quantidade de PC que poderia estar presente na monocamada interna de *rafts* e a natureza de suas cadeias acilas ainda são pobremente conhecidas. Também os resultados obtidos com frações de membranas obtidas sem uso de detergentes sugerem que a monocamada interna de *rafts* contém mais PE do que PC, e essa com cadeias relativamente mais saturadas (Pike et al., 2005). A distribuição do colesterol entre as duas monocamadas também não é bem conhecida, mas sabe-se que ele também está presente em grandes quantidades na monocamada interna (Wydro, 2011a).

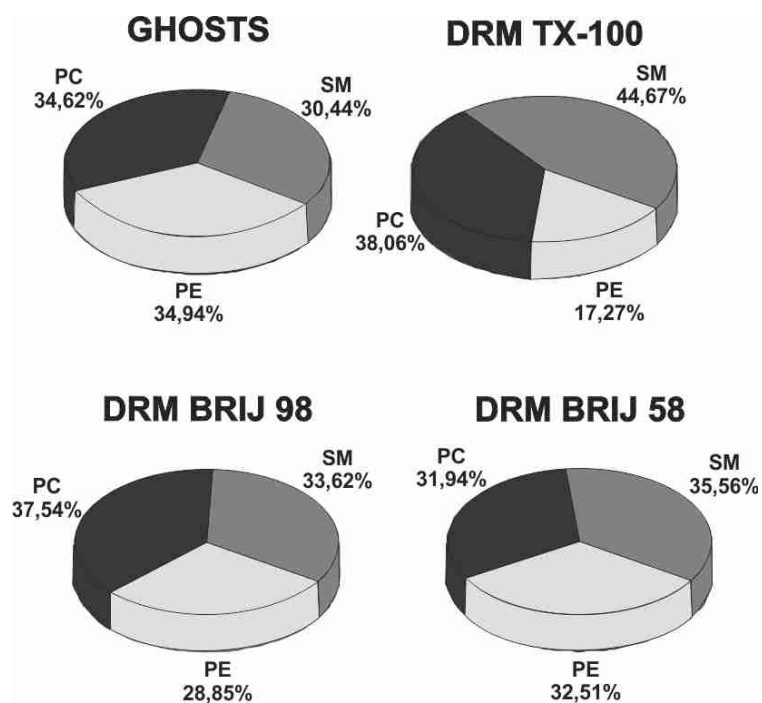


Figura 20. Distribuição dos fosfolípídios (SM=esfingomiéline, PC=fosfatidilcolina, PE=fosfatidiletanolamina) de ghosts e de DRMs de TX-100, Brij 98 e Brij 58, obtidos das medidas de HPTLC. Os valores estão expressos em mol% e correspondem a uma média de 3 experimentos independentes.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Embora as análises do conteúdo de fosfolipídios e colesterol tenham sido realizadas por diferentes técnicas, a razão SM:colesterol nas DRMs foi determinada em 0,21 para DRMs de TX-100 e 0,12 e 0,18 para DRMs de Brij 98 e Brij 58, respectivamente. Esses valores são menores do que a razão encontrada por Koumanov e cols. (2005) em DRM de TX-100 (1,1). Porém os valores encontrados nesse estudo estariam de acordo com aqueles determinados em DRMs de membranas de cérebro (Brügger et al., 2004) (0,18) e para DRMs de células MDCK preparadas com TX-100 (Delaunay et al., 2008) (0,3).

Para evidenciar a presença de SM e colesterol, que são os lipídios geralmente mais abundantes em *rafts* e responsáveis pela formação da fase L_o , os lipídios analisados por HPTLC foram divididos em esfingolipídios, glicerofosfolipídios (PC + PE) e, juntamente com o colesterol, suas concentrações (em razão molar) foram comparadas graficamente. A razão molar entre esfingomiéline/glicerofosfolipídios (SM/GL) e colesterol/glicerofosfolipídios (Col/GL) estão representadas nas Figuras 21 e 22. De acordo com a Figura 21, DRMs de TX-100 demonstraram claro enriquecimento em esfingolipídios, conforme também mostrado anteriormente (Figura 20). Esses resultados estão de acordo com o trabalho de Pike et al. (2005); que em DRMs de células CHO lisadas com TX-100 encontraram grande proporção de esfingomiéline, comparada com a membrana original, enquanto que DRMs de Brij 98 eram menos enriquecidos em esfingomiéline que as DRMs de TX-100.

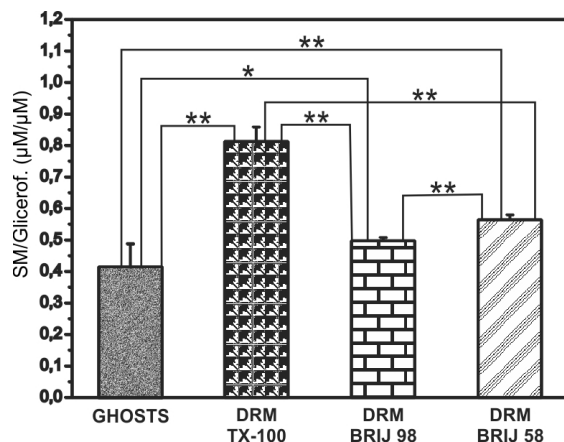


Figura 21. Razão esfingomiélin/glicerofosfolípídios (SM/Glicerof.) encontradas nas frações de DRM de TX-100, Brij 98 e Brij 58, preparadas a 4°C. Glicerofosfolípídios representam PC e PE. Os dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão; * $p < 0,05$ e ** $p < 0,001$, teste T de *student* não pareado, $n = 3-6$.

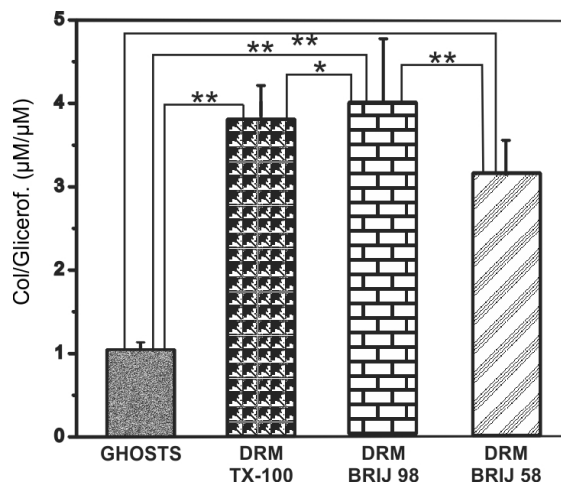


Figura 22. Razão colesterol/glicerofosfolípídios (COL/Glicerof.) encontradas nas frações de DRM de TX-100, Brij 98 e Brij 58, preparadas a 4°C. Glicerofosfolípídios estão representados por PC e PE. Os dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão; * $p < 0,05$ e ** $p < 0,001$, teste T de *student* não pareado, $n = 3-6$.

Utilizando dados teóricos (Dodge et al., 1963; Malheiros et al., 2000), a concentração lipídica (colesterol e fosfolípídios) estimada em $2,5 \times 10^{-9}$ eritrócitos presentes no hematócrito 20% (utilizado em nossos experimentos) é de $1,73 \times 10^{-3}$ M. Essa concentração foi a mesma encontrada em nossas análises lipídicas (colesterol e fosfolípídios) em amostras de ghosts equivalentes ao hematócrito 20%. Já as concentrações encontradas nas DRMs de TX-100, Brij 98 e Brij 58 foram: $4,5 \cdot 10^{-4}$, $7,3 \cdot 10^{-4}$ e $5 \cdot 10^{-4}$ M, respectivamente. Portanto, essas DRMs apresentaram 27, 43 e

29%, respectivamente, dos lipídios majoritários presentes na membrana de eritrócitos (hematócrito 20%).

2.5. Composição dos ácidos graxos constituintes dos fosfolipídios de DRMs

Para investigar possíveis diferenças entre as DRMs de eritrócito e determinar com mais detalhes o perfil lipídico dessas estruturas, foi utilizada a técnica de cromatografia gasosa (CG) para análise dos ácidos graxos dos fosfolipídios presentes em DRMs obtidas com TX-100, Brij 98 e Brij 58.

Para detectar os ácidos graxos presentes nas classes mais abundantes de fosfolipídios da membrana (SM, PC e PE), esses últimos foram inicialmente separados por HPTLC e suas respectivas bandas utilizadas para análise por CG, como descrito em materiais e métodos.

As Figuras 23, 24 e 25 mostram a composição dos ácidos graxos da esfingomielina (SM), da fosfatidilcolina (PC) e da fosfatidiletanolamina (PE), respectivamente.

Entre os ácidos graxos encontrados na fração de SM presentes em ghosts, observa-se que as cadeias dos ácidos graxos saturados mais abundantes possuem 16, 18, 22 e 24 átomos de carbono. Como esperado (já que esfingolipídios, juntamente com o colesterol são reconhecidos por oferecerem resistência a detergentes e estão presentes em maior quantidade nas DRMs), as cadeias de ácidos graxos saturados (16:0, 18:0, 24:0) de SM foram expressivamente aumentadas nas frações de DRMs (Figura 23). A única exceção foi para a cadeia 22:0, que não mostrou enriquecimento em DRMs. Além disso, cadeias de ácidos graxos apresentando uma ou mais insaturações diminuíram nessas frações de DRMs em relação aos ghosts (especialmente no caso das cadeias 24:1) o que é consistente com a existência da fase L_o .

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um dado bastante interessante foi a presença quase exclusiva de cadeias acilas 24:0 (ácido lignocérico) nas frações de esfingomielina presentes nas DRMs (tanto de TX-100 como de Brij 98 e Brij 58) em relação ao PC e PE. Como o ácido lignocérico não foi encontrado em frações de PC e PE, isso parece ser um fator bastante importante na formação de DRMs de eritrócitos uma vez que PC e PE também estão presentes em proporções significativas nas DRMs. Esfingolipídios assimétricos, como o ácido lignocérico, favorecem a formação de domínio L_o estável devido ao maior empacotamento da bicamada (menor fluidez) conferida pela longa cadeia acila quando associado ao colesterol ou com outros fosfolipídios com cadeias de ácidos graxos saturadas conforme descrito para membranas modelo (Quinn, 2010). De fato, Chen e cols. (2009a) analisando bicamadas de DRMs de Brij 96 e TX-100 de membranas de células cerebrais de rato por espalhamento de nêutrons (SANS) encontraram espessuras de 4,6 a 5,0 nm, isto é, ligeiramente maiores que a da membrana intacta (4,5 nm), o que seria resultado da maior quantidade de lipídios com cadeias saturadas e longas, como o ácido lignocérico, em DRMs.

Entre as frações de PC e PE das DRMs (Figuras 21 e 22, respectivamente), encontramos menos ácidos graxos com cadeias longas como o ácido araquídico (20:0) e ácido lignocérico (24:0). Apenas uma pequena quantidade (cerca de 6%) de ácido araquidônico (20:4) compõe PC e PE nas DRMs. No entanto, um perfil muito similar ao encontrado para frações de SM foi observado para PC e PE: DRMs são enriquecidas de ácidos graxos saturados e reduzidas de insaturados em relação aos ghosts. Embora PE tenha sido reduzida em DRMs de TX-100, a composição e proporção de ácidos graxos naquela fração foi a mesma obtida em DRMs de Brij.

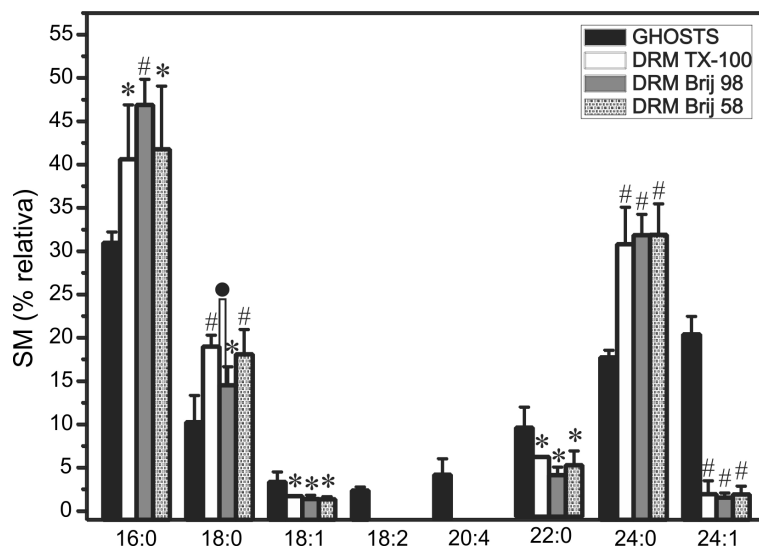


Figura 23. Composição das espécies de ácidos graxos presentes em esfingomielina (SM). Ácido palmítico (16:0), ácido esteárico (18:0), ácido oléico (18:1), ácido linoléico (18:2), ácido eicosatetraenoico (20:4), ácido beênico (22:0), ácido lignocérico (24:0), ácido nervônico (24:1). • representa $p<0,05$ entre DRMs. * representa $p<0,05$, e # representa $p<0,001$ para DRMs comparadas com os ghosts. Teste T de *student* não pareado, $n=3$.

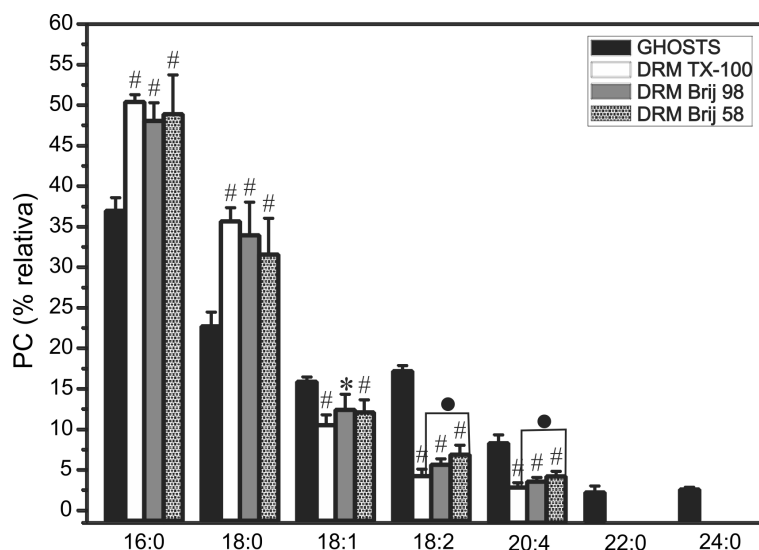


Figura 24. Composição das espécies de ácidos graxos presentes em fosfatidilcolina (PC). Ácido palmítico (16:0), ácido esteárico (18:0), ácido oléico (18:1), ácido linoléico (18:2), ácido eicosatetraenoico (20:4), ácido beênico (22:0), ácido lignocérico (24:0). • representa $p<0,05$ entre DRMs. * representa $p<0,05$, e # representa $p<0,001$ para DRMs comparadas com os ghosts. Teste T de *student* não pareado, $n=3$.

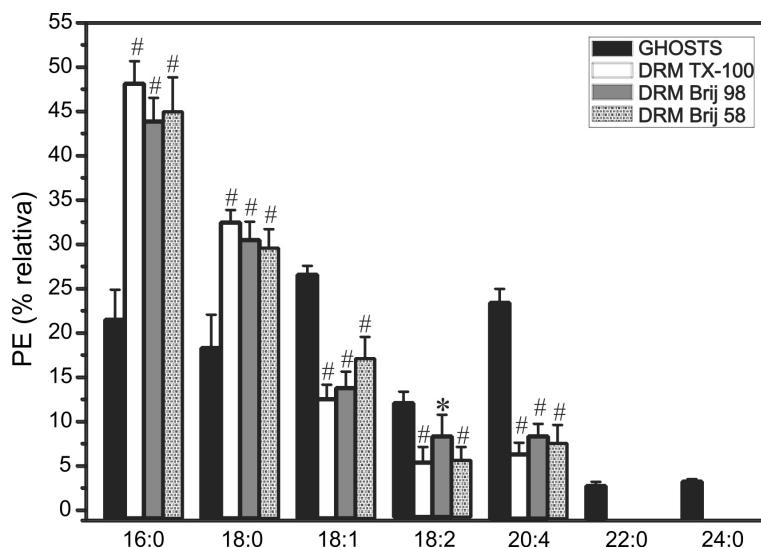


Figura 25. Composição das espécies de ácidos graxos presentes em fosfatidiletanolamina (PE). Ácido palmítico (16:0), ácido esteárico (18:0), ácido oléico (18:1), ácido linoléico (18:2), ácido eicosatetraenoico (20:4), ácido beênico (22:0), ácido lignocérico (24:0). Os dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão ($n=3$). * representa $p<0,05$, e # representa $p<0,001$ para DRMs comparadas com os ghosts. Teste T de *student* não pareado, $n=3$.

Em todos os casos testados nesse estudo (SM, PC e PE), as DRMs apresentaram um aumento na razão entre ácidos graxos saturados e insaturados, em comparação à composição de ácidos graxos da membrana do eritrócito. Essas razões estão representadas na Figura 26. Esses resultados evidenciam o aumento da quantidade de ácidos graxos saturados nas DRMs (compatível com uma menor fluidez dessas frações de membrana) e que estes ácidos graxos saturados não são exclusivamente provenientes de SM, mas também de glicerofosfolípidios.

As cadeias acilas das SM de DRMs de TX-100 mostraram-se mais saturadas do que em DRMs de Brij 98, essa diferença deveu-se principalmente à diminuição de ácidos graxos 18:0 nas DRMs de Brij 98. Já a PC de Brij 58 apresentou mais ácidos graxos insaturados do que DRMs de TX-100; um aumento significativo foi encontrado para o ácido graxo 18:2.

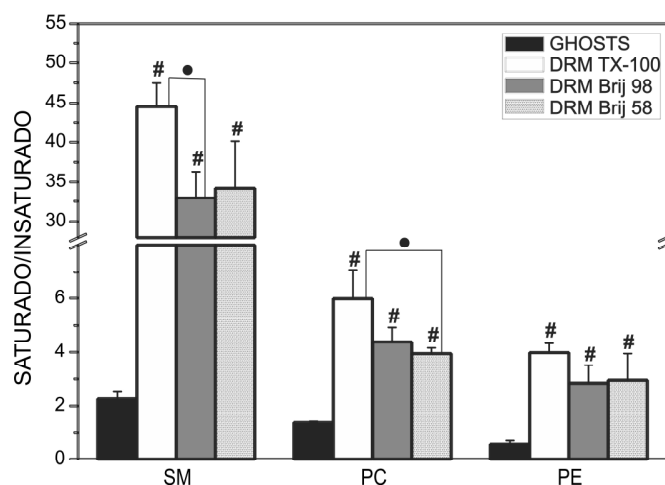


Figura 26. Razão ácidos graxos saturados/insaturados dos principais fosfolipídios encontrados na membrana do eritrócito e em suas DRMs. • representa $p < 0,05$ entre DRMs. # representa $p < 0,001$ para DRMs comparadas com os ghosts. Teste T de *student* não pareado, $n=3$.

Comparando-se a composição de PE, que é um fosfolipídio presente na monocamada interna, com a de PC e SM, fosfolipídios de inserção preferencial na monocamada externa, percebe-se que a monocamada interna das DRMs contém, proporcionalmente, mais ácidos graxos insaturados. Essa observação está de acordo com trabalhos na literatura que atribuem menor estabilidade aos lipídios da monocamada interna nas DRMs, fato até então atribuído somente a menor distribuição de SM nesta monocamada (Pike et al., 2005).

2.6. Determinação do tamanho de DRMs

Para avaliar a viscosidade das frações de DRMs (necessária para análise do tamanho dessas partículas, conforme será descrito mais adiante) foi preparada uma curva com concentrações conhecidas de sacarose em tampão TN pH 7,4 nas concentrações: 0%, 5%, 17,5%, 30% e 40%. As concentrações de 5, 30 e 40% foram escolhidas por corresponderem àquelas utilizadas no gradiente de sacarose usado para separação das DRMs. A concentração de 17,5% equivale a uma mistura (1:1, v/v) das soluções de sacarose 5 e 30% (correspondendo a concentração de sacarose na região do gradiente onde a fração DRM foi recolhida). A Figura 27 mostra a curva padrão e a viscosidade da amostra de DRMs.

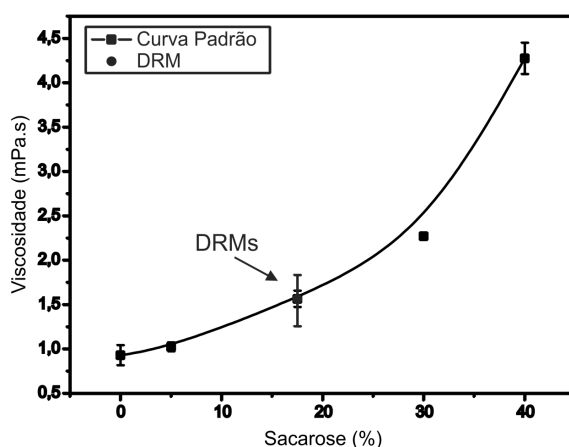


Figura 27. Determinação da viscosidade encontrada nas diferentes concentrações de sacarose utilizadas para formação do gradiente. A seta indica a viscosidade encontrada nas amostras de DRMs. Os dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão ($n=3$) As medidas foram realizadas a 25°C.

Como esperado, as amostras de DRMs apresentaram a mesma viscosidade da amostra da solução de sacarose 17,5% (Figura 27), comprovando que as DRMs flutam na interface entre 5 e 30% de sacarose e que o gradiente descontínuo é mantido após a ultracentrifugação.

Neste estudo, foram utilizadas medidas de espalhamento de luz (dynamic light scattering - DLS) para determinar o tamanho das vesículas de DRMs obtidas a partir de eritrócitos íntegros. As medidas de DLS foram feitas a 25°C e a viscosidade atribuída às DRMs foi de 1,54 mPa.s, de acordo com os resultados de viscosidade mostrados na Figura 27. Os resultados obtidos estão descritos na Tabela 6.

Tabela 5. Tamanho das vesículas de ghosts e de DRMs de TX-100, Brij 98 e Brij 58.

	Diâmetro (nm)	% Populacional	Polidispersão
GHOSTS	2889,5 $\pm$ 127,8	67	0,660
DRM TX-100	100,0 $\pm$ 10,8	82	0,350
DRM Brij 98	970,4 $\pm$ 199,8	88	0,589
DRM Brij 58	277,0 $\pm$ 30	83	0,491

Os valores encontrados mostram que os ghosts tem diâmetro ligeiramente menor que o de eritrócitos íntegros, ca. 8 μm (Chasis & Shohet, 1987), porém ainda na faixa de micrômetros. Já nas amostras de DRMs notam-se vesículas menores e com diferentes tamanhos, o que certamente reflete a diferente composição lipídica e proteica das frações resistentes a cada detergente. Particularmente as DRMs de Brij 98 apresentaram-se como vesículas cerca de 10 vezes maiores que as de TX-100 o que pode ser explicado pela maior proporção de colesterol e proteínas encontradas nas DRMs de Brij 98 (Figura 16).

Imagens de microscopia eletrônica mostraram que DRMs de ghosts de eritrócitos apresentam-se como vesículas multilamelares, fechadas, de tamanhos variados (Koumanov et al., 2005). Radeva e cols. (2004), demonstraram que DRMs de Brij 96 e TX-100 obtidas a partir de células RBL-2H3 são vesículas esféricas seladas, que parecem ser unilamelares. Esses autores também analisaram o tamanho das vesículas por DLS e encontraram diâmetro médio de 135 nm para as DRMs de Brij 96 e de 135 - 170 nm para DRMs de TX-100. Chen e cols. (2009a) também utilizando DLS não encontraram diferenças entre vesículas de DRMs obtidas com Brij 96 e TX-100 isoladas a partir de células de cérebro de rato, porém registraram alta polidispersidade das amostras.

Nossos resultados também evidenciaram grande polidispersão no diâmetro das DRMs, porém esses resultados serviram para caracterizar essas frações resistentes à detergente, que se apresentam como bicamadas concêntricas da ordem de centenas de nanômetros, de acordo com outras descrições encontradas na literatura.

2.7. Análise da organização de DRMs por ressonância paramagnética eletrônica (EPR)

A ressonância paramagnética eletrônica (EPR) foi utilizada para investigar o empacotamento das cadeias acilas dos lipídios de DRMs, cuja ambiência foi monitorada utilizando-se os marcadores de spin 5-SASL e 16-SASL, incorporados nessas bicamadas. Os marcadores foram incorporados numa proporção de 1 mol%, em relação

RESULTADOS E DISCUSSÃO

ao total de lipídios, para evitar interferência dos mesmos no grau de organização das membranas. Espectros de DRMs obtidas a 4°C e 37°C e a partir de células com conteúdo reduzido de colesterol foram registrados a 25°C.

A Figura 28 mostra os espectros experimentais obtidos com o marcador 5-SASL incorporado em DRMs preparadas a 4°C e em eritrócitos íntegros. Como podemos observar, os espectros apresentam duas componentes, uma mais rígida que corresponde ao sinal do marcador incorporado entre os lipídios da bicamada (sinais alargados) e uma livre, que corresponde ao sinal do marcador em solução (com movimento isotrópico dando origem a picos estreitos como os apontados pelas setas); resultados semelhantes foram obtidos com o uso do marcador 16-SASL.

Os marcadores de spin 5-SASL e 16-SASL monitoram duas regiões diferentes da bicamada lipídica. Enquanto o 5-SASL monitora a cadeia acila na região mais próxima às cabeças polares dos fosfolipídios, o 16-SASL monitora uma região mais interna e desorganizada, próxima ao centro da bicamada (Ellena et al., 1988). Os valores de parâmetro (S) calculados a partir dos espectros dos marcadores 5 e 16-SASL em DRMs obtidas a 4°C e 37°C a partir de eritrócitos íntegros ou com conteúdo reduzido de colesterol estão representados na Figura 29 e 30 (5 e 16-SASL, respectivamente).

Como esperado, os valores de S são menores para o 16-SASL ($S < 0,3$) em relação ao 5-SASL ($S > 0,75$) nas membranas íntegras. Porém, o fato de os espectros do marcador 16-SASL apresentarem resolução dos extremos externos e internos (ver métodos) é um forte indicador da anisotropia do ambiente monitorado pela sonda, evidenciando que lipídios das membranas de eritrócito são bastante empacotados (membrana rígida), restringindo a amplitude e a velocidade do movimento de rotação das cadeias acila. Em sistemas modelo de membranas compostos somente de lipídios (como lipossomas de fosfatidilcolina de ovo), os espectros do marcador 16-SASL não apresentam anisotropia suficiente para permitir a determinação dos desdobramentos hiperfinos para cálculo do parâmetro de ordem, S (Ellena et al., 1988).

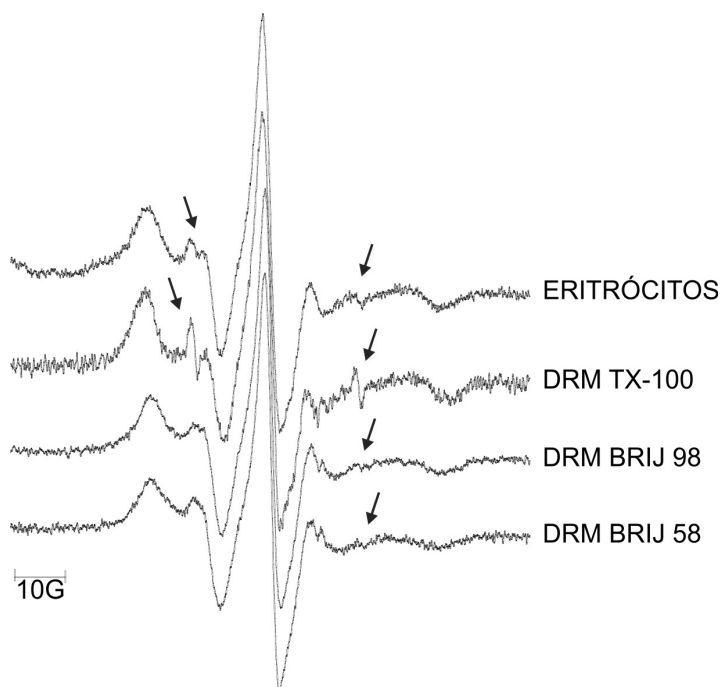


Figura 28. Espectros experimentais de EPR da sonda paramagnética 5-SASL incorporada em DRMs de eritrócitos íntegros tratados TX-100, Brij 98 e Brij 58 a 4°C. As setas indicam picos isotrópicos devidos ao marcador livre em água. Medidas feitas a 25 °C, 9,7 GHz e janela espectral de 100 gauss.

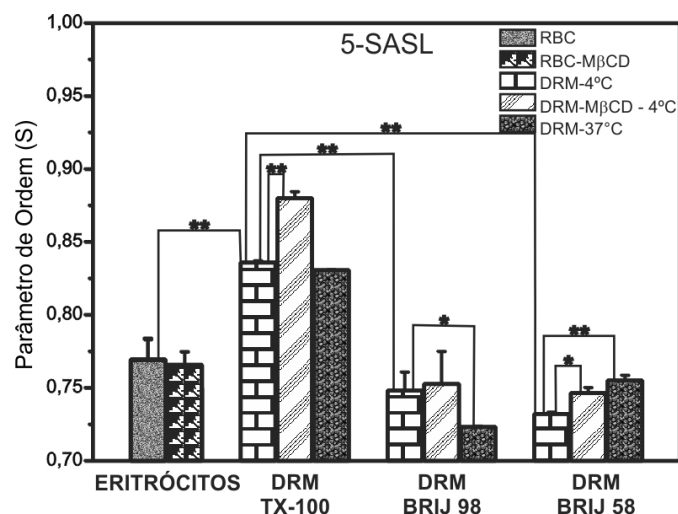


Figura 29. Parâmetro de ordem (S) calculados a partir dos espectros de EPR com o marcador 5-SASL incorporados na membrana de eritrócitos íntegros (RBC) ou reduzidas de colesterol (RBC – MβCD) e em DRMs preparadas a 4°C, 37°C e a partir de células integras reduzidas de colesterol (DRM – MβCD – 4°C). Dados foram expressos como média ± SD; *p<0,05 e **p<0,001, teste T de *student* não pareado, n=3-6.

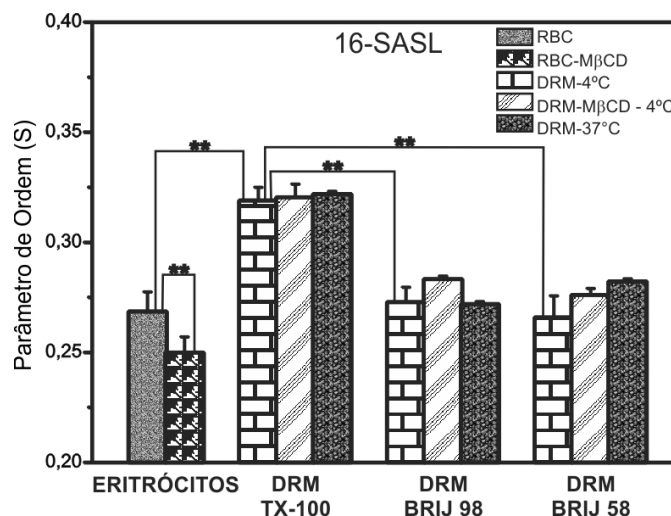


Figura 30. Parâmetro de ordem (S) calculados a partir dos espectros de EPR com o marcador 16-SASL incorporados na membrana de eritrócitos íntegros (RBC) ou reduzidas de colesterol (RBC – MβCD) e em DRMs preparadas a 4°C, 37°C e a partir de células integras reduzidas de colesterol (DRM – MβCD – 4°C). Dados foram expressos como média ± SD; *p<0,05 e **p<0,001, teste T de *student* não pareado, n=3-6.

Em relação às membranas controle (eritrócitos tratados ou não com MβCD), somente o marcador 16-SASL detectou uma diminuição significativa no parâmetro de ordem nas células com conteúdo reduzido de colesterol quando comparadas com as células integras, o que está de acordo com o papel modulador da fluidez de membranas biológicas do colesterol (Wydro, 2011b) e como já havíamos reportado anteriormente (Domingues et al., 2010). Cassera e cols. (2002) reportaram que a redução do colesterol em eritrócitos causa desordem no interior hidrofóbico da membrana sentida pelo marcador 16-SASL o mesmo foi reportado por Subczynski e cols. (2009) em membranas modelos de POPC com diversos marcadores (n-PC e n-SASL) sendo que um efeito um pouco mais pronunciado foi detectado próximo ao centro da bicamada (sentida pelo marcado no carbono 16). O contrário, aumento da ordem, foi registrado com um aumento da concentração de colesterol na membrana (Cassera et al., 2002; Subczynski et al., 2009). O colesterol está enriquecido nas frações de DRMs e tem papel importante na interação de proteínas com rafts de membrana (Diakowski et al, 2006), tal que a formação de DRMs de distintas composições, pelos detergentes

RESULTADOS E DISCUSSÃO

empregados, pode justificar a diferença na fluidez das membranas, entre as diferentes DRMs.

Quanto aos DRMs de TX-100, diferenças significativas no grau de empacotamento (aumento no valor do parâmetro de ordem) foram detectadas pelos marcadores 5 e 16-SASL em DRMs de TX-100, em comparação com membranas íntegras, como já havíamos descrito anteriormente (Crepaldi Domingues et al., 2009). Esse resultado constitui uma evidência da formação de fase líquido-ordenada, em DRMs de TX-100 (Domingues et al., 2010). No entanto, não detectamos alterações significativas em relação à ordem, em DRMs de TX-100 preparadas a 4°C e 37°C (Figuras 20 e 30).

Diferentemente do esperado, DRMs de Brij 98 e Brij 58 não mostraram possuir cadeias acilas tão ordenadas quanto aquelas presentes em DRMs de TX-100, já que não houve diferença significativa nos valores de S detectados nas regiões da bicamada lipídica dos DRMs monitoradas pelas sondas 5-SASL (Figura 29) e pelo 16-SASL (Figura 30), em relação à membrana de eritrócito, depletada ou não de colesterol. Tampouco a variação de temperatura (4°C e 37°C) das preparações de DRMs afetou o grau de organização das membranas obtidas.

Como demonstrado anteriormente as DRMs de TX-100 são constituídas principalmente de esfingomielinas (Figuras 20 e 21) e colesterol (Figuras 16 e 22), tem baixo teor de PE (Figura 20) e a composição de suas SM é rica em ácidos graxos saturados (Figura 23) inclusive de cadeia longa. Já as DRMs de Brij 98 são proporcionalmente mais ricas em colesterol e contém uma quantidade significativamente maior de proteínas (Figuras 14 e 15), enquanto as DRMs de Brij 58 embora tenham apresentado algumas características parecidas com DRMs de TX-100 (em termos do conteúdo de colesterol e proteínas totais, Figuras 14 e 15), apresentaram distribuição de fosfolípidios semelhante à encontrada em ghosts (Figura 20), não sendo evidenciado aumento proporcional de SM (Figura 20) com suas cadeias

RESULTADOS E DISCUSSÃO

ácida longas e saturadas, como no caso das DRMs de TX-100, de maior grau de empacotamento.

Portanto, esses resultados indicam que a menor proporção de SM encontrada nas DRMs de Brij (98 e 58) ou talvez a presença de grandes quantidades de glicerolipídios (PC + PE) ou ainda a prevalência de lipídios da monocamada interna (PE) pode justificar a maior fluidez do que as de DRMs de Brij, em relação às de TX-100. O parâmetro de ordem das DRMs de Brij 98 e Brij 58 não diferiu significativamente daquele determinado em membranas de eritrócito, de forma que os experimentos de EPR não permitiram evidenciar a prevalência da fase líquido-ordenada naquelas frações, contrariamente ao observado em DRMs de TX-100 (Crepaldi Domingues et al, 2009, Domingues et al, 2010).

Modelos de *rafts* predizem que o empacotamento lipídico na fase L_o dos lipídios na monocamada externa levaria a uma equivalente organização da monocamada interna (Diakowski et al., 2006).

Os dados apresentados nesse estudo, juntamente com os previamente reportados na literatura, revelam vários aspectos da organização da membrana do eritrócito, obtidos através do estudo de frações resistentes a detergentes, que mimetizam domínios lipídicos (*lipid rafts*) das membranas biológicas. Estes resultados carecem de maior elucidação e, portanto, para melhor compreensão do comportamento dos lipídios nessas membranas, sua segregação lateral e formação de seus domínios, além do papel das proteínas nessa segregação justifica-se investigar as propriedades das diferentes espécies de lipídios presentes nas membranas, incluindo-se aquelas espécies presentes em menores proporções.

CONCLUSÃO

Neste trabalho estudamos, pela primeira vez, a solubilização/resistência da membrana eritrocitária por Brij 98 e Brij 58, comparando os resultados obtidos com aqueles promovidos pelo TX-100. Os resultados obtidos permitiram tirar as seguintes conclusões:

- Os detergentes Brij 98 e Brij 58 são eficientes agentes hemolíticos e apresentam razões molares detergente:lipídio para saturação da membrana de eritrócito ($R_e^{sat} = 0,18$ e $0,37$, respectivamente) menores que a do TX-100 ($R_e^{sat} = 1,58$).
- Usando gradiente de sacarose para separar o produto da solubilização da membrana eritrocitária por esses detergentes, conseguimos isolar frações resistentes a detergentes (DRMs) de Brij 98 e Brij 58, tanto a 4°C quanto a 37°C.
- DRMs de Brij 98 e Brij 58, assim como os de TX-100, apresentaram uma alta razão colesterol/proteína, em relação à membrana de eritrócito, uma característica de *lipid rafts*. No entanto, os três detergentes diferiram entre si na habilidade de solubilizar os componentes proteicos e lipídicos da membrana do eritrócito. Em relação ao conteúdo de esfingomielina, DRMs de TX-100 foram enriquecidos por esse lipídio. Já as DRMs dos Brij 98 e Brij 58 apresentaram menor conteúdo em relação as DRMs de TX-100. Além disso, observamos que o TX-100 e o Brij 58 apresentaram maior capacidade de solubilizar proteínas e colesterol da membrana de eritrócito do que Brij 98. A quantidade de fosfatidiletanolamina nas DRMs de TX-100 foi inferior a das DRMs dos Brij, indicando uma solubilização preferencial do TX-100 pelos lipídios da monocamada interna da membrana de eritrócitos em relação aos Brij.
- Além de colesterol e esfingomielina, outros fosfolipídios (fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina) contribuem para a resistência da membrana eritrocitária a detergentes. Os fosfolipídios encontrados nas DRMs de Brij 98, Brij 58 e TX-100 apresentam uma alta razão de cadeias acila saturadas/insaturadas, em relação à membrana do eritrócito, principalmente pela contribuição da esfingomielina assimétrica (ácido lignocérico, 24:0). Entretanto os ácidos graxos das DRMs de Brij 98 e Brij 58

mostraram-se ligeiramente menos saturados do que os ácidos graxos das DRMs de TX-100, resultado compatível com a maior fluidez das frações de membrana de Brij (ver abaixo).

- O tamanho das DRMs de Brij 58 e TX-100, determinados por espalhamento de luz dinâmico, situam-se entre 100-300 nm de diâmetro, compatível com outras descrições de *lipid rafts*/DRMs na literatura (Pike et al., 2004; Koumanov et al., 2005). DRMs de Brij 98 mostraram-se maiores (diâmetro = 970 nm).

- Mesmo após a remoção de cerca de 40% do colesterol da membrana eritrocitária, DRMs foram obtidas com a mesma propriedade de baixa densidade, em gradiente de sacarose. No entanto, essa redução no conteúdo de colesterol promoveu uma diminuição na quantidade proteica das DRMs de Brij 98.

- As proteínas marcadoras de lipid rafts, flotilina-2 e estomatina, foram detectadas nas DRMs de Brij 98 e Brij 58 nas duas condições de temperaturas testadas (4°C e 37°C). A diminuição do conteúdo de colesterol, promovida por M β CD em DRMs, resultou numa diminuição da associação de flotilina-2 nessas estruturas, revelando assim uma dependência dessa proteína por ambientes enriquecidos em colesterol, diferentemente da estomatina.

- Medidas de ressonância paramagnética eletrônica mostraram que o parâmetro de ordem das bicamadas das DRMs de Brij 98 e Brij 58 não é maior que o das membranas de eritrócito - reduzidas ou não de seu conteúdo de colesterol e em diferentes temperaturas de preparação (4°C e 37°C). Além disso, o estado líquido-ordenado parece ser determinado pelo enriquecimento de esfingolípídios associados ao colesterol presentes na monocamada externa da membrana conforme observamos somente em DRMs de TX-100.

No geral, esses dados mostraram que fosfolípídios saturados, especialmente esfingomielina, associados com colesterol formam domínios insolúveis a detergente na membrana de eritrócito humano. Apesar de não termos mostrado que esses DRMs são *lipid rafts* (domínios funcionais existentes *in vivo*), DRMs constituem bons modelos para o estudo dos *rafts* por sua semelhante composição e possibilidade de avaliar a

CONCLUSÃO

interação entre esfingolipídios, colesterol e proteínas específicas em biomembranas enriquecidas nessas frações. Além disso, o uso de Brij 98 e Brij 58, além de TX-100, pode fornecer um conhecimento mais detalhado da composição de DRMs e revelar interações lipídio-lipídio, proteína-proteína ou lipídio-proteína fundamental para a compreensão das membranas biológicas.

PERSPECTIVAS

- Analisar a composição lipídica das DRMs preparadas a 37°C.
- Testar a solubilidade dos lipídios das DRMs por meio do tratamento com detergente em vesículas unilamelares gigantes (GUVs) formadas a partir dos lipídios das DRMs.
- Decompor e analisar por simulação espectral os espectros de EPR de DRMs de Brij 98 e Brij 58, a fim de entender a origem do sinal imobilizado do marcador na bicamada.
- Estudar vias de sinalização celular dependentes de *lipid rafts* em eritrócitos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMED, S., BROWN, D. & LONDON, E. (1997). On the origin of sphingolipid/cholesterol-rich detergent-insoluble cell membranes: Physiological concentrations of cholesterol and sphingolipid induce formation of a detergent-insoluble, liquid-ordered lipid phase in model membranes. — *Biochem*, 36(36):10944-10953.
- AHYAYAUCH, H., COLLADO, M., GONI, F. & LICHTENBERG, D. (2009). Cholesterol reverts Triton X-100 preferential solubilization of sphingomyelin over phosphatidylcholine: A P-31-NMR study. — *Febs Letters*, 583(17):2859-2864.
- ALMEIDA, P. F. (2009). Thermodynamics of lipid interactions in complex bilayers. — *Biochim Biophys Acta*, 1788(1):72-85.
- AOAC (Association of Agricultural Chemists) (1995). Official methods of analysis of AOAC internacional. 16ªed. Arlington: AOAC Internacional, 2ºv.
- BAINES, A. J. (2010). The spectrin-ankyrin-4.1-adducin membrane skeleton: adapting eukaryotic cells to the demands of animal life. — *Protoplasma* 244:99-131.
- BATISTA, T. M., RIBEIRO, R. A., AMARAL, A. G., DE OLIVEIRA, C. A., BOSCHERO, A. C. & CARNEIRO, E. M. (2011). Taurine supplementation restores glucose and carbachol-induced insulin secretion in islets from low-protein diet rats: involvement of Ach-M3R, Synt 1 and SNAP-25 proteins. — *J Nutr Biochem*.
- BENGA, G. (2006). Water channel proteins: from their discovery in 1985 in Cluj-Napoca Romania. To the 2003 nobel Prize in Chemistry. — *Cell and Mol Biol*, 52(7):10-19.
- BENTING, J., RIETVELD, A., ANSORGE, I. & SIMONS, K. (1999). Acyl and alkyl chain length of GPI-anchors is critical for raft association in vitro. — *Febs Letters*, 462(1-2):47-50.
- BERG, J., TYMOCZKO, J. & STRYER, L. (2007). *Bioquímica*. — Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro. 6ªed.
- BEUTLER, E., WEST, C. & BLUME, K. G. (1976). The removal of leukocytes and platelets from whole blood. — *J Lab Clin Med*, 88(2):328-33.
- BINI, L., PACINI, S., LIBERATORI, S., VALENSIN, S., PELLEGRINI, M., RAGGIASCHI, R., PALLINI, V. & BALDARI, C. T. (2003). Extensive temporally regulated reorganization of the lipid raft proteome following T-cell antigen receptor triggering. — *Biochem J*, 369:301-9.
- BROWN, D.A. (2006). Lipid rafts, detergent-resistant membranes, and raft targeting signals. — *Physiology*, 21:430-439.
- BROWN, D. & LONDON, E. (1998). Functions of lipid rafts in biological membranes. — *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 14:111-136.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BROWN, D. A. & ROSE, J. K. (1992). Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. — *Cell*, 68:533-44.
- BROWN, R. E., JARVIS, K. L. & HYLAND, K. J. (1989). Protein measurement using bicinchoninic acid: elimination of interfering substances. — *Anal Biochem*, 180:136-9.
- BRÜGGER, B., GRAHAM, C., LEIBRECHT, I., MOMBELLI, E., JEN, A., WIELAND, F. & MORRIS, R. (2004). The membrane domains occupied by glycosylphosphatidylinositol-anchored prion protein and Thy-1 differ in lipid composition. — *J Biol Chem*, 279:7530-6.
- CASSERA, M. B., SILBER, A. M. & GENNARO, A. M. (2002). Differential effects of cholesterol on acyl chain order in erythrocyte membranes as a function of depth from the surface. An electron paramagnetic resonance (EPR) spin label study. — *Biophys Chem*, 99:117-27.
- CHASIS, J. A. & SHOHEIT, S. B. (1987). Red cell biochemical anatomy and membrane properties. — *Annu Rev Physiol*, 49:237-48.
- CHEN, X., JAYNE LAWRENCE, M., BARLOW, D., MORRIS, R., HEENAN, R. & QUINN, P. (2009a). The structure of detergent-resistant membrane vesicles from rat brain cells. — *Biochim Biophys Acta*, 1788:477-83.
- CHEN, X., JEN, A., WARLEY, A., LAWRENCE, M., QUINN, P. & MORRIS, R. (2009b). Isolation at physiological temperature of detergent-resistant membranes with properties expected of lipid rafts: the influence of buffer composition. — *Biochem J*, 417:525-33.
- CHICHILI, G. & RODGERS, W. (2009). Cytoskeleton-membrane interactions in membrane raft structure. — *Cell Mol Life Sci*, 66:2319-28.
- CIANA, A., ACHILLI, C., BALDUINI, C. & MINETTI, G. (2011). On the association of lipid rafts to the spectrin skeleton in human erythrocytes. — *Biochim Biophys Acta*, 1808:183-90.
- CIANA, A., BALDUINI, C. & MINETTI, G. (2005). Detergent-resistant membranes in human erythrocytes and their connection to the membrane-skeleton. — *Journal of Biosciences*, 30(3):317-328.
- CONNOR, J., GILLUM, K. & SCHROIT, A. J. (1990). Maintenance of lipid asymmetry in red blood cells and ghosts: effect of divalent cations and serum albumin on the transbilayer distribution of phosphatidylserine. — *Biochim Biophys Acta*, 1025:82-6.
- CONTRERAS, F., SANCHEZ-MAGRANER, L., ALONSO, A. & GONI, F. (2010). Transbilayer (flip-flop) lipid motion and lipid scrambling in membranes. — *Febs Letters*, 584(9):1779-1786.
- COOPER, G. M. (1997). The cell surface. In: *The cell: a molecular approach*. — ASM Press, Washington.
- CREPALDI DOMINGUES, C., CIANA, A., BUTTAFAVA, A., BALDUINI, C., DE PAULA, E. & MINETTI, G. (2009). Resistance of Human Erythrocyte Membranes to Triton X-100 and C₁₂E₈. — *Journal of Membrane Biology*, 227:39-48.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CZOGALLA, A. & SIKORSKI, A. F. (2010). Do we already know how spectrin attracts ankyrin? — *Cell Mol Life Sci*, 67:2679-83.
- DANIELS, G. (2007). Functions of red cell surface proteins. — *Vox Sang*, 93:331-40.
- DATTA, D. (1987). A comprehensive introduction to membrane biochemistry. — Floral Publishing, Madison, WI.
- DELAUNAY, J., BRETON, M., TRUGNAN, G. & MAURICE, M. (2008). Differential solubilization of inner plasma membrane leaflet components by Lubrol WX and Triton X-100. — *Biochim Biophys Acta*, 1778:105-12.
- DEVAUX, P. F., HERRMANN, A., OHLWEIN, N. & KOZLOV, M. M. (2008). How lipid flippases can modulate membrane structure. — *Biochim Biophys Acta*, 1778:1591-600.
- DIAKOWSKI, W., OZIMEK, Ł., BIELSKA, E., BEM, S., LANGNER, M. & SIKORSKI, A. F. (2006). Cholesterol affects spectrin-phospholipid interactions in a manner different from changes resulting from alterations in membrane fluidity due to fatty acyl chain composition. — *Biochim Biophys Acta*, 1758:4-12.
- DIETRICH, C., BAGATOLLI, L., VOLOVYK, Z., THOMPSON, N., LEVI, M., JACOBSON, K. & GRATTON, E. (2001). Lipid rafts reconstituted in model membranes. — *Biophysical Journal*, 80(3):1417-1428.
- DODGE, J. T., MITCHELL, C. & HANAHAN, D. J. (1963). The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghosts of human erythrocytes. — *Arch Biochem Biophys*, 100:119-30.
- DOMINGUES, C., CIANA, A., BUTTAFAVA, A., CASADEI, B., BALDUINI, C., DE PAULA, E. & MINETTI, G. (2010). Effect of cholesterol depletion and temperature on the isolation of detergent-resistant membranes from human erythrocytes. — *J Membr Biol*, 234:195-205.
- DOMINGUES, C., MALHEIROS, S. & PAULA, E. (2008). Solubilization of human erythrocyte membranes by ASB detergents. — *Braz J Med Biol Res*, 41:758-64.
- DOMINGUES, C. C. (2009). Isolamento e caracterização de membranas eritrócitárias resistentes a detergentes. — Tese de Doutorado - Universidade Estadual de Campinas.
- DOUGLASS, A. & VALE, R. (2005). Single-molecule microscopy reveals plasma membrane microdomains created by protein-protein networks that exclude or trap signaling molecules in T cells. — *Cell*, 121:937-50.
- DREVOT, P., LANGLET, C., GUO, X. J., BERNARD, A. M., COLARD, O., CHAUVIN, J. P., LASSERRE, R. & HE, H. T. (2002). TCR signal initiation machinery is pre-assembled and activated in a subset of membrane rafts. — *EMBO J*, 21:1899-908.
- ELLENA, J. F., ARCHER, S. J., DOMINEY, R. N., HILL, B. D. & CAFISO, D. S. (1988). Localizing the nitroxide group of fatty acid and voltage-sensitive spin-labels in phospholipid bilayers. — *Biochim Biophys Acta*, 940:63-70.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- FAN, J., SAMMALKORPI, M. & HAATAJA, M. (2010). Formation and regulation of lipid microdomains in cell membranes: theory, modeling, and speculation. — *Febs Letters*, 584:1678-84.
- FERNANDES MC, CORTEZ M, GERALDO YONEYAMA KA, STRAUS AH, YOSHIDA N, MORTARA RA. (2007). Novel strategy in *Trypanosoma cruzi* cell invasion: implication of cholesterol and host cell microdomains. *Int J Parasitol*, 37(13):1431-41.
- FILIPPOV, S., HRUBÝ, M., KONÁK, C., MACKOVÁ, H., SPÍRKOVÁ, M. & STEPÁNEK, P. (2008). Novel pH-responsive nanoparticles. — *Langmuir*, 24:9295-301.
- FOSTER, L. J., DE HOOG, C. L. & MANN, M. (2003). Unbiased quantitative proteomics of lipid rafts reveals high specificity for signaling factors. — *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100:5813-8.
- FRANZETTI, A., DI GENNARO, P., BESTETTI, G., LASAGNI, M., PITEA, D. & COLLINA, E. (2008). Selection of surfactants for enhancing diesel hydrocarbons-contaminated media bioremediation. — *J Hazard Mater*, 152:1309-16.
- FRYE, L. D. & EDIDIN, M. (1970). The rapid intermixing of cell surface antigens after formation of mouse-human heterokaryons. — *J Cell Sci*, 7:319-35.
- FUCHS, B., SCHILLER, J., SÜSS, R., ZSCHARNACK, M., BADER, A., MÜLLER, P., SCHÜRENBERG, M., BECKER, M. & SUCKAU, D. (2008). Analysis of stem cell lipids by offline HPTLC-MALDI-TOF MS. — *Anal Bioanal Chem*, 392:849-60.
- GALEMBECK, E., ALONSO, A. & MEIRELLES, N. C. (1998). Effects of polyoxyethylene chain length on erythrocyte hemolysis induced by poly[oxyethylene (n) nonylphenol] non-ionic surfactants. — *Chem Biol Interact*, 113:91-103.
- GALLAGHER, P. & FORGET, B. (2001). The red cell membrane. — In: Hematology (E. Beutler, M. A. Lichtman, B. S. Coller, T. J. Kipps & U. Selingsohn, eds). McGraw-Hill, New York.
- GARCIA-MANYES, S. & SANZ, F. (2010). Nanomechanics of lipid bilayers by force spectroscopy with AFM: a perspective. — *Biochim Biophys Acta*, 1798:741-9.
- GIL, C., CUBÍ, R., BLASI, J. & AGUILERA, J. (2006). Synaptic proteins associate with a sub-set of lipid rafts when isolated from nerve endings at physiological temperature. — *Biochem Biophys Res Commun*, 348:1334-42.
- GIOCONDI, M., YAMAMOTO, D., LESNIEWSKA, E., MILHIET, P., ANDO, T. & LE GRIMELLEC, C. (2010). Surface topography of membrane domains. — *Biochim Biophys Acta*, 1798:703-18.
- GLEBOV, O. O. & NICHOLS, B. J. (2004). Distribution of lipid raft markers in live cells. — *Biochem Soc Trans*, 32:673-5.
- GORTER, E. & GRENDL, F. (1925). On bimolecular layers of lipoids on the chromocytes of the blood. — *J Exp Med*, 4:439-43.
- GRIFFIN, W. C. (1949). Classification of surface-active agents by HLB. — *J. Soc. Cosmet. Chem.*, 1:311-319.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- GRUENBERG, J. & VAN DER GOOT, F. G. (2006). Mechanisms of pathogen entry through the endosomal compartments. — *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7:495-504.
- HAIT, S. K. & MOULIK, S. P. (2001). Determination of Critical Micelle Concentration (CMC) of Nonionic Surfactants by Donor–Acceptor Interaction with Iodine and Correlation of CMC with Hydrophile–Lipophile Balance and Other Parameters of the Surfactants. — *Journal of Surfactants and Detergents*, 4(3):303-309.
- HANCOCK, J. (2006). Lipid rafts: contentious only from simplistic standpoints. — *Nature Reviews Mol Cell Biol*, 7(6):456-462.
- HE, H. T. & MARGUET, D. (2010). Detecting Nanodomains in Living Cell Membrane by Fluorescence Correlation Spectroscopy. — *Annu Rev Phys Chem*, 62:417-436
- HEERKLOTZ, H. (2002). Triton promotes domain formation in lipid raft mixtures. — *Biophysical Journal*, 83(5):2693-2701.
- HEERKLOTZ, H. (2008). Interactions of surfactants with lipid membranes. — *Q Rev Biophys*, 41:205-64.
- HEERKLOTZ, H. & SEELIG, J. (2000). Correlation of membrane/water partition coefficients of detergents with the critical micelle concentration. — *Biophys J*, 78:2435-40.
- HESS, S. T., KUMAR, M., VERMA, A., FARRINGTON, J., KENWORTHY, A. & ZIMMERBERG, J. (2005). Quantitative electron microscopy and fluorescence spectroscopy of the membrane distribution of influenza hemagglutinin. — *J Cell Biol*, 169:965-76.
- HOPE, H. R. & PIKE, L. J. (1996). Phosphoinositides and phosphoinositide-utilizing enzymes in detergent-insoluble lipid domains. — *Mol Biol Cell*, 7:843-51.
- HUBBELL, W. L. & MCCONNELL, H. M. (1971). Molecular motion in spin-labeled phospholipids and membranes. — *J Am Chem Soc*, 93:314-26.
- INGELMO-TORRES, M., GAUS, K., HERMS, A., GONZALEZ-MORENO, E., KASSAN, A., BOSCH, M., GREWAL, T., TEBAR, F., ENRICH, C. & POL, A. (2009). Triton X-100 promotes a cholesterol-dependent condensation of the plasma membrane. — *Biochemical Journal*, 420(3):373-381.
- JAKOP, U., FUCHS, B., SUSS, R., WIBBELT, G., BRAUN, B., MULLER, K. & SCHILLER, J. (2009). The solubilisation of boar sperm membranes by different detergents - a microscopic, MALDI-TOF MS, P-31 NMR and PAGE study on membrane lysis, extraction efficiency, lipid and protein composition. — *Lipids in Health and Disease*, 11:8-49.
- JANES, P., LEY, S. & MAGEE, A. (1999). Aggregation of lipid rafts accompanies signaling via the T cell antigen receptor. — *Journal of Cell Biol*, 147(2):447-461.
- JIN, S. & VERKMAN, A. S. (2007). Single particle tracking of complex diffusion in membranes: simulation and detection of barrier, raft, and interaction phenomena. — *J Phys Chem B*, 111:3625-32.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- JOHANSSON, F., OLBE, M., SOMMARIN, M. & LARSSON, C. (1995). Brij 58, a polyoxyethylene acyl ether, creates membrane vesicles of uniform sidedness. A new tool to obtain inside-out (cytoplasmic side-out) plasma membrane vesicles. — *Plant J*, 7:165-73.
- KAHYA, N. (2006). Targeting membrane proteins to liquid-ordered phases: molecular self-organization explored by fluorescence correlation spectroscopy. — *Chem Phys Lipids*, 141:158-68.
- KAMATA, K., MANNO, S., OZAKI, M. & TAKAKUWA, Y. (2008). Functional evidence for presence of lipid rafts in erythrocyte membranes: Gsalpha in rafts is essential for signal transduction. — *Am J Hematol*, 83:371-5.
- KAPOOR, Y. & CHAUHAN, A. (2008). Drug and surfactant transport in Cyclosporine A and Brij 98 laden p-HEMA hydrogels. — *J Colloid Interface Sci*, 322:624-33.
- KARNOVSKY, M. J., KLEINFELD, A. M., HOOVER, R. L. & KLAUSNER, R. D. (1982). The concept of lipid domains in membranes. — *J Cell Biol*, 94:1-6.
- KESSLER, R. J. & FANESTIL, D. D. (1986). Interference by lipids in the determination of protein using bicinchoninic acid. — *Anal Biochem*, 159:138-42.
- KIM, S. Y., WANG, T. K., SINGH, R. D., WHEATLEY, C. L., MARKS, D. L. & PAGANO, R. E. (2009). Proteomic identification of proteins translocated to membrane microdomains upon treatment of fibroblasts with the glycosphingolipid, C8-beta-D-lactosylceramide. — *Proteomics*, 9:4321-8.
- KLAMMT, C., SCHWARZ, D., FENDLER, K., HAASE, W., DÖTSCH, V. & BERNHARD, F. (2005). Evaluation of detergents for the soluble expression of alpha-helical and beta-barrel-type integral membrane proteins by a preparative scale individual cell-free expression system. — *FEBS J*, 272:6024-38.
- KOSHINO, I. & TAKAKUWA, Y. (2009). Disruption of lipid rafts by lidocaine inhibits erythrocyte invasion by *Plasmodium falciparum*. — *Exp Parasitol*, 123:381-3.
- KOUMANOV, K., TESSIER, C., MOMCHILOVA, A., RAINTEAU, D., WOLF, C. & QUINN, P. (2005). Comparative lipid analysis and structure of detergent-resistant membrane raft fractions isolated from human and ruminant erythrocytes. — *Arch Biochem Biophys*, 434:150-8.
- LAEMMLI, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. — *Nature*, 227:680-5.
- LANGHORST, M. F., JAEGER, F. A., MUELLER, S., SVEN HARTMANN, L., LUXENHOFER, G. & STUERMER, C. A. (2008). Reggies/flotillins regulate cytoskeletal remodeling during neuronal differentiation via CAP/ponsin and Rho GTPases. — *Eur J Cell Biol*, 87:921-31.
- LANGHORST, M. F., REUTER, A. & STUERMER, C. A. (2005). Scaffolding microdomains and beyond: the function of reggie/flotillin proteins. — *Cell Mol Life Sci*, 62:2228-40.
- LE MAIRE, M., CHAMPEIL, P. & MOLLER, J. (2000). Interaction of membrane proteins and lipids with solubilizing detergents. — *Biochim Biophys Acta*, 1508:86-111.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- LEE, A., BIRDSALL, N., METCALFE, J., TOON, P. & WARREN, G. (1974). Clusters in lipid bilayers and the interpretation of thermal effects in biological membranes. — *Biochemistry*, 13:3699-705.
- LEIDL, K., LIEBISCH, G., RICHTER, D. & SCHMITZ, G. (2008). Mass spectrometric analysis of lipid species of human circulating blood cells. — *Biochim Biophys Acta*, 1781:655-64.
- LENNE, P., WAWREZINIECK, L., CONCHONAUD, F., WURTZ, O., BONED, A., GUO, X., RIGNEAULT, H., HE, H. & MARGUET, D. (2006). Dynamic molecular confinement in the plasma membrane by microdomains and the cytoskeleton meshwork. — *EMBO J*, 25:3245-56.
- LICHTENBERG, D. (1985). Characterization of the solubilization of lipid bilayers by surfactants. — *Biochim Biophys Acta*, 821:470-8.
- LICHTENBERG, D., GONI, F. & HEERKLOTZ, H. (2005). Detergent-resistant membranes should not be identified with membrane rafts. — *Trends in Biochemical Sciences*, 30(8):430-436.
- LICHTENBERG, D., OPATOWSKI, E. & KOZLOV, M. M. (2000). Phase boundaries in mixtures of membrane-forming amphiphiles and micelle-forming amphiphiles. — *Biochim Biophys Acta*, 1508:1-19.
- LILLEMEIER, B., PFEIFFER, J., SURVILADZE, Z., WILSON, B. & DAVIS, M. (2006). Plasma membrane-associated proteins are clustered into islands attached to the cytoskeleton. — *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103:18992-7.
- LINGWOOD, D., KAISER, H., LEVENTAL, I. & SIMONS, K. (2009). Lipid rafts as functional heterogeneity in cell membranes. — *Biochem Soc Transact*, 37(5):955-960.
- LOCKE, D., LIU, J. & HARRIS, A. L. (2005). Lipid rafts prepared by different methods contain different connexin channels, but gap junctions are not lipid rafts. — *Biochemistry*, 44:13027-42.
- LOMMERSE, P. H., BLAB, G. A., COGNET, L., HARMS, G. S., SNAAR-JAGALSKA, B. E., SPAINK, H. P. & SCHMIDT, T. (2004). Single-molecule imaging of the H-ras membrane-anchor reveals domains in the cytoplasmic leaflet of the cell membrane. — *Biophys J*, 86:609-16.
- LOW, T. Y., SEOW, T. K. & CHUNG, M. C. (2002). Separation of human erythrocyte membrane associated proteins with one-dimensional and two-dimensional gel electrophoresis followed by identification with matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry. — *Proteomics*, 2:1229-39.
- LUNA, E., NEBL, T., TAKIZAWA & CROWLEY, J. (2005). Lipid raft membrane skeletons. — Humana Press, Totowa, NJ.
- MACDONALD, J. L. & PIKE, L. J. (2005). A simplified method for the preparation of detergent-free lipid rafts. — *J Lipid Res*, 46:1061-7.
- MACHÁN, R. & HOF, M. (2010). Lipid diffusion in planar membranes investigated by fluorescence correlation spectroscopy. — *Biochim Biophys Acta-Biomembranes*, 1798(7):1377-1391.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- MAIER, A. G., COOKE, B. M., COWMAN, A. F. & TILLEY, L. (2009). Malaria parasite proteins that remodel the host erythrocyte. — *Nat Rev Microbiol*, 7:341-54.
- MAIRHOFER, M., STEINER, M., SALZER, U. & PROHASKA, R. (2009). Stomatin-like protein-1 interacts with stomatin and is targeted to late endosomes. — *J Biol Chem*, 284:29218-29.
- MALHEIROS, S. V., MEIRELLES, N. C. & DE PAULA, E. (2000). Pathways involved in trifluoperazine-, dibucaine- and praziquantel-induced hemolysis. — *Biophys Chem*, 83:89-100.
- MALHEIROS, S. V., PINTO, L. M., GOTTARDO, L., YOKAICHIYA, D. K., FRACETO, L. F., MEIRELLES, N. C. & DE PAULA, E. (2004). A new look at the hemolytic effect of local anesthetics, considering their real membrane/water partitioning at pH 7.4. — *Biophys Chem*, 110:213-21.
- MALÍNSKÁ, K., MALÍNSKÝ, J., OPEKAROVÁ, M. & TANNER, W. (2003). Visualization of protein compartmentation within the plasma membrane of living yeast cells. — *Mol Biol Cell*, 14:4427-36.
- MANDAL, D., BAUDIN-CREUZA, V., BHATTACHARYYA, A., PATHAK, S., DELAUNAY, J., KUNDU, M. & BASU, J. (2003). Caspase 3-mediated proteolysis of the N-terminal cytoplasmic domain of the human erythroid anion exchanger 1 (band 3). — *J Biol Chem*, 278:52551-8.
- MAZA PK, STRAUS AH, TOLEDO MS, TAKAHASHI HK, SUZUKI E. (2008). Interaction of epithelial cell membrane rafts with *Paracoccidioides brasiliensis* leads to fungal adhesion and Src-family kinase activation. *Microbes Infect*, 10(5):540-7.
- MIKHALYOV, I. & SAMSONOV, A. (2011). Lipid raft detecting in membranes of live erythrocytes. — *Biochim Biophys Acta*, 1808:1930-9.
- MOFFETT, S., BROWN, D. & LINDER, M. (2000). Lipid-dependent targeting of G proteins into rafts. — *Journal of Biological Chemistry*, 275(3):2191-2198.
- MOHANDAS, N. & GALLAGHER, P. G. (2008). Red cell membrane: past, present, and future. — *Blood*, 112(10):3939-48.
- MONTEL-HAGEN, A., KINET, S., MANEL, N., MONGELLAZ, C., PROHASKA, R., BATTINI, J. L., DELAUNAY, J., SITBON, M. & TAYLOR, N. (2008). Erythrocyte Glut1 triggers dehydroascorbic acid uptake in mammals unable to synthesize vitamin C. — *Cell*, 132:1039-48.
- MONTGOMERY, R. (1994). *Bioquímica – Uma abordagem Dirigida por Casos*. —, São Paulo.
- MORROW, I. & PARTON, R. (2005). Flotillins and the PHB domain protein family: rafts, worms and anaesthetics. — *Traffic*, 6:725-40.
- MRÓWCZYŃSKA, L., SALZER, U., PERUTKOVÁ, S., IGLIČ, A. & HÄGERSTRAND, H. (2010). Echinophilic proteins stomatin, sorcin, and synexin locate outside gangliosideM1 (GM1) patches in the erythrocyte membrane. — *Biochem Biophys Res Commun*, 401:396-400.
- MURADOR, P. & DEFFUNE, E. (2007). Aspectos estruturais da membrana eritrocitária. — *Rev. Bras Hematol Hemoter*, 29(2):168-178.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- MURPHY, S. C., FERNANDEZ-POL, S., CHUNG, P. H., PRASANNA MURTHY, S. N., MILNE, S. B., SALOMAO, M., BROWN, H. A., LOMASNEY, J. W., MOHANDAS, N. & HALDAR, K. (2007). Cytoplasmic remodeling of erythrocyte raft lipids during infection by the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. — *Blood*, 110:2132-9.
- MURPHY, S. C., SAMUEL, B. U., HARRISON, T., SPEICHER, K. D., SPEICHER, D. W., REID, M. E., PROHASKA, R., LOW, P. S., TANNER, M. J., MOHANDAS, N. & HALDAR, K. (2004). Erythrocyte detergent-resistant membrane proteins: their characterization and selective uptake during malarial infection. — *Blood*, 103:1920-8.
- NELSON, D. & COX, M. (2006). *Lehninger Princípios de Bioquímica*. — Editora Sarvier, São Paulo.
- NEUMANN-GIESEN, C., FALKENBACH, B., BEICHT, P., CLAASEN, S., LÜERS, G., STUERMER, C., HERZOG, V. & TIKKANEN, R. (2004). Membrane and raft association of reggie-1/flotillin-2: role of myristoylation, palmitoylation and oligomerization and induction of filopodia by overexpression. — *Biochem J*, 378:509-18.
- NIU, S. L. & LITMAN, B. J. (2002). Determination of membrane cholesterol partition coefficient using a lipid vesicle-cyclodextrin binary system: effect of phospholipid acyl chain unsaturation and headgroup composition. — *Biophys J*, 83:3408-3415.
- OWEN, D., WILLIAMSON, D., RENTERO, C. & GAUS, K. (2009). Quantitative microscopy: protein dynamics and membrane organisation. — *Traffic*, 10:962-971.
- PIKE, L. (2004). Lipid rafts: heterogeneity on the high seas. — *Biochemical Journal*, 378(2):281-292.
- PIKE, L. (2006). Rafts defined: a report on the Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function. — *Journal of Lipid Research*, 47(7):1597-1598.
- PIKE, L. (2009). The challenge of lipid rafts. — *J Lipid Res*, 50:S323-S328.
- PIKE, L. J., HAN, X. & GROSS, R. W. (2005). Epidermal growth factor receptors are localized to lipid rafts that contain a balance of inner and outer leaflet lipids: a shotgun lipidomics study. — *J Biol Chem*, 280:26796-804.
- POLOZOV, I. V. & GAWRISCH, K. (2004). Domains in binary SOPC/POPE lipid mixtures studied by pulsed field gradient ¹H MAS NMR. — *Biophys J*, 87:1741-51.
- POMORSKI, T. & MENON, A. (2006). Lipid flippases and their biological functions. — *Cellular and Molecular Life Sciences*, 63(24):2908-2921.
- POPIK, W., ALCE, T. M. & AU, W. C. (2002). Human immunodeficiency virus type 1 uses lipid raft-colocalized CD4 and chemokine receptors for productive entry into CD4(+) T cells. — *J Virol*, 76:4709-22.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- PRALLE, A., KELLER, P., FLORIN, E., SIMONS, K. & HÖRBER, J. (2000). Sphingolipid-cholesterol rafts diffuse as small entities in the plasma membrane of mammalian cells. — *J Cell Biol*, 148:997-1008.
- PRETÉ, P. S., -MALHEIROS, S. V., MEIRELLES, N. C. & DE PAULA, E. (2002a). Quantitative assessment of human erythrocyte membrane solubilization by Triton X-100. — *Biophys Chem*, 97:1-5.
- PRETÉ, P. S., DOMINGUES, C. C., MEIRELLES, N. C., MALHEIROS, S. V., GOÑI, F. M., DE PAULA, E. & SCHREIER, S. (2011). Multiple stages of detergent-erythrocyte membrane interaction--a spin label study. — *Biochim Biophys Acta*, 1808:164-70.
- PRETÉ, P. S., GOMES, K., MALHEIROS, S. V., MEIRELLES, N. C. & DE PAULA, E. (2002b). Solubilization of human erythrocyte membranes by non-ionic surfactants of the polyoxyethylene alkyl ethers series. — *Biophys Chem*, 97:45-54.
- PRETÉ, P. S. C. (2006). Solubilização de membranas eritrocitárias: análise quantitativa do efeito hemolítico induzido por surfatantes. — Tese de Doutorado - Universidade Estadual de Campinas.
- QIU, Y., WANG, Y., LAW, P. Y., CHEN, H. Z. & LOH, H. H. (2011). Cholesterol regulates μ -opioid receptor induced β -arrestin 2 translocation to membrane lipid rafts. — *Mol Pharmacol*, 80:210-218.
- QUINN, P. (2010). A lipid matrix model of membrane raft structure. — *Prog Lipid Res*, 49(4):390-406.
- RADEVA, G. & SHAROM, F. (2004). Isolation and characterization of lipid rafts with different properties from RBL-2H3 (rat basophilic leukaemia) cells. — *Biochemical Journal*, 380:219-230.
- RAJENDRAN, L., KNÖLKER, H. J. & SIMONS, K. (2010). Subcellular targeting strategies for drug design and delivery. — *Nat Rev Drug Discov*, 9:29-42.
- RAN, S., DOWNES, A. & THORPE, P. (2002). Increased exposure of anionic phospholipids on the surface of tumor blood vessels. — *Cancer Research*, 62(21):6132-6140.
- RIDYARD, M. & ROBBINS, S. (2003). Fibroblast growth factor-2-induced signaling through lipid raft-associated fibroblast growth factor receptor substrate 2 (FRS2). — *Journal of Biological Chemistry*, 278(16):13803-13809.
- RIVAS, M. G. & GENNARO, A. M. (2003). Detergent resistant domains in erythrocyte membranes survive after cell cholesterol depletion: an EPR spin label study. — *Chem Phys Lipids*, 122:165-9.
- ROSE, H. G. & OKLANDER, M. (1965). Improved procedure for the extraction of lipids from human erythrocytes. — *J Lipid Res*, 6:428-31.
- SACKMANN, E. (1995). Biological membranes architecture and function. — In: *Structure and Dynamics of Membranes* (R. Lipowski & S. Sackmann, eds). Elsevier, Amsterdam.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- SALAUN, C., GREAVES, J. & CHAMBERLAIN, L. H. (2010). The intracellular dynamic of protein palmitoylation. — *J Cell Biol*, 191:1229-38.
- SALZER, U. & PROHASKA, R. (2001). Stomatin, flotillin-1, and flotillin-2 are major integral proteins of erythrocyte lipid rafts. — *Blood*, 97:1141-3.
- SALZER, U., ZHU, R., LUTEN, M., ISOBE, H., PASTUSHENKO, V., PERKMANN, T., HINTERDORFER, P. & BOSMAN, G. J. (2008). Vesicles generated during storage of red cells are rich in the lipid raft marker stomatin. — *Transfusion*, 48:451-62.
- SAMUEL, B. U., MOHANDAS, N., HARRISON, T., MCMANUS, H., ROSSE, W., REID, M. & HALDAR, K. (2001). The role of cholesterol and glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins of erythrocyte rafts in regulating raft protein content and malarial infection. — *J Biol Chem*, 276:29319-29.
- SANTOS, H. & CIANCAGLINI, P. (2000). A practical approach to the choice of a suitable detergent and optimal conditions for solubilizing a membrane protein. — *Biochem Educ*, 28(3):178-182.
- SCHNITZER, J. & OH, P. (1996). Aquaporin-1 in plasma membrane and caveolae provides mercury-sensitive water channels across lung endothelium. — *Amer J of Physiology-Heart and Circul Physiol*, 270:H416-H422.
- SCHREIER, S., MALHEIROS, S. V. & DE PAULA, E. (2000). Surface active drugs: self-association and interaction with membranes and surfactants. Physicochemical and biological aspects. — *Biochim Biophys Acta*, 1508:210-34.
- SCHREIER, S., POLNASZEK, C. F. & SMITH, I. C. (1978). Spin labels in membranes. Problems in practice. — *Biochim Biophys Acta*, 515:395-436.
- SCHUCK, S., HONSHO, M., EKROOS, K., SHEVCHENKO, A. & SIMONS, K. (2003). Resistance of cell membranes to different detergents. — *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100:5795-800.
- SHAH, M. B. & SEHGAL, P. B. (2007). Nondetergent isolation of rafts. — *Methods Mol Biol*, 398:21-8.
- SHARMA, P., VARMA, R., SARASIJ, R. C., IRA, GOUSSET, K., KRISHNAMOORTHY, G., RAO, M. & MAYOR, S. (2004). Nanoscale organization of multiple GPI-anchored proteins in living cell membranes. — *Cell*, 116:577-89.
- SHEETZ, M. P. & SINGER, S. J. (1974). Biological membranes as bilayer couples. A molecular mechanism of drug-erythrocyte interactions. — *Proc Natl Acad Sci U S A*, 71:4457-61.
- SILVIUS, J. (2003). Role of cholesterol in lipid raft formation: lessons from lipid model systems. — *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes*, 1610(2):174-183.
- SIMONS, K. & GERL, M. (2010). Revitalizing membrane rafts: new tools and insights. — *Nature Reviews Mol Cell Biol*, 11(10):688-699.
- SIMONS, K. & IKONEN, E. (1997). Functional rafts in cell membranes. — *Nature*, 387(6633):569-572.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- SIMONS, K. & VAN MEER, G. (1988). Lipid sorting in epithelial-cells. — *Biochemistry*, 27(17):6197-6202.
- SIMONS, K. & VAZ, W. L. (2004). Model systems, lipid rafts, and cell membranes. — *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 33:269-95.
- SINGER, S. & NICOLSON, G. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. — *Science*, 175:720-31.
- SMART, E. J., YING, Y. S., MINEO, C. & ANDERSON, R. G. (1995). A detergent-free method for purifying caveolae membrane from tissue culture cells. — *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92:10104-8.
- SONG, K. S., LI SHENGWEN, OKAMOTO, T., QUILLIAM, L. A., SARGIACOMO, M. & LISANTI, M. P. (1996). Co-purification and direct interaction of Ras with caveolin, an integral membrane protein of caveolae microdomains. Detergent-free purification of caveolae microdomains. — *J Biol Chem*, 271:9690-7.
- SOT, J., BAGATOLLI, L. A., GOÑI, F. M. & ALONSO, A. (2006). Detergent-resistant, ceramide-enriched domains in sphingomyelin/ceramide bilayers. — *Biophys J*, 90:903-14.
- SOT, J., COLLADO, M., ARRONDO, J., ALONSO, A. & GONI, F. (2002). Triton X-100-resistant bilayers: effect of lipid composition and relevance to the raft phenomenon. — *Langmuir*, 18:2828-2835.
- SOWMIYA, M., TIWARI, A. K. & SAHA, S. K. (2010). Fluorescent probe studies of micropolarity, premicellar and micellar aggregation of non-ionic Brij surfactants. — *J Colloid Interface Sci*, 344: 97-104.
- STANISLAS, T., BOUYSSIE, D., ROSSIGNOL, M., VESA, S., FROMENTIN, J., MOREL, J., PICHEREAUX, C., MONSARRAT, B. & SIMON-PLAS, F. (2009). Quantitative proteomics reveals a dynamic association of proteins to detergent-resistant membranes upon elicitor signaling in tobacco. — *Mol Cell Proteomics*, 8:2186-98.
- STAUBACH, S. & HANISCH, F. G. (2011). Lipid rafts: signaling and sorting platforms of cells and their roles in cancer. — *Expert Rev Proteomics*, 8:263-77.
- STORCH, J. & KLEINFELD, A. (1985). The lipid structure of biological membranes. — *Trends Biochem Sci*, 10:418-421
- SUBCZYNSKI, W. & KUSUMI, A. (2003). Dynamics of raft molecules in the cell and artificial membranes: approaches by pulse EPR spin labeling and single molecule optical microscopy. — *Biochim Biophys Acta*, 1610:231-43.
- SUBCZYNSKI, W., WIDOMSKA, J. & FEIX, J. (2009). Physical properties of lipid bilayers from EPR spin labeling and their influence on chemical reactions in a membrane environment. — *Free Radic Biol Med*, 46:707-18.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- SUZUKI E, TANAKA AK, TOLEDO MS, LEVERY SB, STRAUS AH, TAKAHASHI HK. (2008). Trypanosomatid and fungal glycolipids and sphingolipids as infectivity factors and potential targets for development of new therapeutic strategies. *Biochim Biophys Acta*. 1780(3):362-9.
- TANAKA AK, GORIN PA, TAKAHASHI HK, STRAUS AH. (2007). Role of *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* amastigote glycosphingolipids in macrophage infectivity. *Braz J Med Biol Res*. 40(6):799-806.
- TOLEDO, M. S., SUZUKI, E., HANDA, K. & HAKOMORI, S. (2004). Cell growth regulation through GM3-enriched microdomain (glycosynapse) in human lung embryonal fibroblast WI38 and its oncogenic transformant VA13. — *J Biol Chem*, 279:34655-64.
- TOLEDO, M. S., SUZUKI, E., STRAUS, A. H. & TAKAHASHI, H. K. (1995). Glycolipids from *Paracoccidioides brasiliensis*. Isolation of a galactofuranose-containing glycolipid reactive with sera of patients with paracoccidioidomycosis. — *J Med Vet Mycol*, 33:247-51.
- VAN MEER, G., VOELKER, D. R. & FEIGENSON, G. W. (2008). Membrane lipids: where they are and how they behave. — *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9:112-24.
- VEATCH, S. & KELLER, S. (2002). Organization in lipid membranes containing cholesterol. — *Phys Rev Lett*, 89:268101.
- VEATCH, S. & KELLER, S. (2005). Seeing spots: Complex phase behavior in simple membranes. — *Biochim Biophys Acta-Molecular Cell Research*, 1746(3):172-185.
- VEATCH, S. L., POLOZOV, I. V., GAWRISCH, K. & KELLER, S. L. (2004). Liquid domains in vesicles investigated by NMR and fluorescence microscopy. — *Biophys J*, 86:2910-22.
- WAUGH, M. & HSUAN, J. (2009). Preparation of membrane rafts.—*Methods Mol Biol*, 462:403-14.
- WILSON, B. S., PFEIFFER, J. R. & OLIVER, J. M. (2000). Observing FcepsilonRI signaling from the inside of the mast cell membrane. — *J Cell Biol*, 149:1131-42.
- WIŚNIEWSKA, A., DRAUS, J. & SUBCZYNSKI, W. (2003). Is a fluid-mosaic model of biological membranes fully relevant? Studies on lipid organization in model and biological membranes. — *Cell Mol Biol Lett*, 8:147-59.
- WUNDERLICH, F., KREUTZ, W., MAHLER, P., RONAI, A. & HEPPELER, G. (1978). Thermotropic fluid goes to ordered "discontinuous" phase separation in microsomal lipids of *Tetrahymena*. An X-ray diffraction study. — *Biochemistry*, 17:2005-10.
- WUNDERLICH, F., RONAI, A., SPETH, V., SEELIG, J. & BLUME, A. (1975). Thermotropic lipid clustering in *tetrahymena* membranes. — *Biochemistry*, 14:3730-5.
- WYDRO, P. (2011a). The interactions between cholesterol and phospholipids located in the inner leaflet of human erythrocytes membrane (DPPE and DPPS) in binary and ternary films--the effect of sodium and calcium ions. — *Coll Surf B Bioint*, 82:209-16.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

WYDRO, P. (2011b). The magnitude of condensation induced by cholesterol on the mixtures of sphingomyelin with phosphatidylcholines-Study on ternary and quaternary systems. — *Colloids Surf B Biointer*, 82:594-601.

YEAGLE, P. (2005). *The Structure of cell membranes*. — CRC Press, Boca Raton.

YOUNG, R., ZHENG, X., HOLOWKA, D. & BAIRD, B. (2005). Reconstitution of regulated phosphorylation of Fc epsilon RI by a lipid raft-excluded protein-tyrosine phosphatase. — *J Biol Chem*, 280(2):1230-1235.

YU, J., FISCHMAN, D. A. & STECK, T. L. (1973). Selective solubilization of proteins and phospholipids from red blood cell membranes by nonionic detergents. — *J Supramol Struct*, 1:233-48.

YWAZAKI CY, MAZA PK, SUZUKI E, TAKAHASHI HK, STRAUS AH. (2011). Role of host glycosphingolipids on *Paracoccidioides brasiliensis* adhesion. — *Mycopathologia*, 171(5):325-32.

ZHENG, Y. & FOSTER, L. (2009). Contributions of quantitative proteomics to understanding membrane microdomains. — *J Lipid Res*, 50(10):1876:1985.

ANEXOS

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha dissertação de Mestrado/tese de Doutorado intitulada Estudo de membranas eritrocitárias resistentes à detergentes da serie éter de polioxietileno (Brij):

() não se enquadra no § 3º do Artigo 1º da Informação CCPG 01/08, referente a bioética e biossegurança.

Tem autorização da(s) seguinte(s) Comissão(ões):

() CIBio – Comissão Interna de Biossegurança , projeto No. _____, Instituição: _____

() CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais , projeto No. _____, Instituição: _____

(X) CEP - Comissão de Ética em Pesquisa, protocolo No. 227/2009, Instituição: Faculdade de Ciências Médicas – UNICAMP.

** Caso a Comissão seja externa ao IB/UNICAMP, anexar o comprovante de autorização dada ao trabalho. Se a autorização não tiver sido dada diretamente ao trabalho de tese ou dissertação, deverá ser anexado também um comprovante do vínculo do trabalho do aluno com o que constar no documento de autorização apresentado.*

Bruna Renata Casadei

Aluna: Bruna Renata Casadei

Eneida de Paula

Orientadora: Eneida de Paula

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(X) Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura

Dr.ª. Carmen Silva Pert...
Vice-Presidente do
Comitê de Ética em
FCM/UNICAMP
Matrícula: 28456-6

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

() Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura