

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

*Elizabeth Sousa da Cunha*



**EFEITO DE SURFATANTES E MODIFICAÇÕES  
METODOLÓGICAS NA SOLUBILIZAÇÃO DE MEMBRANA  
MITOCONDRIAL INTERNA DE RATOS ANALISADA POR  
ELETROFORESE NATIVA E BIDIMENSIONAL**

Este exemplar corresponde à redação final  
da tese defendida pelo(a) candidato (a)  
*Elizabeth Sousa da Cunha*  
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: Profa. Dra. Eneida de Paula**

2007

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

**C914e**

Cunha, Elizabeth Sousa da  
Efeito de surfatantes e modificações metodológicas na solubilização de membrana mitocondrial interna de ratos analisada por eletroforese nativa e bidimensional / Elizabeth Sousa da Cunha. – Campinas, SP: [s.n.], 2008.

Orientadora: Eneida de Paula.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Eletroforese. 2. Mitocôndria. 3. Proteínas de membrana. 4. Agentes ativos de superfícies. 5. Solubilização. I. Paula, Eneida de. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

**Título em inglês:** Effect of surfactants and methodologic alterations in the rat inner mitochondrial membrane solubilization analysed by native and two dimensional electrophoresis.

**Palavras-chave em inglês:** Electrophoresis; Mitochondria; Membrane proteins; Surface active agents; Solubilization.

**Área de concentração:** Bioquímica.

**Titulação:** Mestre em Biologia Funcional e Molecular.

**Banca examinadora:** Eneida de Paula, Pietro Ciancaglini, Denise Vaz de Macedo.

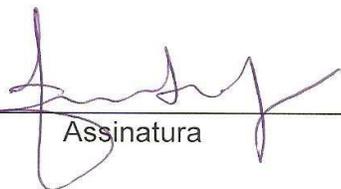
**Data da defesa:** 27/06/2008.

**Programa de Pós-Graduação:** Biologia Funcional e Molecular.

Data da Defesa: 27/06/2008

BANCA EXAMINADORA

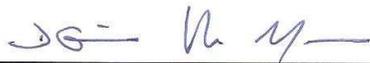
Profa.Dra. Eneida de Paula  
(Orientadora)



---

Assinatura

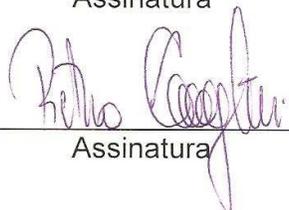
Profa.Dra. Denise Vaz de Macedo



---

Assinatura

Prof.Dr. Pietro Ciancaglini



---

Assinatura

Profa.Dra. Carmen Veríssima Ferreira

---

Assinatura

Profa.Dra. Maria Lúcia Bianconi

---

Assinatura

## **Agradecimentos**

À Deus, que sempre esteve presente na minha caminhada.

À minha orientadora Dra. Eneida de Paula pela orientação, apoio e confiança no meu trabalho.

Ao Cleyton, pela orientação, amizade, discussões, sugestões, diversão e apoio em todas as horas. Obrigado por tudo.

Aos meus pais, Maria e José, que sempre me apoiaram, me aconselharam, e deram todo o suporte para essa conquista. Obrigada pela compreensão nos momentos de ausência e por sempre olharem por mim.

Aos meus irmãos Renato, Patrícia e Beatriz e à minha sobrinha Bruna por compartilharem comigo mais um etapa.

Ao meu marido Hugo, pelo apoio, paciência e ombro amigo nas horas difíceis, pelo carinho, confiança e incentivo. Muito obrigado por compartilhar comigo mais essa conquista.

Aos companheiros do Biomembranas e agregados: Marcelo Bispo, Carol, Roberta A., Roberta R., Maribel, D. Cida, Márcio, Cíntia, Giovana Tófoli, André, Juliana nardi, Juliana Mattoso, Neto, Paulinho Baldasso, Pô, Nono, Leo, Ana Cláudia, Josi, Dani. Obrigado pelos momentos de trabalho e amizade.

Aos colegas de outros laboratórios: Érica, Fernanda, Paulo, Ana, Rodrigo, Danilo, Thiago, Fernando, Paula pelo apoio técnico, momentos de trabalho e diversão.

Ao Profs. José Camillo, Denise Vaz de Macedo e Hiroshi por disponibilizar o uso de alguns equipamentos em seu laboratório.

Às secretárias Andréa e Marina por todo o apoio burocrático e pela amizade.

Às minhas amigas enfermeiras, que apesar da separação sempre estiveram presentes.

Às minhas amigas de Cubatão que mesmo à distância acompanharam a minha trajetória.

À minha segunda família Sônia, D. Maria, Leonardo e Leandro que mesmo à distância sempre torceram por mim.

À todos que compartilharam e contribuíram na minha formação.

À CAPES e FAPESP pelo suporte financeiro.

# ÍNDICE

	pág.
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b>vii</b>
<b>ÍNDICE DE TABELAS</b>	<b>x</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	<b>xiv</b>
<b>RESUMO</b>	<b>xv</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>xvi</b>
<b>I- INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
I. 1- Membranas biológicas e suas proteínas	<b>1</b>
I. 2- Mitocôndria	<b>3</b>
I.2.a - membrana mitocondrial	<b>6</b>
I.2.b - Cadeia de transportes de elétrons	<b>9</b>
I. 3 – Eletroforese	<b>12</b>
I.3.a- Eletroforese nativa	<b>12</b>
I.3.b- Eletroforese bidimensional	<b>14</b>
I. 4 - Solubilização de membranas biológicas e suas proteínas	<b>15</b>
I. 5 – Surfatantes	<b>20</b>
I.5.a- Surfatantes não-iônicos	<b>21</b>
I.5.b- Surfatantes iônicos	<b>22</b>
I.5.c- Surfatantes zwitteriônicos	<b>23</b>
<b>II- OBJETIVOS</b>	<b>26</b>
<b>III- MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>27</b>
III. 1 – Surfatantes	<b>27</b>
III. 2 – Animais	<b>27</b>
III. 3 - Preparação e extração da amostra	<b>27</b>
III. 4 - Dosagem protéica	<b>28</b>
III. 5 - Eletroforese Nativa	<b>29</b>
III.5.a – BN-PAGE: Método de Schägger & von Jagow	<b>30</b>
III. 5.b – Método de Laemmli e colaboradores	<b>30</b>
III. 5.c – Protocolo Modificado	<b>31</b>
III. 6 - Testes Enzimáticos	<b>32</b>
III. 7 - Validação do teste de SDS-Page	<b>33</b>
III. 8 - Eletroforese bidimensional	<b>33</b>

III.9 – Coloração por Comassie Blue	34
III.10 - Análise de imagens	34
III.11 - Análise dos surfatantes	34
III. 11.a – Eficiência	34
III. 11.b – Seletividade	35
<b>IV- RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>36</b>
IV. 1 - Determinação de um protocolo para eletroforese nativa	36
IV. 2 - Avaliação do protocolo por testes enzimáticos	41
IV. 3 - Avaliação dos surfatantes quanto à eficiência	43
IV. 4 - Perfil de eletroforese bidimensional de proteínas da MMI obtida com diversos surfatantes	45
IV. 4.a- Surfatantes zwitteriônicos	51
IV. 4.b- Surfatantes não-iônicos	59
IV. 4.c – Surfatante Aniônico	65
IV. 5 – Avaliação da seletividade dos surfatantes	68
IV. 6 - Avaliação da estabilidade da amostra	79
<b>V- CONCLUSÕES</b>	<b>82</b>
<b>VI- PERSPECTIVAS FUTURAS</b>	<b>85</b>
<b>VII- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>86</b>
<b>VIII- ANEXOS</b>	<b>99</b>

# ÍNDICE DE FIGURAS

		Pág.
Figura 1	Representação de uma membrana biológica segundo o modelo do mosaico fluido de Singer & Nicolson, (1972)	2
Figura 2	Compartimentos da mitocôndria.	5
Figura 3	Cadeia de Transporte de elétrons.	10
Figura 4	Estrutura da Enzima ATP sintase.	12
Figura 5	Esquema dos possíveis eventos envolvidos com um anfifílico surfatante sobre uma membrana biológica.	17
Figura 6	Estrutura química dos surfatantes não-iônicos utilizados nesse estudo. Dodecil maltosídeo (a), C <sub>12</sub> E <sub>8</sub> (b), Triton X-100 (c) e Digitonina (d).	22
Figura 7	Estrutura química do surfatante colato, um sal biliar utilizado nesse estudo.	23
Figura 8	Estrutura química dos surfatantes zwitteriônicos do tipo amidosulfobetáinas utilizados nesse estudo: ASB14 (a), ASB16 (b) e CHAPS (c).	24
Figura 9	Curva padrão de Albumina Soro-Bovina (BSA).	29
Figura 10	Perfil eletroforético (gel 1-D) de proteínas da MMI obtido de acordo com o protocolo de Laemmli et al (1970) (a), BN-PAGE (b), Protocolo modificado (c).	38
Figura 11	Perfil eletroforético (2-D) de proteínas da MMI obtido de acordo com o protocolo modificado descrito em Nijtmans <i>et al</i> , 2002 e então separadas em gel desnaturante (SDS-PAGE).	40
Figura 12	Teste de atividade enzimática da NADH desidrogenase (Zerbetto et al,1997).	42
Figura 13	Teste de atividade enzimática da ATP sintase (Zerbetto et al,1997).	43
Figura 14	Separação de proteínas da MMI por eletroforese bidimensional, solubilizadas no processo de purificação com 43,2 mM de Dodecil maltosídeo.	47
Figura 15	Separação de proteínas da MMI por eletroforese bidimensional, solubilizadas no processo de purificação com 43,2 mM de Dodecil maltosídeo e 65 mM de CHAPS, no processo de preparação para eletroforese.	49

Figura 16	Comparação dos “spots” de proteínas da MMI dos géis das figuras 14 e 15	50
Figura 17	Separação de proteínas da MMI eletroforese bidimensional, solubilizadas no processo de purificação com 43,2 mM de ASB-14; no processo de preparação para eletroforese foi adicionado 65 mM de CHAPS.	52
Figura 18	Separação de proteínas da MMI por eletroforese bidimensional, solubilizadas no processo de purificação com 43,2 mM de ASB-16 e, no processo de preparação para eletroforese, com 65 mM de CHAPS.	53
Figura 19	Separação de proteínas da MMI por eletroforese bidimensional, solubilizadas no processo de purificação com 43,2 mM de CHAPS e, no processo de preparação para eletroforese, foi adicionado mais 65 mM deste mesmo detergente.	54
Figura 20	Comparação dos “spots” de proteínas da MMI dos géis das figuras 15 e 17.	55
Figura 21	. Comparação dos “spots” de proteínas da MMI dos géis das figuras 15 e 18	56
Figura 22	Comparação dos “spots” de proteínas da MMI dos géis das figuras 15 e 19.	57
Figura 23	Separação de proteínas da MMI por eletroforese bidimensional, solubilizadas no processo de purificação com 43,2 mM de Digitonina e, no processo de preparação para eletroforese, com 65 mM de CHAPS.	59
Figura 24	Separação de proteínas da MMI por eletroforese bidimensional, solubilizadas no processo de purificação com 43,2 mM de C <sub>12</sub> E <sub>8</sub> e no processo de preparação para eletroforese foi adicionado 65 mM de CHAPS.	60
Figura 25	Separação de proteínas da MMI por eletroforese bidimensional, solubilizadas no processo de purificação com 43,2 mM de Triton X-100 e, no processo de preparação para eletroforese, com 65 mM de CHAPS.	61
Figura 26	Comparação dos “spots” de proteínas da MMI dos géis das figuras 15 e 23.	62
Figura 27	Comparação dos “spots” de proteínas da MMI dos géis das figuras 15 e 24.	63
Figura 28	Comparação dos “spots” de proteínas da MMI dos géis das figuras 15 e 25.	64
Figura 29	Separação de proteínas da MMI por eletroforese bidimensional, solubilizadas no processo de purificação com 43,2 mM de Colato de sódio e, no processo de preparação para eletroforese, com 65 mM de CHAPS.	66
Figura 30	Comparação dos “spots” de proteínas da MMI dos géis das figuras 15 e 29.	67
Figura 31	Perfil eletroforético (1-D) de proteínas da MMI, solubilizadas com detergentes zwitteriônicos (CHAPS, ASB 14 e ASB 16) e com dodecil	69

maltosídeo para comparação, de acordo com o novo protocolo aqui desenvolvido.

Figura 32	Visualização tridimensional do gel apresentado na figura 31.	71
Figura 33	Perfil eletroforético (1-D) de proteínas da MMI, solubilizadas com detergentes não-iônicos, de acordo com o protocolo modificado aqui apresentado.	73
Figura 34	Visualização tridimensional do gel apresentado na figura 33.	75
Figura 35	Perfil eletroforético (1-D) de proteínas da MMI, solubilizadas com o detergente colato de sódio, de acordo com protocolo modificado.	77
Figura 36	Visualização tridimensional do gel apresentado na figura 35.	78
Figura 37	Perfil eletroforético (1-D – SDS-PAGE) de proteínas da MMI recém-preparadas, 3 meses e 6 meses.	81

# ÍNDICE DE TABELAS

		Pág.
Tabela 1	Doenças relacionadas a proteínas de membrana da mitocôndria.	8
Tabela 2	Surfactantes usados para solubilização de enzimas, receptores e outras proteínas de membrana.	19
Tabela 3	Propriedades Físico-Químicas dos surfactantes estudados.	25
Tabela 4	Composições dos géis de corrida, stacking e de amostra, entre os métodos de Laemmli (1970), Schagger & von Jagow (1991) e protocolo modificado aqui proposto.	31
Tabela 5	Demonstrativo de preços do protocolo modificado e BN – PAGE.	39
Tabela 6	Valores de eficiência calculados de acordo com as concentrações protéicas presentes nas amostras solubilizadas de MMI.	44
Tabela 7	Valores de eficiência calculados de acordo com as concentrações protéicas presentes nas amostras solubilizadas de MMI.obtidas com diferentes surfactantes, na concentração de 43,2 mM.	45
Tabela 8	Síntese dos resultados obtidos com surfactantes zwitteriônicos.	58
Tabela 9	Síntese dos resultados obtidos com surfactantes não-iônicos.	65
Tabela 10	Valores aproximados de peso molecular, porcentagem de volume das bandas presentes no gel nativo realizado com proteínas da MMI, solubilizadas no processo de purificação com 43,2 mM de surfactantes zwitteriônicos (CHAPS, ASB-14 E ASB-16) ou Dodecil maltosídeo (DM).	70
Tabela 11	Varição porcentual no volume nas bandas presentes no gel nativo (valores normalizados a partir das medidas absolutas da Tabela 10) de proteínas da MMI, solubilizadas no processo de purificação com 43,2 mM de surfactantes zwitteriônicos (CHAPS, ASB-14 E ASB-16) ou Dodecil maltosídeo.	72
Tabela 12	Valores aproximados de peso molecular, porcentagem de intensidade e volume das bandas presentes no gel nativo realizado com proteínas da MMI, solubilizadas no processo de purificação com 43,2 mM de surfactantes não-iônicos.	74
Tabela 13	Varição porcentual no volume nas bandas presentes no gel nativo (valores normalizados a partir das medidas absolutas da Tabela 12) de proteínas da MMI, solubilizadas no processo de purificação com 43,2 mM de	75

Tabela 14	surfatantes não-iônicos (Digitonina, C <sub>12</sub> E <sub>8</sub> e Triton X-100). Valores aproximados de peso molecular, porcentagem de volume das bandas presentes no gel nativo realizado com proteínas da MMI, solubilizadas no processo de purificação com 43,2 mM de surfatante colato de sódio em comparação com dodecil maltosídeo.	78
Tabela 15	Varição porcentual no volume nas bandas presentes no gel nativo (valores normalizados a partir das medidas absolutas da Tabela 14) de proteínas da MMI, solubilizadas no processo de purificação com 43,2 mM de surfatante aniônicos (sal biliar – colato de sódio).	79
Tabela 16	Valores aproximados de pI e peso molecular dos spots presentes no gel realizado com proteínas da MMI, solubilizadas no processo de purificação com 43,2 mM de Dodecil maltosídeo.	99
Tabela 17	Valores aproximados de pI e peso molecular dos spots presentes no gel de proteínas da MMI, solubilizadas no processo de purificação com 43,2 mM de Dodecil maltosídeo e com 65mM de CHAPS no processo de preparação para eletroforese.	100
Tabela 18	Valores aproximados de pI e peso molecular dos spots presentes no gel de proteínas da MMI, solubilizadas, no processo de purificação com 43,2 mM de ASB-14, e com 65 mM de CHAPS no processo de preparação para eletroforese.	101
Tabela 19	Valores aproximados de pI e peso molecular dos spots presentes no gel preparado com proteínas da MMI, solubilizadas no processo de purificação com 43,2 mM de ASB-16 e, no processo de preparação para eletroforese, com 65 mM de CHAPS.	102
Tabela 20	Valores aproximados de pI e peso molecular dos spots presentes no gel preparado com proteínas da MMI, solubilizadas no processo de purificação com 43,2 mM de CHAPS e, no processo de preparação para eletroforese, com 65 mM deste mesmo detergente.	103
Tabela 21	Valores aproximados de pI e peso molecular dos spots presentes no gel preparado com proteínas da MMI, solubilizadas no processo de purificação com 43,2 mM de Digitonina e, no processo de preparação para eletroforese, com 65 mM de CHAPS.	104
Tabela 22	Valores aproximados de pI e peso molecular dos spots presentes no gel realizada com proteínas da MMI, solubilizadas no processo de purificação com 43,2 mM de C <sub>12</sub> E <sub>8</sub> e, no processo de preparação para eletroforese, com 65 mM de CHAPS.	105
Tabela 23	Valores aproximados de pI e peso molecular dos spots presentes no gel preparado com proteínas da MMI, solubilizadas no processo de purificação com 43,2 mM de Triton X-100 e, no processo de preparação para	106

	eletroforese, com 65 mM de CHAPS.	
Tabela 24	Valores aproximados de pI e peso molecular dos spots presentes no gel realizada com proteínas da MMI, solubilizadas no processo de purificação com 43,2 mM de Colato de sódio e, no processo de preparação para eletroforese, com 65 mM de CHAPS.	106
Tabela 25	Análise de “spots” similares (grifados) na faixa de pI 3 a 4 entre as tabelas 16 (dodecil maltosídeo) e 17(dodecil maltosídeo e CHAPS).	108
Tabela 26	Análise de “spots” similares (grifados) na faixa de pI 4 a 5 entre as tabelas 16 (dodecil maltosídeo) e 17 (dodecil maltosídeo e CHAPS).	109
Tabela 27	Análise de “spots” similares (grifados) na faixa de pI 4 a 5 entre as tabelas 16 (dodecil maltosídeo) e 17 (dodecil maltosídeo e CHAPS).	111
Tabela 28	Análise de “spots” similares (grifados) na faixa de pI 3 a 4 entre as tabelas 17 (dodecil maltosídeo + CHAPS) e 18 (ASB-14 e CHAPS).	112
Tabela 29	Análise de “spots” similares (grifados) na faixa de pI 4 a 5 entre as tabelas 17 (dodecil maltosídeo + CHAPS) e 18 (ASB-14 e CHAPS).	113
Tabela 30	Análise de “spots” similares (grifados) na faixa de pI 4 a 5 entre as tabelas 17 (dodecil maltosídeo + CHAPS) e 19 (ASB-16 e CHAPS).	114
Tabela 31	Análise de “spots” similares (grifados) na faixa de pI 5 a 6 entre as tabelas 17 (dodecil maltosídeo + CHAPS) e 19 (ASB-16 e CHAPS).	115
Tabela 32	Análise de “spots” similares (grifados) na faixa de pI 6 a 7 entre as tabelas 17 (dodecil maltosídeo + CHAPS) e 19 (ASB-16 e CHAPS).	116
Tabela 33	Análise de “spots” similares (grifados) na faixa de pI 7 a 8 entre as tabelas 17 (dodecil maltosídeo + CHAPS) e 19 (ASB-16 e CHAPS).	117
Tabela 34	Análise de “spots” similares (grifados) na faixa de pI 8 a 9 entre as tabelas 17 (dodecil maltosídeo + CHAPS) e 19 (ASB-16 e CHAPS).	118
Tabela 35	Análise de “spots” similares (grifados) na faixa de pI 9 a 10 entre as tabelas 17 (dodecil maltosídeo + CHAPS) e 19 (ASB-16 e CHAPS).	119
Tabela 36	Análise de “spots” similares (grifados) na faixa de pI 3 a 4 entre as tabelas 17 (dodecil maltosídeo + CHAPS) e 20 (CHAPS: 43,2 e 65mM).	120
Tabela 37	Análise de “spots” similares (grifados) na faixa de pI 4 a 5 entre as tabelas 17 (dodecil maltosídeo + CHAPS) e 20 (CHAPS: 43,2 e 65mM).	121
Tabela 38	Análise de “spots” similares (grifados) na faixa de pI 5 a 6 entre as tabelas 17 (dodecil maltosídeo + CHAPS) e 20 (CHAPS: 43,2 e 65mM).	122
Tabela 39	Análise de “spots” similares (grifados) na faixa de pI 8 a 9	123

	entre as tabelas 17 (dodecil maltosídeo + CHAPS) e 20 (CHAPS: 43,2 e 65mM).	
Tabela 40	Análise de “ <i>spots</i> ” similares (grifados) na faixa de pl 4 a 5 entre as tabelas 17 (dodecil maltosídeo + CHAPS) e 21 (Digitonina e CHAPS).	124
Tabela 41	Análise de “ <i>spots</i> ” similares (grifados) na faixa de pl 8 a 9 entre as tabelas 17 (dodecil maltosídeo + CHAPS) e 21 (Digitonina e CHAPS).	125
Tabela 42	Análise de “ <i>spots</i> ” similares (grifados) na faixa de pl 9 a 10 entre as tabelas 17 (dodecil maltosídeo + CHAPS) e 21 (Digitonina e CHAPS).	126
Tabela 43	Análise de “ <i>spots</i> ” similares (grifados) na faixa de pl 4 a 5 entre as tabelas 17 (dodecil maltosídeo + CHAPS) e 22 (C <sub>12</sub> E <sub>8</sub> e CHAPS).	127
Tabela 44	Análise de “ <i>spots</i> ” similares (grifados) na faixa de pl 5 a 6 entre as tabelas 17 (dodecil maltosídeo + CHAPS) e 23 (Triton X-100 e CHAPS).	128
Tabela 45	Análise de “ <i>spots</i> ” similares (grifados) na faixa de pl 6 a 7 entre as tabelas 17 (dodecil maltosídeo + CHAPS) e 23 (Triton X-100 e CHAPS).	129
Tabela 46	Análise de “ <i>spots</i> ” similares (grifados) na faixa de pl 9 a 10 entre as tabelas 17 (dodecil maltosídeo + CHAPS) e 23 (Triton X-100 e CHAPS).	130
Tabela 47	Análise de “ <i>spots</i> ” similares (grifados) na faixa de pl 4 a 5 entre as tabelas 17 (dodecil maltosídeo + CHAPS) e 24 (Colato de sódio e CHAPS).	131
Tabela 48	Análise de “ <i>spots</i> ” similares (grifados) na faixa de pl 6 a 7 entre as tabelas 17 (dodecil maltosídeo + CHAPS) e 24 (Colato de sódio e CHAPS).	132

## LISTA DE ABREVIATURAS

**ASB-14** - tetradecanoilamidopropildimetilamôniopropanosulfonato

**ASB-16** - hexadecanoilamidopropildimetilamôniopropanosulfonato

**BN-PAGE** – Eletroforese em gel nativo com corante comassie blue G-250.

**C<sub>12</sub>E<sub>8</sub>** - Polioxietileno-8-lauril-éter

**CHAPS** – 3-[(3-colamidopropil)-dimetilamônio]-1-propanosulfonato

**CMC** – Concentração micelar crítica

**CTAB** - Brometo de cetiltrimetilamônio

**DM** – Dodecil β-D maltosídeo

**DTT** – Ditioneitol

**EDTA** - Ácido etilenodiamino tetra-acético

**HLB** – Balanço hidrofílico lipofílico

**IEF** – Focalização Isoelétrica

**IPG** - Gradiente de pH imobilizado

**MMI** – Membrana mitocondrial interna

**MOPS** – Ácido 3-N-Morfolinosulfônico sódico

**PAGE** – Poliacrilamida gel de eletroforese

**PMSF** - Fenilmetanosulfonilfluorídeo

**SB 3-10** - Decanoilamidopropildimetilamôniopropanosulfonato

**SDS** – Dodecil sulfato de sódio

**TEMED** - Tetrametilenodiamina

**Triton X-100** – Octilfenoxipolietoxi etileno

## RESUMO

A mitocôndria é uma organela vital, pois em células aeróbicas, ela é responsável pela produção da maior parte da energia química necessária para a célula. A síntese de ATP ocorre por fosforilação oxidativa na Fo,F1-ATPase, usando a energia gerada pela cadeia de transporte de elétrons, uma série de enzimas presentes na membrana mitocondrial interna. A análise de proteínas de membrana pode ser feita pela técnica de eletroforese, tanto em condições nativas quanto desnaturantes. Neste trabalho analisamos a solubilização de proteínas da membrana interna de mitocôndria de músculo de rato, através do uso de surfatantes zwitteriônicos (ASB-14, ASB-16, CHAPS), não-iônicos (Digitonina, C<sub>12</sub>E<sub>8</sub>, Triton X-100) e aniônico (Colato de sódio) na separação por eletroforese em gel nativo e bidimensional.

Desenvolvemos um novo protocolo para preparo de eletroforese em gel nativo, mantendo o tampão de amostra descrito no procedimento de BN-PAGE e adaptando as demais etapas da técnica de acordo com o protocolo de Laemmli et al (1970). Os géis assim preparados em temperatura ambiente mostraram melhor resolução que os pelo método BN-PAGE, foram obtidos menor tempo de corrida (1-2 horas), sem troca de tampões e com emprego de reagentes de menor custo.

Quanto a eficiência dos diferentes surfatantes, usados em uma mesma concentração (43,2 mM), o zwitteriônico ASB-16 foi o melhor solubilizador das proteínas de MMI, tanto em relação a quantidade total de proteína solubilizada como em relação a número de "spots" visualizados na eletroforese bidimensional, seguido pelo não-iônico Triton X-100. O surfatante não-iônico dodecil maltosídeo foi usado na preparações dos géis 2D em concentrações menores inferiores (20%) do que as indicadas na literatura (10% ou 195,8 mM), sem prejuízo da eficiência de solubilização protéica.

Os resultados obtidos com géis nativos mostraram que todos os surfatantes estudados podem ser usados para separar os complexos protéicos da MMI, mas apresentam seletividade específica pelos complexos da Cadeia Respiratória, devendo esse parâmetro ser melhor estudado futuramente, para a determinação de protocolos específicos para isolamento dos diferentes tipos de complexos.

## ABSTRACT

The majority of the chemical energy produced inside aerobic cells is a result of the oxidative phosphorylation of ATP, inside the mitochondria. A great part of mitochondria proteins are organized into complexes located in the inner mitochondria membrane. Isolation and identification of those proteins have been conducted by electrophoresis, both in native as in denaturant condition. In this work we analysed solubilization of the inner mitochondrial membrane proteins of rat's gastrocnemius muscles, through the use of zwitterionic (ASB-14, ASB-16, CHAPS), non-ionic (Digitonin, C<sub>12</sub>E<sub>8</sub>, Triton X-100) and anionic (sodium cholate), by native and two-dimensional electrophoresis.

We have developed a new protocol for the native gel electrophoresis, using the buffer sample described in BN-PAGE but changing other steps of the technique according to the protocol of Laemmli et al (1970). With this novel protocol, the gels prepared at ambient temperature had a better resolution than the classic BN-PAGE technique; with low costs and short-time runs (1-2 hours).

As for the effectiveness of surfactants studied to solubilize inner mitochondrial membrane proteins, when used at the same concentration (43.2 mM), the zwitterionic ASB-16 was the best, both accordingly to the total amount of solubilized protein, as for the number of "spots" detected in the two-dimensional electrophoresis, followed by non-ionic Triton X-100.

The non-ionic surfactant dodecyl maltoside was used in the 2D electrophoresis preparation at lower concentrations (20%) than that recommended in the literature (10% or 195.8 mM) without prejudice in the efficiency of protein solubilization.

The results with native gels proved that all the studied surfactants can be used to separate the proteins of MMI, but with different selectivity for each enzymatic complex. This specificity should be better studied in the future, looking for the determination of specific protocols for better isolation of each types of MMI complex.

# I- INTRODUÇÃO

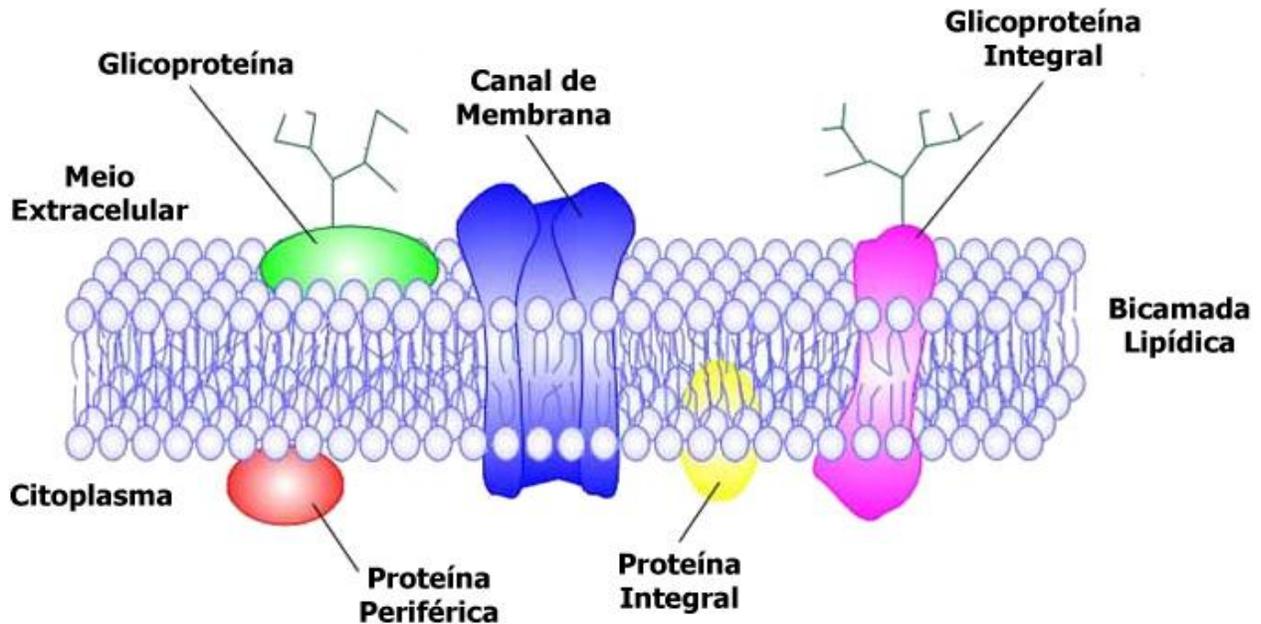
## I.1- Membranas biológicas e suas proteínas

A membrana plasmática é a barreira entre o citoplasma da célula e o ambiente externo que controla a passagem de metabólitos e de solutos em geral, de um meio para outro. Em células de mamíferos ela é a única barreira, enquanto células de plantas e bactérias também possuem uma parede polissacarídica que mantém a integridade celular, apesar do transporte ainda ser controlado, primariamente, pela membrana plasmática. Basicamente as membranas biológicas são constituídas de lipídios, proteínas e carboidratos (que aparecem em menor quantidade e são encontrados na forma de glicoproteínas ou glicolipídios). As membranas podem ser descritas pelo modelo do mosaico fluido proposto por Singer & Nicolson (1972), mostrado esquematicamente na Figura 1. Neste modelo, o mais amplamente aceito até hoje, os lipídios se organizam em forma de bicamada, e as proteínas permeiam essa estrutura, constituindo um arranjo extremamente dinâmico.

Embebidas na membrana estão diversas proteínas relacionadas com o transporte e outras que atuam como receptores, necessários ao funcionamento da célula. Essas proteínas são denominadas integrais ou intrínsecas, quando atravessam a porção hidrofóbica, ou periféricas / extrínsecas quando se encontram associadas à superfície da membrana e não atravessam a bicamada. A remoção das proteínas integrais, que estão fortemente associadas com a membrana, só ocorre por agentes que interferem com as interações hidrofóbicas como os surfatantes, 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 pela adição de uréia ou carbonato (Santos & Ciancaglini, 2002).

Na face citossólica das membranas plasmáticas da maioria das células, proteínas extrínsecas formam uma malha rígida (citoesqueleto) que ajuda a manter a integridade da célula. Existem ainda proteínas que ficam ligadas à superfície não-citossólica da membrana somente por meio de uma âncora de glicosilfosfatidilinositol. Essas

proteínas VERSÃO FINAL podem ser rapidamente removidas da membrana por meio de clivagem com o uso de uma enzima chamada fosfatidilinositol-fosfolipase C específica (Lee, 2003; de Planque & Killian, 2003; Nyholm *et al.*, 2007).



**Figura 1-** Representação de uma membrana biológica segundo o modelo do mosaico fluido de Singer & Nicolson, (1972) (adaptado de <http://www.erin.utoronto.ca/~w3bio315/cell%20membrane.htm>).

Os fosfolipídios são os lipídios mais abundantes nas membranas biológicas. Além deles, os glicolipídios e os esteróis constituem os lipídios da maioria das membranas biológicas. No entanto, a proporção com que esses lipídios aparecem na composição das membranas varia para cada espécie, tecido e organela (Pomorski *et al.*, 2001).

Apesar de a estrutura básica das membranas biológicas ser determinada pelo arranjo lipídico em bicamadas, as proteínas de membrana desempenham a maioria das funções especializadas destas estruturas. São as proteínas, portanto, que dão a cada tipo de membrana na célula, suas propriedades funcionais características. Assim sendo, as quantidades e os tipos de proteínas em uma membrana são altamente variáveis (Lee, 2003; Nyholm *et al.*, 2007).

O desenvolvimento da proteômica, nos anos recentes, nos impôs o desafio de identificar e atribuir a função de cada proteína encontrada em determinada organela, célula, tecido ou organismo, em condições fisiológicas ou patológicas, normais ou induzidas. A localização intracelular e as eventuais interações com outras proteínas ou macromoléculas são pontos iniciais na busca pela função das proteínas. (Nijtmans. *et al.*, 2002; Zhou & Veenstra, 2007).

A importância do estudo do proteoma de membranas é evidenciada pela difícil mensuração das mesmas, já que estas proteínas se encontram, em geral, em baixa concentração e tem alta hidrofobicidade em relação as proteínas globulares, apesar de suas funções vitais (Low *et al.*, 2002; Speers & Wu, 2007).

Além disso, resultados recentes de análise do genoma humano indicam que cerca de 30% de todas as proteínas codificadas no DNA é transmembranar (Zhang *et al.*, 2005). No entanto, o número de proteínas de membrana descritas é ainda muito baixo, em relação às globulares, justificando o desenvolvimento de novas metodologias para solubilização e identificação de proteínas integrais de membrana, bem como o aprimoramento da eletroforese bidimensional, para a análise proteômica (Baharvand *et al.*, 2007).

Confirmando os dados acima descritos, uma consulta ao banco de dados de estrutura de proteínas de membrana, atualizado em 15/04/08 revela que há somente 368 arquivos de coordenadas de proteínas (com estrutura já determinada) sendo 157 de proteínas “únicas”, i.e, não homólogas, contra 46287 constantes do “Protein Data Bank” (dados atualizados em 09/04/2008), que inclui as globulares e de membrana.

## **I.2 – Mitocôndria**

A organela responsável pela maior parte da produção da energia requerida por nossas células é a mitocôndria. A mitocôndria é uma organela semi-autônoma com genoma próprio que, em humanos, contém 37 genes dos quais: 2 codificam RNAs ribossômicos, 22 codificam tRNA transportadores e 13 codificam polipeptídeos dos complexos respiratórios I, III e IV e da ATP sintase (Vercesi, 1998). A mitocôndria

também é o centro de integração e propagação dos sinais de envelhecimento originados dentro da célula como danos no DNA, estresse oxidativo, fome, bem como oxidações geradas por xenobióticos (Kaufmann, 2000; Wang, 2001; Sas *et al.*, 2007).

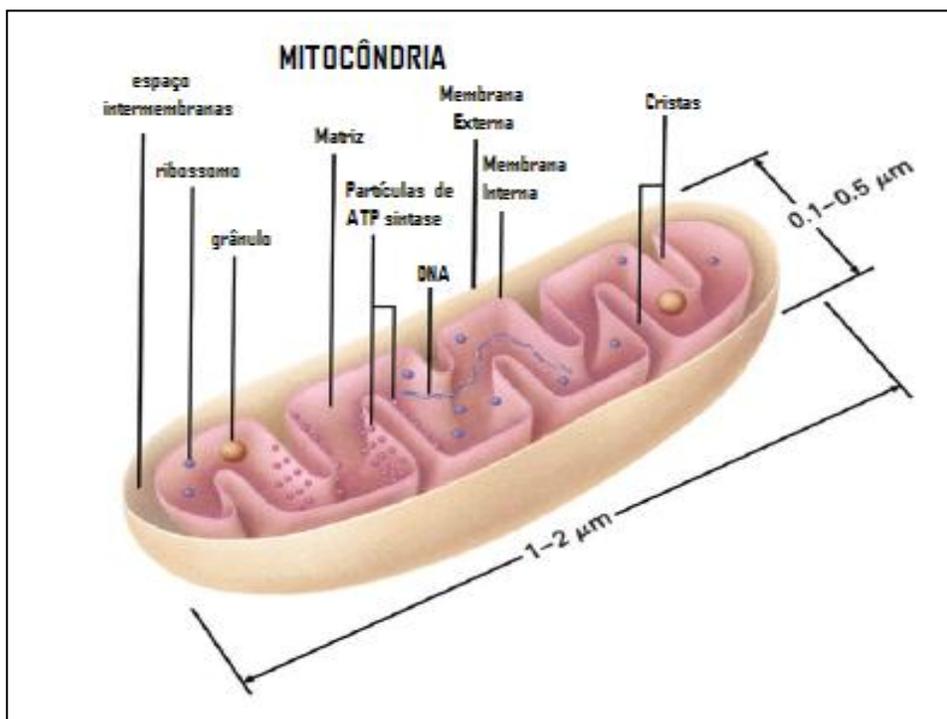
A mitocôndria ocupa uma porção substancial do volume citoplasmático das células de eucariotos e é considerada essencial para a evolução dos animais mais complexos. Sem mitocôndria as células dos animais seriam dependentes da glicólise anaeróbia para obter todos os seus ATPs. Como somente uma pequena fração do total de energia livre da glicose é liberada quando a glicose é convertida até piruvato ou lactato, na mitocôndria o metabolismo do açúcar é completo (o piruvato é oxidado até CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O dentro da mitocôndria, com gasto de O<sub>2</sub>), gerando quase 20 vezes mais ATPs do que o produzido pela glicólise anaeróbia. É também na mitocôndria que lipídios e outros nutrientes podem ser oxidados, aerobicamente (Ruiz-Romero *et al.*, 2006; Pieczenik & Neustadt, 2007).

As mitocôndrias são organelas envoltas por duas membranas, uma externa e outra interna, que diferem entre si, não só na composição lipídica e protéica, como principalmente na função exercida dentro da célula. Ambas possuem um alto grau de ácidos graxos poliinsaturados, pertencentes aos dois mais freqüentes fosfolipídios de membrana (fosfatidilcolina e fosfatidietanolamina), que constituem aproximadamente 75% dos fosfolipídios totais. Em menor proporção aparecem a cardiolipina e o colesterol (Cullis & Hopes, 1985). Na membrana externa há em torno de 3% de cardiolipina e menos que 5% de colesterol, enquanto a membrana interna tem em torno de 18% de cardiolipina e menos que 3% de colesterol (Prasad, 1996). Essas membranas, além de altamente especializadas, criam dois compartimentos: a matriz interna e um espaço intermembranas bastante estreito (Figura 2). Se a mitocôndria for isolada, sendo gentilmente rompida e então fracionada nos seus componentes, a composição bioquímica de cada uma das suas membranas pode ser determinada (Sas *et al.*, 2007).

O isolamento da mitocôndria e a conseqüente separação de seus compartimentos e membranas seguem um princípio básico que é o de colocar a organela em um meio de baixa osmolaridade, no qual o fluxo de água a intumescer e a sua membrana externa se rompe, liberando o conteúdo do espaço intermembranas. Nesse primeiro procedimento a

membrana interna continua intacta. Logo após é realizada uma centrifugação que deixa os conteúdos do espaço intermembranas em uma fração não sedimentada (sobrenadante) e o precipitado originado nessa centrifugação (membrana interna, matriz e membrana externa rompida) é transferido a um meio de alta osmolaridade, que causa o encolhimento da membrana interna, tal que uma outra centrifugação possa separar a membrana externa (sobrenadante). O precipitado dessa centrifugação é novamente centrifugado, permitindo finalmente a obtenção da membrana interna e dos componentes da matriz (Parsons *et al.*, 1966).

Alguns protocolos como o descrito por Schägger (1995) foram propostos para a extração de proteínas da membrana interna da mitocôndria e seguem os princípios básicos desse método, mas com algumas modificações que possibilitam a exclusão de algumas etapas.



**Figura 2** – esquema dos compartimentos da mitocôndria humana. (Fonte: Logan, 2006 modificado)

A membrana externa é rica em porinas, que somam 1% das proteínas mitocondriais totais, sendo altamente permeável. Isto confere ao espaço intermembranas uma composição iônica próxima a do meio citossólico. Ao contrário, a membrana interna é altamente seletiva, sendo permeável somente a  $O_2$ ,  $H_2O$  e  $NH_3$ ; Quaisquer outros

metabólitos precisam de transportadores específicos para atravessar a membrana interna e chegar à matriz mitocondrial, (Haworth & Hunter, 1980; Berg *et al.*, 2002; Sas *et al.*, 2007).

Mitocôndrias são usualmente representadas como organelas cilíndricas alongadas, com diâmetro de 0,5-1µm. A coleta de imagens microscópicas em tempo real mostrou que mitocôndrias são organelas extraordinariamente móveis e plásticas, com constante mudança de formas e que se fundem e se separam (Frey & Manella, 2000). Estas organelas movimentam-se pelo citoplasma, sendo frequentemente vistas associadas a micro-túbulos, que podem determinar a orientação e a distribuição citoplasmática das mesmas, em diferentes tipos celulares (Duchen, 2004; Detmer & Chan, 2007).

Atualmente, o proteoma da mitocôndria vêm sendo largamente investigado, alguns autores utilizam mitocôndria de células de eucariotos (Sickmann *et al.*, 2003), com alguma deficiência (Douette *et al.*, 2005 e Richard *et al.*, 2005) e até utilizam células de humanos (Ruiz-Romero *et al.*, 2006). Muitas proteínas têm sido encontradas e algumas descritas, contribuindo para o desenvolvimento da proteômica mitocondrial.

## **I. 2. a- Membrana mitocondrial interna**

A matriz e a membrana interna constituem as frações de maior importância da mitocôndria. A membrana mitocondrial interna (MMI) é altamente especializada. Como mencionado anteriormente, sua porção lipídica contém uma alta proporção de fosfolipídios “duplos” ou cardiolipina, que são importantes na determinação da fluidez da membrana, ajustando-a para ser de baixa permeabilidade a íons (Warren, 1987). Essa membrana também contém uma variedade de proteínas de transporte, que fazem a permeabilidade seletiva as pequenas moléculas que são metabolizadas (Duchen, 2004).

A MMI é altamente complexa, de maior extensão que a membrana mitocondrial externa e não-dobrável, formando uma série de cristas que se projetam para dentro da matriz (Figura 2). Essas projeções aumentam grandemente a área da membrana interna, tal que, numa célula de fígado, por exemplo, ela constitui cerca de um terço da área total de membranas da célula. Além disso, o número de cristas é três vezes maior em uma

mitocôndria de células de músculo cardíaco do que nas células de fígado, refletindo a maior demanda de ATP das células cardíacas. Há também uma diferença substancial nas enzimas mitocondriais em diferentes tipos de células, justificando estudos de proteoma em situações de repouso e atividade física, já que no exercício físico aumenta a demanda de ATP e a geração de espécies reativas de oxigênio (Alessio *et al.*, 2000; Moynes *et al.*, 2003).

Algumas membranas biológicas têm sido intensamente estudadas, devido a sua importância no organismo, bem como pela riqueza do seu proteoma. A MMI é rica em proteínas envolvidas no metabolismo celular, que correspondem a aproximadamente 80% das proteínas totais dessa membrana (Daum, 1985). Embora a diversidade protéica na membrana mitocondrial interna não seja tão grande, comparada a de membranas plasmáticas como a de eritrócito, cujo número de proteínas revelado por técnicas avançadas de eletroforese 2D é estimado em cerca de 102 (Low *et al.*, 2002), o estudo da MMI tem importância clínica direta, devido as diferentes doenças mitocondriais já descritas na literatura (Tabela 1). Estas patologias atingem todo o organismo, pois afetam a produção de ATP pelas células (Wallace, 1999). Os defeitos mitocondriais são complexos e ocorrem em diversas situações, incluindo doenças degenerativas, envelhecimento e câncer, e são transmitidos através de hereditariedade materna. A dificuldade em caracterizar uma doença mitocondrial reside no fato de que mutações no mtDNA podem produzir fenótipos similares entre si, o que torna mais fidedigna a classificação dessas doenças quando o defeito genético é mensurado através do proteoma expresso (Peterson, 1995; Wallace, 1999).

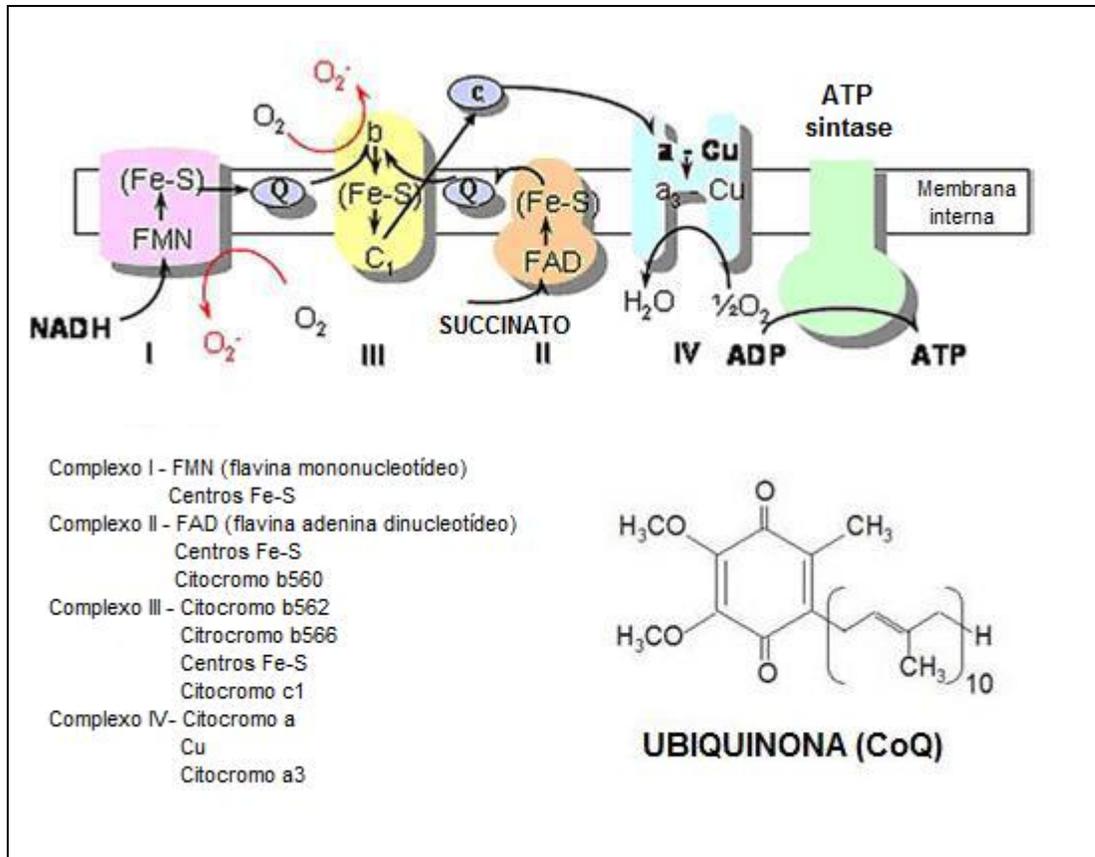
**Tabela 1.** Doenças relacionadas a proteínas de membrana da mitocôndria.

<b>Doenças</b>	<b>Complexo Afetado</b>	<b>Causas</b>	<b>Sintomas</b>	<b>Referências</b>
Neuropatia óptica de Leber (LHON)	Complexo I (NADH - CoQ redutase)	Mutação do gene que codifica a NADH-desidrogenase 6	Cegueira repentina causada por lesão do nervo óptico.	Luft (1995); Wallace, (1999); Carelli <i>et al</i> , (2007).
Distonia	Complexo I (NADH - CoQ redutase)	Mutação do gene que codifica a NADH-desidrogenase 6	Desordem dos movimentos, retardo mental, estatura baixa.	Wallace, (1999); Carelli <i>et al</i> , (2007).
Doença de Leigh	Pode afetar diversos complexos	Mutação do gene que codifica a subunidade 6 da ATPase, e outras	Ataxia, hipotonia, atrofia óptica, oftalmoplegia, etc.	Luft (1995); Wallace, (1999); Tanji <i>et al</i> , (2001); Vesela <i>et al</i> , (2004); Filosto <i>et al</i> , (2007).
Miopatia mitocondrial com encefalopatia, acidose láctica e episódios “stroke-like”	Complexo I e Complexo IV (Citocromo c oxidase)	Mutação do gene que codifica o tRNA <sup>Leu</sup> , entre outras	Estatura baixa, demência em alguns casos, vômitos.	Luft (1995); Brown e Squier, (1996); Tanji <i>et al</i> (2001); Betts <i>et al</i> , (2006); Filosto <i>et al</i> , (2007).
Parkinson	Complexo I	Múltiplos fatores, genéticos e adquiridos	Tremores, rigidez muscular, distúrbios posturais, acinesia.	Mizuno, (1995); Schapira, (2007).
Síndrome Kearns-Sayre	Coenzima Q	Deleção do DNA mitocondrial	Oftalmoplegia, ataxia, hiperparatireoidismo, estatura baixa, degeneração do pigmento da retina.	Luft (1995); Wallace, (1999); Tanji <i>et al</i> , (2001); Betts <i>et al</i> , (2004); Filosto <i>et al</i> , (2007).
Oftalmoplegia externa crônica e progressiva	Complexo II e Complexo IV	Deleção, rearranjo e duplicação do DNA mitocondrial	Miopatia ocular, retinite pigmentosa e disfunção no sistema nervoso central.	Luft (1995), Wallace, (1999); Pieczenik e Neustadt, (2007).
Epilepsia do mioclonus e fibras vermelhas inacabadas	Complexo I e Complexo IV	Mutação de ponto no gene que codifica o tRNA <sup>Lys</sup>	Epilepsia, ataxia progressiva, fraqueza e desgaste muscular, surdez e demência.	Luft (1995); Wallace, (1999); Pieczenik e Neustadt, (2007).
Deficiência de COX	Complexo IV (Citocromo C oxidase)	Mutação no gene SCO2 envolvido no transporte de cobre através da membrana mitocondrial interna	Encefalomiopatia fatal e cardiomiopatia hipertrófica.	Goto <i>et al</i> , (1992), Clark <i>et al</i> , (1996), Vesela <i>et al</i> , (2004); Filosto <i>et al</i> , (2007).

## **I.2. b – Cadeia de Transporte de Elétrons**

A mitocôndria participa de várias vias metabólicas, mas sua principal função biológica é a produção de ATP, pelos complexos da cadeia respiratória e ATP sintase (DiMauro *et al.*, 2003), num processo conhecido como fosforilação oxidativa. A seqüência de eventos das diversas reações que levam a produção de ATP envolve complexos de diferentes enzimas que formam a Cadeia Respiratória da Mitocôndria, constituída de proteínas e de um composto lipídico, a coenzima Q (Figura 3). Os componentes protéicos foram separados em quatro complexos sendo que alguns autores incluem a enzima ATP sintase como sendo o quinto complexo (Cooper *et al.*, 1992): Complexo I (NADH-CoQ redutase), complexo II (succinato/Coenzima Q redutase), complexo III (citocromo c redutase), complexo IV (citocromo c oxidase) e complexo V (ATP sintase), todos localizados na membrana interna (Sabar *et al.*, 2005).

Os principais efeitos genéticos e ambientais nas disfunções mitocondriais estão associados à fisiologia dos complexos I a IV. Várias doenças neurodegenerativas, incluindo Alzheimer, doença de Parkinson, doença de Huntington e isquemias, têm sido ligadas a alterações estruturais e funcionais dos complexos da Cadeia Respiratória (Schapira, 2002; Filosto *et al.*, 2007).



**Figura 3** – Esquema da Cadeia de Transporte de Elétrons e ATP sintase (modificado de Duchon et al, 2004).

### Complexo I

O Complexo I (NADH-CoQ redutase) é constituído pela flavina mononucleotídeo (FMN) e proteínas ferro-enzofre. Ele é composto por, pelo menos, 26 subunidades protéicas (Cooper *et al.*, 1992) e contém 7 dos 13 polipeptídeos codificados pelo mtDNA. Acredita-se que suas subunidades formam uma camada hidrofóbica, que protege a parte hidrofílica do complexo que compreende a FMN, as proteínas Fe-S e moléculas de quinona (Schägger & Pfeiffer, 2001; Janssen & Nijtmans, 2006).

### Complexo II

O Complexo II (Succinato/Coenzima Q redutase) tem uma massa molecular de aproximadamente 130 kDa. Este complexo é constituído de uma parte periférica, exposta na direção da matriz mitocondrial, da qual fazem parte um domínio hidrofílico - constituído por uma flavoproteína - e uma subunidade protéica ferro-enzofre (contendo

2Fe-2S, 4Fe-4S e 3Fe-4S). O domínio membranar é constituído por dois polipeptídeos ligados a grupos heme (citocromo  $b_{560}$ ), os quais ligam as subunidades catalíticas à ubiquinona-CoQ (Ackrell, 2002; Wallace, 2007 ).

### **Complexo III**

O Complexo III (citocromo c redutase), de massa molecular aproximada de 500 kDa, é constituído por uma proteína ferro-enxofre e pelos citocromos b e  $c_1$ , possuindo 11 subunidades protéicas (Saraste, 1999).

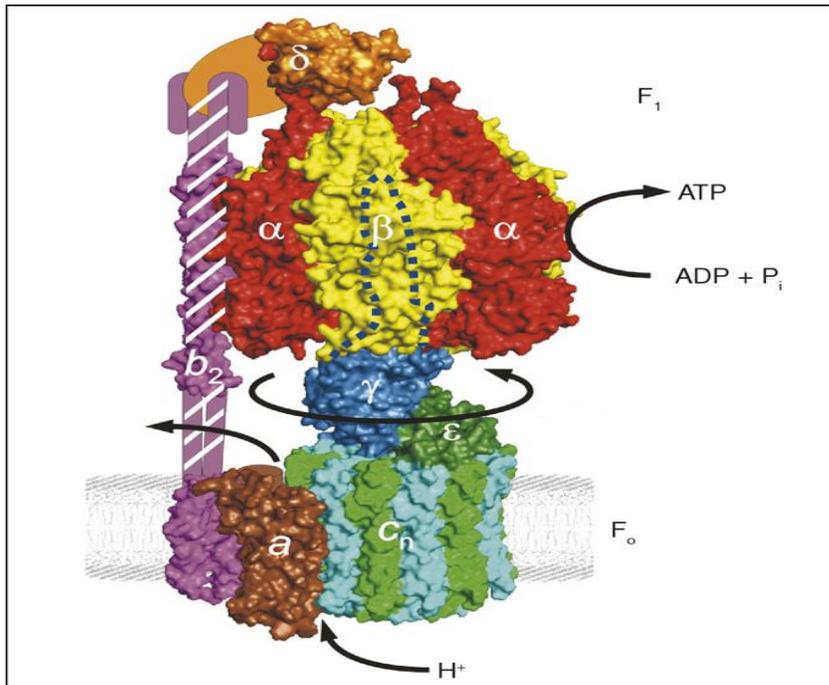
**O citocromo C** da cadeia respiratória mitocondrial é responsável pela transferência de elétrons entre o complexo III e o complexo IV. No entanto ele não é uma proteína integral de membrana. O citocromo C possui características estruturais que permitem sua mobilidade através da membrana, é hidrossolúvel e tem um reconhecido papel no mecanismo de apoptose mediado pela mitocôndria (Jiang & Wang, 2004). Apresenta-se fracamente ligado à membrana; expõe uma borda do grupo heme para o solvente e tem uma distribuição de cargas altamente positiva e conservada por toda borda do heme exposta, devido aos resíduos de lisina que lá se encontram (Schägger & Pfeiffer, 2001; Wallace, 2007).

### **Complexo IV**

O Complexo IV (citocromo c oxidase, ferrocitocromo  $c/O_2$  óxido-redutase) é o carreador final da cadeia de transporte de elétrons da mitocôndria, responsável pela redução do oxigênio molecular. Esse complexo protéico têm número de subunidades protéicas variável entre os eucariotos, sendo 13 subunidades em humanos. Suas três principais subunidades e que formam seu centro catalítico, são codificadas pelo DNA mitocondrial, enquanto as outras subunidades são codificadas pelo genoma nuclear da célula. O complexo IV possui uma massa molecular de aproximadamente 200 kDa e é uma metaloproteína, sendo que duas de suas maiores subunidades estão envolvidas na ligação de íons cobre com os grupos heme (Shagger & Jaggow, 1991; Vesela *et al.*, 2004; Wallace, 2007).

### Complexo V (ATP sintase)

A ATP sintase é uma proteína de membrana com múltiplas subunidades e sua estrutura é a mais complexa da membrana interna da mitocôndria. Essa enzima possui duas grandes estruturas (Figura 4), uma proteína transmembranar insolúvel em água ( $F_o$ , onde se liga um inibidor, oligomicina), composta por aproximadamente 10 subunidades que funcionam como canal protônico e outra proteína hidrossolúvel, que se encontra localizada no lado da membrana voltada para a matriz mitocondrial ( $F_1$ ), composta por cinco subunidades e que contém o componente catalítico (Saraste, 1999). A ATP sintase, possui uma massa molecular de aproximadamente 600 kDa (Shagger & Jaggow, 1991; Weber, 2007).



**Figura 4** – Estrutura da Enzima ATP sintase ( $\alpha, \beta, \delta, \epsilon, \gamma, a, b$  e  $c$  são subunidades do complexo). (Fonte: Weber, 2007 modificado)

## I. 3 – Eletroforese

### I. 3.a – Eletroforese Nativa

Um dos métodos mais amplamente utilizado para a separação em gel nativo de proteínas foi desenvolvido por Laemmli e colaboradores em 1970, no qual a composição

dos géis e dos tampões é igual ao método desnaturante com a retirada do surfatante SDS. Com isso, é um método que induz uma separação por carga, pois uma das funções do SDS, era conferir uma carga uniforme às proteínas, para que houvesse uma migração igual, ocorrendo a separação por massa molecular.

Para o estudo da membrana mitocondrial interna, principalmente para elucidação dos complexos pertencentes à cadeia de transporte de elétrons, Schägger e von Jagow (1991) desenvolveram uma técnica chamada Blue Native eletroforese (BN-PAGE), desenhada especialmente para estudo dos complexos da cadeia oxidativa mitocondrial e que permite separar os complexos sem dissociá-los em seus polipeptídeos constituintes, usando dodecil- $\beta$ -D-maltosídeo como surfatante (Nijtmans *et al.*, 2002).

O estudo molecular dos complexos enzimáticos envolvidos na fosforilação oxidativa do ATP se beneficiou consideravelmente com esta técnica de eletroforese em poliacrilamida (BN-PAGE) capaz de separar os complexos protéicos mitocondriais. Este sucesso deve-se, em grande parte, ao uso do corante Azul de Serva G, que confere uma carga uniforme às proteínas, sem desnaturá-las, além do uso do ácido aminocapróico na solubilização das proteínas de membrana (Schägger *et al.*, 1991). Sob essas condições obtém-se a primeira dimensão da separação eletroforética dos complexos da cadeia de transporte de elétrons, com manutenção de suas atividades catalíticas, após extração dos *spots* dos géis (Coster *et al.*, 2001). Desta forma a BN-PAGE constitui uma modalidade de eletroforese para separação de proteínas nativas com muitas aplicações na preparação (oferece uma escala analítica de quantidade de miligramas de proteínas por gel, na purificação final) e no isolamento de proteínas de membranas biológicas (Schägger, 1995).

Apesar do dodecil- $\beta$ -D-maltosídeo ter se mostrado eficaz na solubilização da membrana mitocondrial interna, a parte da solubilização da preparação para a BN-PAGE mostrou-se crítica e altamente dependente da natureza e concentração do surfatante (Eubel *et al.*, 2004), tal que um excesso de surfatante pode perturbar o complexo protéico, que se perde durante o processo de extração e não aparece no gel (Sabar, 2005).

A eletroforese em condições nativas permite o estudo funcional dos complexos da MMI. No entanto, uma melhor resolução na separação de proteínas da membrana

pressupõe o uso de surfatantes mais potentes, em geral levando à desnaturação da proteína purificada. As técnicas em condições desnaturantes têm a vantagem de permitir a atribuição de maior número de proteínas – aumentando a resolução do gel 2D - sendo de grande interesse para separação dos *spots* e identificação do proteoma membranar, em associação com espectrometria de massas (Zuobi-Hasona et al., 2005).

### **I. 3. b – Eletroforese Bidimensional**

A técnica mais usada na análise global do proteoma é a eletroforese bidimensional (2D), com focalização isoelétrica e gel de poliacrilamida, IEF / SDS-PAGE. Na primeira etapa da técnica as proteínas são separadas por focalização isoelétrica (IEF) e então são adicionadas ao gel (SDS-PAGE), para separação por massa molecular. As proteínas separadas são visualizadas por bandas (ou *spots*), que podem conter uma ou mais proteínas. A identificação de proteínas individuais, no gel de poliacrilamida de uma ou duas dimensões tem tradicionalmente sido cumprida com o uso de co-migrações com proteínas conhecidas, usadas como padrão (Haynes *et al.*, 2000).

A eletroforese 2D tem sido usada como método fundamental de separação e identificação de proteínas em projetos de proteoma, pois pode ser usada para visualizar um grande número de proteínas, simultaneamente e em formatos diferenciais (Haynes *et al.*, 2000; Low *et al.*, 2002; Braun *et al.*, 2007).

No entanto, a eletroforese 2D apresenta ainda algumas desvantagens que são: longo tempo de experimento e difícil visualização de proteínas hidrofóbicas. De fato os géis tipicamente requerem no mínimo 24 h de corrida e, por razões práticas, são freqüentes as corridas de vários dias. As proteínas hidrofóbicas, principalmente aquelas de alta massa molecular, são um problema na resolução dos géis 2D, tendo em vista que a presença do SDS é incompatível com o sucesso da primeira dimensão (focalização isoelétrica), sendo necessário o uso de surfatantes moderados, como o CHAPS, para solubilizá-las (Braun *et al.*, 2007).

## I. 4- Solubilização de membranas biológicas e suas proteínas

Um conhecimento detalhado das funções das proteínas de membrana é essencial para o entendimento dos mecanismos de reconhecimento e adesão celular, ação hormonal, transporte seletivo e até mesmo para aplicações farmacológicas como a entrega seletiva de drogas (“drug-delivery”). A preparação de membranas biológicas, sua desestabilização e solubilização são os primeiros passos no isolamento e caracterização da estrutura e função dos componentes de membrana. Na maioria dos casos a solubilização é alcançada pelo uso de surfatantes e sua escolha é um ponto crítico quando se quer isolar um componente particular da membrana na forma pura e funcional (Jones, 1999; Privé, 2007).

A ação de surfatantes clássicos em sistemas biológicos, como agentes solubilizadores de membrana (promotores de lise) ou ainda como extratores de componentes hidrofóbicos (proteínas e lipídios) tem sido largamente estudada (Helenius et al, 1975; Lichtenberg, 1985, Lichtenberg et al., 2000; Brener et al., 1995; Lasch, 1995; Minuth et al., 1995; Galembeck et al, 1998, Jones, 1999; le Maire et al., 2000; Preté et al., 2002a, b).

Em geral, surfatantes não-iônicos como polioxietilenos solubilizam proteínas de membrana sem afetar características estruturais importantes. No entanto mesmo entre os não-iônicos da série dos octilglicosídeos e éteres de polioxietileno, notou-se que análogos de cadeia alquila curta ( $C_7-C_{10}$ ) são mais desnaturantes do que seus correspondentes com uma cadeia alquila intermediária ( $C_{12}-C_{14}$ ) (le Maire et al., 2000).

Os surfatantes zwitteriônicos normalmente são mais desnaturantes do que os não iônicos, porém em alguns casos podem substituir os polioxietilenos em estudos estruturais das proteínas de membrana (le Maire et al., 2000).

Os surfatantes iônicos, como o SDS, são eficientes solubilizadores, mas na maioria dos casos acabam desnaturando as proteínas. Portanto, seu uso é pouco relevante no isolamento de proteínas/glicoproteínas funcionais (Jones, 1999; Privé, 2007).

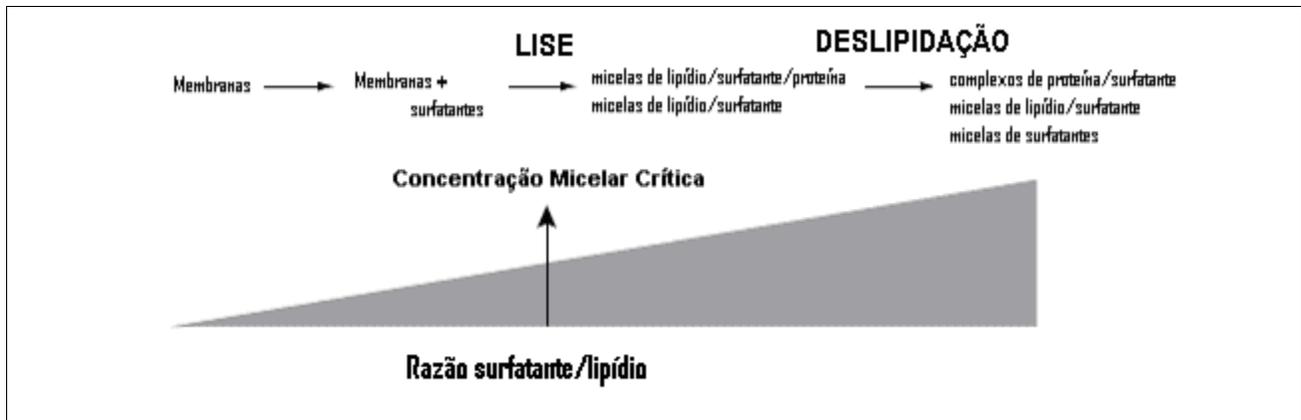
Sais biliares (aniônico) e CHAPS (zwitteriônico), caracterizados por seus baixos números de agregação, causam menor desnaturação protéica do que outros surfatantes

de cadeia alquila e mesmo grupo hidrofílico. Esses surfatantes, que apresentam estruturas similares aos esteróides, são freqüentemente usados em reconstituição devido aos seus altos valores de CMC (da ordem de milimolar) (Prive, 2007).

O processo de solubilização da membrana pode ser caracterizado por uma transição dos lipídios, de uma fase lamelar para uma micelar, de acordo com a hipótese de 3 estágios (Lichtenberg et al., 2000): I- monômeros do surfatante particionam na bicamada fosfolipídica; II- membranas fosfolipídicas saturadas pela incorporação do surfatante coexistem em equilíbrio termodinâmico com micelas mistas (fosfolipídios-surfatante) saturadas por fosfolipídios e III- o fosfolipídio é totalmente solubilizado em micelas do surfatante. A Figura 5 resume as etapas desse processo de solubilização.

A eficiência de um surfatante no processo de solubilização está associada à sua capacidade de penetrar e atravessar a membrana. Dessa forma as características hidrofílicas e hidrofóbicas podem influenciar a difusão transversal ou “flip-flop” dos surfatantes na bicamada. Triton X-100 e  $C_{12}E_8$ , além de outros polioxietilenos, apresentam um rápido “flip-flop” enquanto que surfatantes com grupos mais hidrofílicos como SDS e dodecilmaltosídeo se solubilizam muito lentamente membranas lipossomais, por apresentarem um “flip-flop” mais lento na bicamada (Kragh-Hansen et al., 1998; le Maire et al., 2000).

Proteínas do citoesqueleto normalmente não interagem com surfatantes não-iônicos, mas devido a suas interações com componentes das membranas celulares podem modificar a solubilização de proteínas integrais ou formar complexos com proteínas de membrana, depois da solubilização. A habilidade dos surfatantes em extrair proteínas integrais de membranas biológicas é geralmente casual, em relação à sua capacidade de solubilizar os lipídios da membrana. A remoção de uma parte significativa dos lipídios pelo surfatante ocorre simultaneamente com a formação de um revestimento protetor da parte hidrofóbica da proteína antes incrustada na membrana, feito por moléculas do surfatante (le Maire et al., 2000; Privé, 2007).



**Figura 5-** Esquema dos possíveis eventos envolvidos com um anfifílico surfatante sobre uma membrana biológica (adaptado de Privé, 2007).

A escolha dos surfatantes usados neste estudo foi feita de acordo com uma revisão na literatura (Tabela 2), levando-se em conta o tipo e a concentração dos surfatantes usados nos ensaios de eletroforese de proteínas de membrana. Assim, decidimos utilizar:

1 - dodecil- $\beta$ -D-maltosídeo (DM) 10%: comumente usado e descrito na literatura como eficaz na solubilização da membrana mitocondrial interna sendo, portanto, usado como padrão para comparação com o uso de outros surfatantes.

2 – Colato de sódio 2%: este sal biliar é descrito na literatura como um bom solubilizador de ATPases e de receptores de membrana.

3 – Digitonina 3%: um surfatante estereóidico que já foi utilizado em testes com membranas mitocondriais e é descrito na literatura como bom solubilizador de proteínas de membrana celular de eucariotos.

4-  $C_{12}E_8$  2%: surfatante não-iônico amplamente empregado como solubilizador de ATPases.

5 – Triton X-100 2%: surfatante não-iônico clássico, largamente utilizado na solubilização de proteínas de eucariotos, procariotos e de receptores.

6- CHAPS 4%: surfatante zwitteriônico clássico, amplamente utilizado na solubilização de ATPases, proteínas de membrana de eucariotos e procariotos e de receptores de membrana.

7 – ASB-14 e ASB-16, a 2%: novos surfatantes zwitteriônicos, especialmente desenvolvidos para melhorar processos de extração por eletroforese, recentemente estudados em nosso laboratório (Domingues, 2004; Martins, 2007).

**Tabela 2** – Surfatantes usados para solubilização de enzimas, receptores e outras proteínas de membrana.

Surfatantes	ATPase	Proteínas de eucariotos	Proteínas de Procaríotos	Quinases	Receptores	Citocromo c oxidase
SDS	X	X	X		X	
Alquil maltosídeo		X				X
Sal Biliar (colato)	X	X			X	X
Digitonina		X			X	
C <sub>12</sub> E <sub>8</sub>	X	X				
C <sub>10</sub> E <sub>8</sub>			X			
NP-40	X	X		X	X	X
Triton X-100	X	X	X		X	X
Triton X-114	X	X	X		X	X
NGP(1,4-butenediol)			X			
NOGA (n-Octanoil-β-D-glucosilamina)			X			
β-DM (β-D-maltosídeo)		X	X			
CHAPS	X	X	X		X	
CHAPSO	X					
ASB 14		X	X		X	
ASB 16		X			X	
SB 3-10		X	X		X	
Associação: Triton X-100+SDS			X			
Associação: Triton X-100+ASB-14			X			
Associação: CHAPS+SB 3-10			X			
Associação: ASB-14+CHAPS			X			
Referências	<b>1, 33, 35, 38, 39,45</b>	<b>2 – 21, 42, 44</b>	<b>22-28, 32</b>	<b>29</b>	<b>30, 34, 37, 40, 41, 43</b>	<b>31, 36, 40, 42</b>

1-Santos *et al*, 2002; 2- Zhang *et al*, 2005; 3- Antonenkov *et al*, 2005; 4- Bumgarner *et al*, 2005; 5- Lizotte *et al*, 2005; 6- Kuryakov *et al*, 2005 7- Stickney *et al*, 04; 8- Low *et al*, 2002; 9- Herbert, 1999; 10- Henningsen *et al*, 2002; 11- Olivieri *et al*, 2001; 12- Konishi *et al*, 2005; 13- Lee *et al*, 2005; 14- Bruschi *et al*, 2005; 15- Vesela *et al*, 2004; 16- Coster *et al*, 2001; 17- Schägger, 1995; 18- Zerbetto *et al*, 1997; 19- Schulenberg & Patton, 2004; 20- Molnar *et al*, 2004; 21- Wittig & Schägger, 2005; 22- Schluesener *et al*, 2005; 23 – Aivaliotis *et al*, 2004; 24- Zuobi-Hasona *et al*, 2005; 25- Twine *et al*, 2005; 26- Molloy *et al*, 1999; 27- Pávková *et al*, 2005; 28- Nandakumar *et al*, 2005; 29- Zhu *et al*, 2005; 30- Berger *et al*, 2005./ 31- Rosevear, 1980; 32-Abidi *et al*, 1984; 33- Cornelius *et al*, 1984; 34- Dencher *et al*, 1978; 35-Dreyfus *et al*, 1984; 36- Hill *et al*, 1986; 37- Houssin, 1985; 38-McEnery *et al*, 1984; 39- McIntosh, 1985; 40-Robinson *et al*, 1985; 41-Stubbs *et al*, 1976; 42- Tiruppathi *et al*, 1986; 43- Triscott *et al*, 1986; 44-Wallace *et al*, 1986; 45- Yu *et al*, 1985.

## I. 5- Surfatantes

Surfatantes são moléculas anfífilas, também chamadas de tensoativos ou detergentes, que formam agregados em água. Termodinamicamente, os surfatantes operam reduzindo a tensão superficial de uma interface e aumentando sua área de contato, sob pressão e temperatura constantes (Attwood & Florence, 1983; le Maire et al, 2000). A região polar ou hidrofílica da molécula pode ser carregada ou simplesmente formar ligações de hidrogênio com a água. A porção hidrofóbica é normalmente uma cadeia de hidrocarboneto flexível e se agrega na água, devido a interações hidrofóbicas (Tanford, 1980). Essas propriedades permitem que os surfatantes – na sua forma agregada (em geral, micelas) sejam solúveis em água. A natureza dual dessas moléculas é responsável pelos fenômenos de surfatagem, micelização e solubilização de proteínas e lipídios de membrana (Attwood & Florence, 1983; Bhairi, 2001; Privé, 2007).

A característica fundamental do comportamento dos surfatantes reside na capacidade de formar micelas. Micelas podem ser definidas como agregados coloidais, estáveis termodinamicamente, espontaneamente formados acima de uma estreita faixa de concentração, em temperaturas acima da temperatura micelar crítica e na presença de água (Helenius *et al.*, 1975). Os monômeros começam a exibir uma agregação quando atingem uma faixa de concentração que é característica para cada surfatante. A estreita faixa de concentração em que as primeiras micelas são formadas é chamada de concentração micelar crítica, ou CMC (Tanford, 1980). Outras características importantes relativas à associação molecular dos surfatantes são: o número de agregação ( $n^{\circ}$ . monômeros por micela), o tamanho das micelas e o balanço hidrofílico-lipofílico (HLB), que varia entre 1 a 20 e reflete a fração ocupada pela cabeça polar em relação a cauda hidrofóbica da molécula, quanto maior o número de HLB, mais lipofílico é o surfatante (Griffin, 1949).

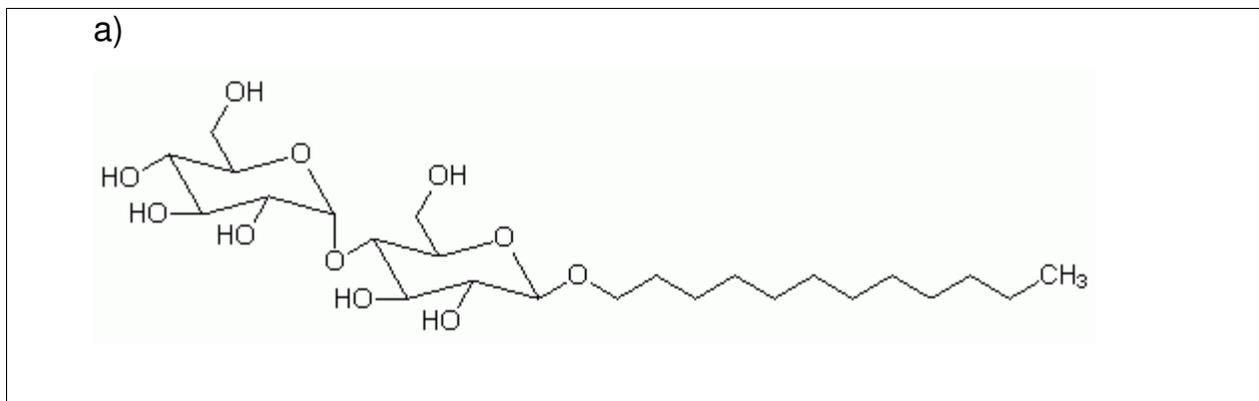
Os surfatantes ou detergentes apresentam combinações variadas dos grupos hidrofóbicos e hidrofílicos constituindo diversos tipos destes compostos. Em função da

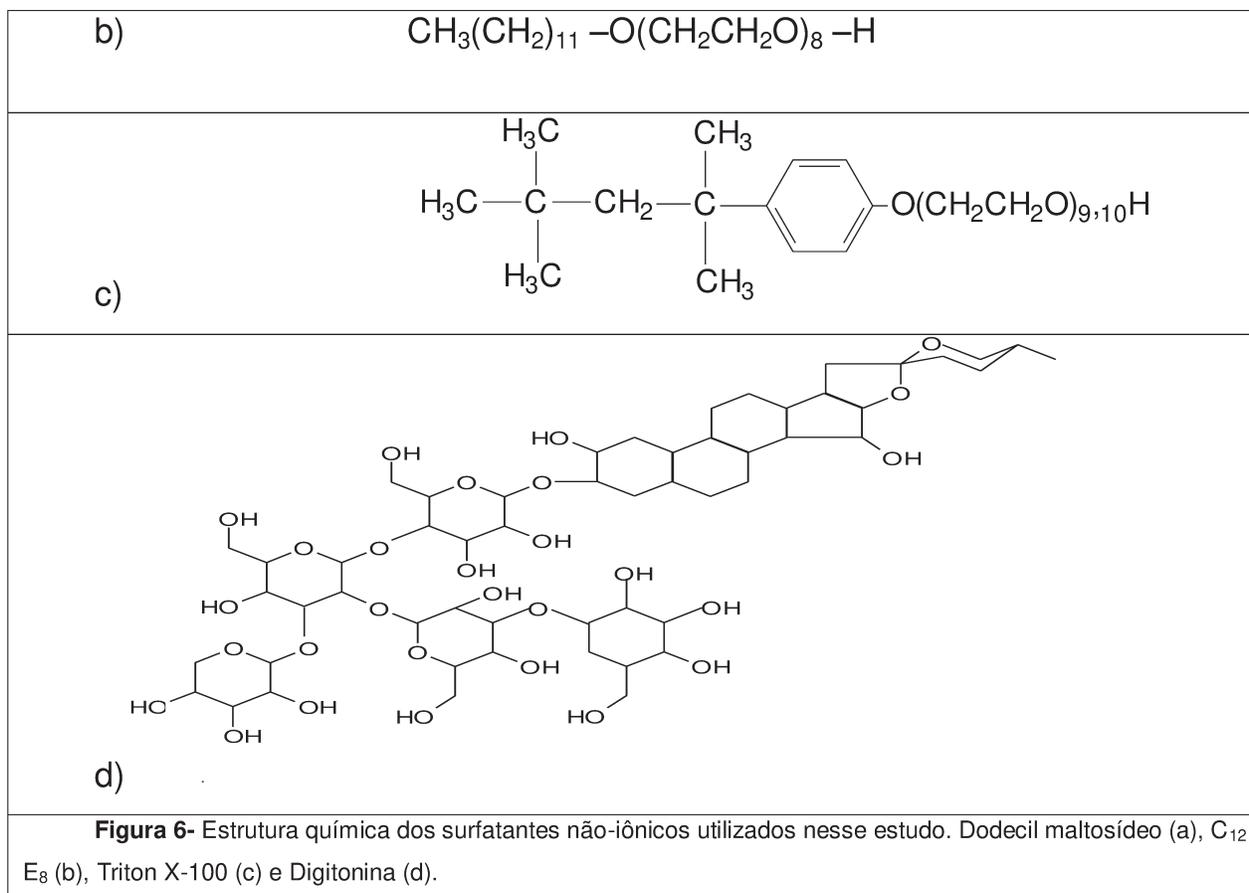
natureza do grupo hidrofílico (cabeça polar), eles podem ser classificados como catiônicos, aniônicos, zwitteriônicos e não-iônicos (Bhairi, 2001).

### I. 5. a - Surfatantes não-iônicos

Os surfatantes não-iônicos não contêm carga, mas apresentam grupos altamente hidrofílicos na cabeça polar. Em geral, a porção polar da molécula é formada por polioxietilenos ou grupos glicosídios (Ex: Brij, Triton X-100, Tween CxEy, dodecyl- $\beta$ -D-maltosídeo, digitonina) esses surfatantes são melhores para quebrar interações entre lipídios e entre lipídios e proteínas, do que as interações entre proteínas. Por isso eles são considerados surfatantes moderados ou não-desnaturantes e são amplamente usados no isolamento de proteínas de membrana, em suas formas biologicamente ativas (Mattsson et al., 1994).

Dentre os surfatantes não-iônicos temos os alquil glicosídeos (ex.: dodecil- $\beta$ -D-maltosídeo – ver Figura 6a) que tem se tornado bastante populares na solubilização de membranas por diversas razões: i) porque são homogêneos em relação à sua composição e estrutura e, ii) porque permitem muitas variações de alquil glicosídeos, com diferentes combinações na cadeia de hidrocarbonetos (cadeias cíclicas ou lineares) e o grupo de açúcar polar pode ser facilmente sintetizado, em forma pura (Bhairi & Mohan, 2007).





### I. 5. b- Surfatantes iônicos

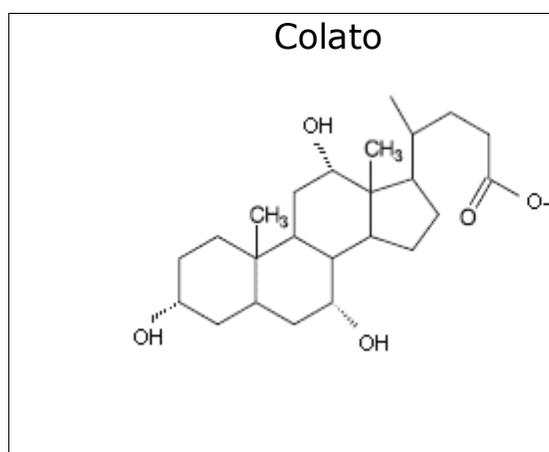
Os surfatantes iônicos contêm uma cabeça polar carregada, tanto positivamente (catiônicos) como negativamente (aniônicos). Os exemplos mais clássicos são o SDS, que contém carga negativa no seu grupo sulfato, enquanto o CTAB contém uma carga positiva no seu grupo trimetilamônio. Além disso, os surfatantes iônicos contêm uma cadeia de hidrocarboneto como o SDS e o CTAB, ou uma estrutura esteroidal rígida como o colato de sódio (sal biliar) (Bhairi, 2001, Bhairi & Mohan, 2007).

#### • Sais biliares

Os sais biliares são surfatantes aniônicos que contêm um rígido grupo hidrofóbico esteroidal. A parte hidrofílica compreende o grupo carboxila no final da pequena cadeia alquila, e grupos hidroxila na estrutura esteroidal, formando uma cabeça polar não bem definida. Sais biliares formam pequenos agregados. Eles podem ser conjugados com glicina ou taurina, no final da cadeia carboxila

formando os surfatantes de sais biliares de primeira e segunda passagem pelo fígado, como taurocolato e glicocolato (Bhairi, 2001).

Como em surfatantes iônicos, o tamanho das micelas é influenciado pela concentração do íon. Devido ao baixo pKa (5-6) e baixa solubilidade dos sais biliares não conjugados (colato, desoxicolato e ursodesoxicolato) sua utilidade é limitada ao pH alcalino. Por outro lado, o pKa dos sais biliares conjugados é muito baixo e, por isto eles podem ser usados em uma larga faixa de pH (Alba et al., 1995, Bhairi & Mohan, 2007).



**Figura 7** - Estrutura química do surfatante colato, um sal biliar utilizado nesse estudo.

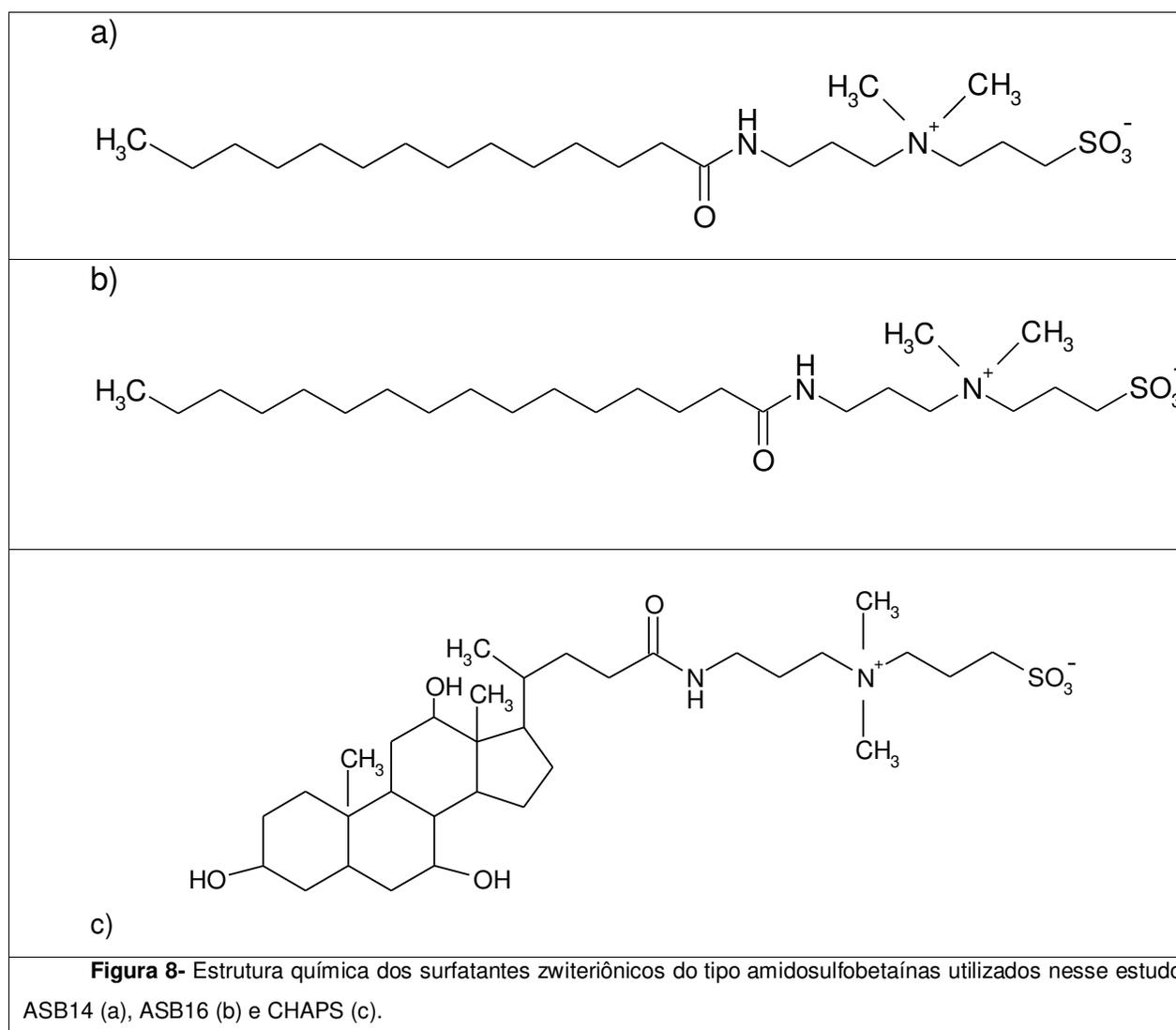
### **I. 5. c - Surfatantes zwitteriônicos**

Os surfatantes zwitteriônicos são os únicos que apresentam propriedades combinadas de surfatantes iônicos e não-iônicos, de acordo com o pH do meio. Como os não-iônicos, não apresentam uma carga líquida; têm baixa condutividade e mobilidade eletroforética e não se ligam em resinas de troca iônica (Ex: CHAPS, SB 3-10, ASB).

#### **Família das amidosulfobetáinas (CHAPS, ASB-14 e ASB-16).**

Os surfatantes zwitteriônicos do grupo amidosulfobetáina, contendo cadeia alquil com 14 e 16 átomos de carbono (ASB-14 e ASB-16, respectivamente), foram sintetizados por Chevallet *et al.* (1998) para emprego em processos de

solubilização de proteínas de membrana (Molloy *et al.*, 1999; Henningsen *et al.*, 2002). Como os não-iônicos, eles não possuem carga líquida em pH fisiológico e não tem condutividade, mas, como os iônicos, são eficientes na quebra das interações entre proteínas (Fricke *et al.*, 2000). Em nosso laboratório estudamos o efeito dos ASB-14 e ASB-16 na solubilização de proteínas de eritrócito, quantificando o efeito lítico e comparando a resolução da eletroforese 2D com o do surfatante CHAPS (Domingues, 2004, Domingues *et al.*, 2007).



A Tabela 3 traz algumas propriedades físico-químicas dos surfatantes acima citados.

**Tabela 3** - Propriedades Físico-Químicas de surfatantes estudados nesta dissertação.

Surfatante	Massa Molecular	CMC (mM)	Número de Agregação	HLB
Dodecil- $\beta$ -D-maltosídeo	510,6	0,1-0,6 <sup>a</sup>	98 <sup>a</sup>	13,4 <sup>g</sup>
C <sub>12</sub> E <sub>8</sub>	538,8	0,11 <sup>a</sup>	123 <sup>a</sup>	13,1 <sup>d</sup>
Triton X-100	631,0	0,25 <sup>a</sup>	100-155 <sup>a</sup>	13,5 <sup>e</sup>
Digitonina	1229,3	0,5 <sup>i</sup>	5-6 <sup>a</sup>	13,7 <sup>d</sup>
CHAPS	614,9	6 - 10 <sup>c</sup>	4 -14	8,2 <sup>f</sup>
ASB-14	434,7	0,1 <sup>b</sup>	-----	11,6 <sup>f</sup>
ASB-16	462,7	0,01 <sup>b</sup>	-----	10,9 <sup>f</sup>
Colato de sódio	430,6	13 <sup>h</sup>	10 <sup>h</sup>	1,6 <sup>d</sup>

<sup>a</sup> Bhairi (2001) ; <sup>b</sup> Valores determinados em água (Domingues, 2004); <sup>c</sup> Valores determinados em água; <sup>d</sup> Cálculado segundo Neugebauer, 1994, 1988; <sup>e</sup>Rohm & Haas, 1986; <sup>f</sup>Calculado de acordo com Griffin (1949); <sup>g</sup> Niraula et al, 2004; <sup>h</sup>Jones et al, 1999; <sup>i</sup><http://psyche.uthci.edu/shaun/SBlack/detergnt.html#ni-det>

## II - Objetivos

Analisar diferentes métodos de solubilização de proteínas da membrana mitocondrial interna, através do uso de diferentes surfatantes (dodecíl maltosídeo, CHAPS, ASB-14, ASB-16, Digitonina, C<sub>12</sub>E<sub>8</sub>, Triton X-100 e Colato de sódio), na separação por eletroforese nativa e bidimensional.

### Objetivos específicos:

- ❖ Estabelecer um protocolo para eletroforese em gel nativo de proteínas de membrana mitocondrial interna de rato, adequado as condições da amostra;
- ❖ Avaliar a eficiência dos surfatantes na solubilização de proteínas da membrana mitocondrial interna, na extração da amostra antes e depois da eletroforese;
- ❖ Avaliar a seletividade de cada um dos surfatantes pelos complexos protéicos presentes na membrana mitocondrial interna, em gel nativo;
- ❖ Determinar uma concentração ideal para os surfatantes testados, que solubilize as proteínas da membrana mitocondrial interna para uma melhor visualização em eletroforese bidimensional.

## **III- MATERIAIS E MÉTODOS**

### **III.1 - Surfatantes**

Os surfatantes ASB-14 e ASB-16 foram adquiridos da Calbiochem (La Jolla, EUA) e os surfatantes Dodecil maltosídeo, Digitonina, CHAPS, Triton X-100, C<sub>12</sub>E<sub>8</sub> e Colato foram obtidos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, EUA).

### **III. 2 - Animais**

Foram utilizados ratos da linhagem Wistar, machos, de aproximadamente 300-350g, fornecidos pelo Centro de Bioterismo da Unicamp. Durante o período que precedeu o experimento os ratos foram mantidos em ambiente controlado (18º-22ºC e fotoperíodo invertido de 12 horas), sendo providos de ração e *água ad libitum*. Os experimentos realizados seguiram os Princípios Éticos em Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) sendo o protocolo de extração do material biológico nº 1023-1, aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA) do Instituto de Biologia, da Unicamp.

### **III. 3 - Preparação e Extração da Amostra**

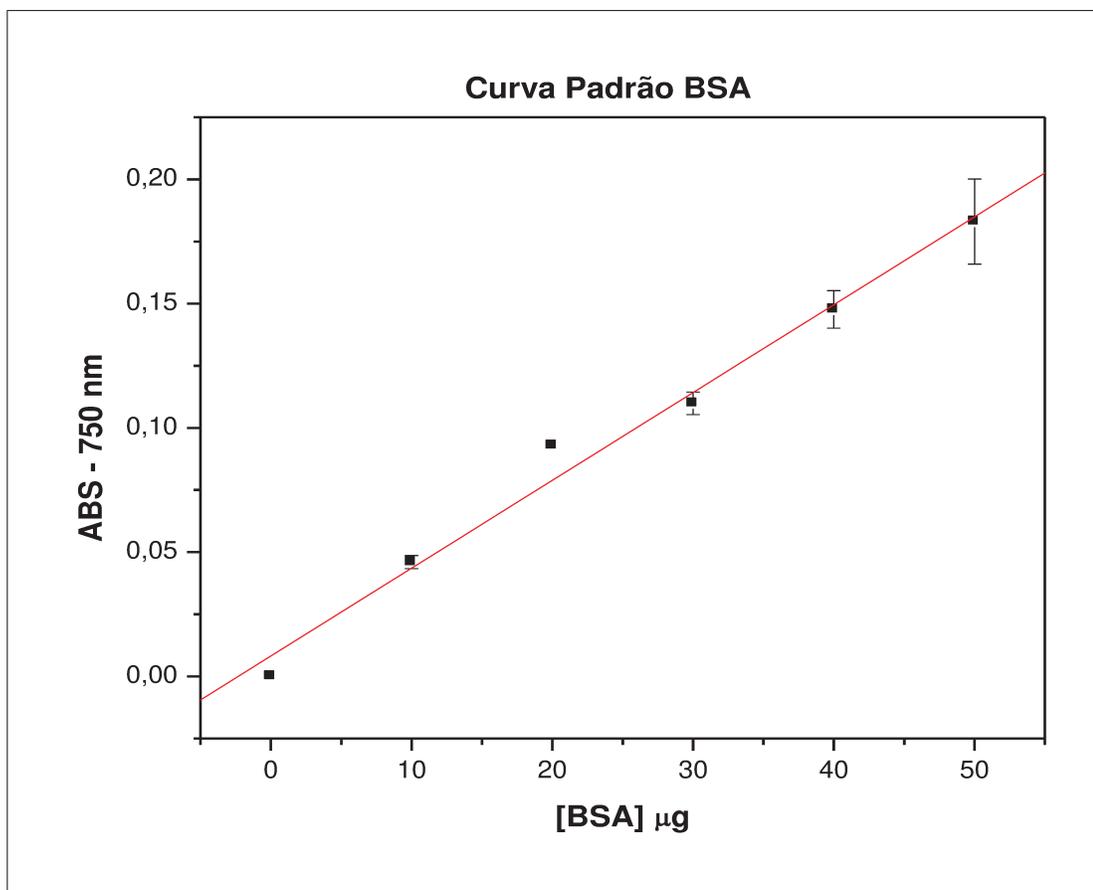
Para a preparação das amostras foi utilizado o músculo gastrocnêmio (porção vermelha ou branca). Após os animais serem anestesiados com hidrato de cloral (10%), os músculos foram extraídos e colocados sobre um papel de filtro para remoção de vestígios de gordura e tecido conjuntivo. Após esse procedimento, os músculos foram imersos em nitrogênio líquido e conservados a -70ºC até realização dos experimentos, ou foram utilizados imediatamente para a obtenção do homogenato. Após a extração dos músculos, os animais foram sacrificados.

O método utilizado para a preparação do homogenato foi uma versão modificada daquele originalmente descrito por Schägger *et al* (1991), onde 30mg de músculo foram cortados em pequenos pedaços e então imersos em 2mL de meio contendo tampão MOPS 20mM, sacarose 440mM, EDTA 1mM e PMSF (fenilmetanosulfonilfluorídeo) 5mM, pH 7,2. Em seguida os músculos foram homogeneizados em aparelho tipo Polytron (em velocidade máxima por 10 s), à temperatura de 0°C. O homogenato foi então submetido a uma ultracentrifugação (20000 x g, 20 min) para sedimentação do material desejado (membranas e células rompidas). O sobrenadante, contendo proteínas solúveis, foi descartado. O precipitado foi ressuspensão em 30µL de surfatante (dodecil-β-D-maltosídeo, colato, digitonina, C<sub>12</sub>E<sub>8</sub>, Triton X-100, CHAPS ASB-14 ou ASB-16) e 80 µL de solução contendo ácido aminocapróico (1M) e tampão bis-tris 50mM, pH 7,0. Após esse tratamento, a solução foi novamente submetida a uma ultracentrifugação (100000 x g, 35 min), na qual a fração da membrana mitocondrial interna permaneceu no precipitado e as proteínas solubilizadas no sobrenadante. A porção de membrana foi novamente tratada com surfatante e submetida a ultracentrifugação por mais duas vezes. Os sobrenadantes foram armazenados em alíquotas para os experimentos. Os procedimentos de extração da amostra foram efetuados a 4° C.

### III. 4 - Dosagem Protéica

A dosagem de proteínas foi realizada de acordo com o método de Lowry *et al.* (1951) utilizando uma curva-padrão de soro albumina bovina (BSA). As amostras foram utilizadas logo após o preparo ou então congeladas a -70°C para os testes de solubilização de proteínas de membrana através de eletroforese.

Os dados obtidos pela dosagem foram tratados, bem como a curva padrão (Figura 9) foi construída através do Programa Microsoft Origin 6.0.



**Figura 9** – Curva padrão de Albumina Soro-Bovina (BSA) utilizada para os cálculos de concentração protéica, como na tabela 5. (Microsoft Origin 6.0).

### III. 5 - Eletroforese em Gel Nativo

Foram utilizados dois métodos de eletroforese em gel nativo, o método BN-PAGE de Schägger & Von Jagow (1991) e o de Laemmli et al (1970). Os primeiros testes foram realizados com os dois métodos separadamente, e após algumas avaliações, desenvolvemos um protocolo modificado com contém parte de ambos os protocolos. O marcador padrão utilizado foi o marcador de alto peso molecular para gel nativo da GE healthcare com proteínas de 66 a 669 kDa.

### III. 5.a – BN-PAGE: MÉTODO DE SHÄGGER & VON JAGOW

Essa eletroforese, em condições não desnaturantes, foi realizada conforme o protocolo descrito por Schägger & Von Jagow (1991). O gel de estoque foi feito na concentração de 3% de acrilamida, e o gel de corrida em um gradiente de poliacrilamida de 5% a 11%. Uma quantidade das amostras (10 $\mu$ L) foi aplicada em 10 $\mu$ L de Comassie Blue G 5%, diluído em ácido aminocapróico 750 mM (usado para a solubilização de proteínas de membrana, substituindo o cloreto de sódio que é incompatível com o gel de poliacrilamida), Bis-Tris 50 mM e EDTA 0,05mM, sendo o total de 20 $\mu$ L aplicados no gel. Os tampões de corrida foram: Tricina 0,5M e Bis-Tris 0,15M pH 7,0 (tampão de cátodo 1), Tricina 0,5M, Bis-Tris 0,15M com Comassie Blue 0,02% pH 7,0 (tampão de cátodo 2), diluídos 1:10 (1 de tampão em 10 de água) e Bis-Tris (0,5M) pH 7,0 diluído 1:10 (tampão para o ânodo). Após aplicação da amostra no gel, a tensão elétrica foi fixada em 100V até a amostra atravessar o gel de estoque. Em seguida, o tampão corado (tampão de cátodo 2) foi trocado por outro tampão idêntico mas sem corante (tampão de cátodo 1), e a tensão elétrica foi ajustada para 170V; após 2 h de corrida, ela foi alterada para 350V, e mantida até o final da corrida.

### III. 5. b – Método de Laemmli e colaboradores

Essa eletroforese em condições não desnaturantes foi realizada conforme o protocolo descrito por Laemmli et al (1970). O gel de estoque foi feito na concentração de 3% de acrilamida e o gel de corrida na concentração de 5% e 7%. Uma quantidade das amostras (10 $\mu$ L) foi aplicada em 10 $\mu$ L de tampão de amostra contendo glicerol, tampão Tris 1M pH 6,8 e Azul de bromofenol, sendo 20 $\mu$ L aplicados no gel. O tampão de corrida empregado foi: Tris 250 mM e Glicina 1,9 M pH 8,3, diluído 1:10 (1 de tampão de corrida diluído em 10 volumes de água). Após a aplicação, a tensão elétrica foi fixada em 100V e a corrente elétrica em 25 mA por gel, até o final da corrida.

### III. 5. c – Novo protocolo proposto

Essa eletroforese em condições não desnaturantes foi realizada utilizando características dos dois métodos anteriormente descritos. O gel de estoque foi feito na concentração de 3% de acrilamida e o gel de corrida na concentração de 7%. Cada amostra extraída (10 $\mu$ L) foi corada com 10 $\mu$ L de Comassie Blue G 250 5% diluído em ácido aminocapróico 750 mM, Bis-Tris 50 mM e EDTA 0,05mM sendo 20 $\mu$ L aplicados no gel. O tampão de corrida foi: Tris 250 mM e Glicina 1,9 M pH 8.3, diluído 1:10 (1 de tampão em 10 de água). Após a aplicação, a tensão elétrica foi fixada em 100V e a corrente elétrica foi fixada em 25 mA por gel, até o final da corrida.

A Tabela 4 resume as composições dos géis, de acordo com cada protocolo utilizado.

**Tabela 4** – Composições dos géis de corrida, stacking e de amostra, entre os métodos de Laemmli (1970), Schagger & von Jagow (1991) e novo protocolo aqui proposto (grifado com cor cinza).

	Laemmli e colaboradores	Schägger & von Jagow
Gel de Corrida e Gel de Estoque	Acrilamida-Bis 30:0,8 (30 g de Acrilamida e 0,8 de metilenebisacrilamida). Tampão Tris 1M, pH 6,8 a 8,8 Água TEMED (tetrametilenodiamina) 10% Solução de Persulfato de Amônio	Acrilamida-Bis 48:1,5 Tampão Bis-Tris 150mM H 7,0 Ácido Aminocapróico 1M pH7,0 Glicerol TEMED (tetrametilenodiamina) 10% Solução de Persulfato de Amônio Água
Tampões de Corrida	Tampão Tris-glicina (Tris 250mM, glicina 1,9M, pH 8,3) diluídos 1:10 em água	Tampão de ânodo: Bis-Tris 50mM, pH 7,0 Tampão de Cátodo A: Tricina 50mM, Bis-Tris 15mM, pH 7,0 Tampão de Cátodo B: Cátodo A mais 0,02% de Corante Comassie blue G 250
Tampão de Amostra	Tris 1M pH 6,8 Glicerol	Ácido Aminocapróico,750mM Bis-Tris 50mM EDTA0,05mM 5% de corante Comassie blue G 250

### III. 6 - Testes Enzimáticos

Os testes de atividade dos complexos foram realizados de acordo com o protocolo de Zerbetto *et al.* (1997) e van Coster *et al.* (2001) com pequenas modificações nos métodos de ensaio enzimáticos específicos, sendo que a formação dos produtos foi medida colorimetricamente. Os géis nativos foram feitos em duplicata de forma que foi possível realizar os testes dos complexos, separadamente.

Os géis foram lavados duas vezes (10 minutos por lavagem) com tampão Tris 2mM, pH 7.4. Depois foram incubados durante 12 h em suas respectivas soluções, diluídas 1:10 em temperatura ambiente. Após isso, os géis foram fixados por 15 min em 50% de metanol e 10% de ácido acético, exceto no caso do complexo V, que foi lavado com água destilada.

A atividade do Complexo I foi avaliada após a incubação com solução contendo 0,1 mg/mL de NADH, 2mM Tris/HCl e 2,5 mg/mL de cloreto de tetrazólio nitro azul, pH 7,4. A coloração púrpura na banda que se apresenta em torno de 750 kDa, correspondente a NADH desidrogenase. A coloração indica que a atividade enzimática do Complexo I foi mantida, pois reflete a formação de cristais derivados da redução do NBT, que serve como um acceptor de hidrogênio proveniente do NADH (Sabar *et al.*, 2005).

A atividade do Complexo V (ATPase) foi avaliada após a incubação do gel em 34 mM Tris, 270 mM de glicina, 14mM MgSO<sub>4</sub>, 0,2% Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> e 8mM de ATP, pH 7,8. A coloração clareada na banda que se apresenta em torno de 600 kDa, sugere que a ATP sintase se mantém ativa, já que a reação enzimática medida é específica, e se baseia na precipitação do nitrato de chumbo pelo fosfato inorgânico produzido durante a hidrólise de ATP (Sabar *et al.*, 2005).

Após esses procedimentos, quando houve a reação enzimática, os géis foram escaneados e analisados através desses níveis de coloração e comparados com os resultados de testes enzimáticos descritos na literatura (Molnar *et al.*, 2004; Sabar *et al.*, 2005).

### III. 7 - SDS-PAGE (Validação de amostras)

A SDS-PAGE foi realizada com modificações no Protocolo com tampão Tris-Glicina, descrito por Laemmli (1970), usando um sistema de eletroforese Hoefer SE 600 (Amersham Biosciences). Os géis de poliacrilamida (no tamanho de 6 cm) foram preparados a 12,5% e o gel de estoque com 5% de acrilamida. Foram utilizadas 60 µg de proteínas de MMI, nos tempos 0, 1, 3 e 6 meses após sua extração; a corrida aconteceu com tensão fixa de 100V e corrente elétrica de 25mA por gel. Foi utilizado o kit de marcadores de baixo peso molecular da GE Healthcare, com proteínas de 14 a 97 kDa.

### III. 8 – Eletroforese Bidimensional

A técnica da eletroforese bidimensional resulta da combinação da focalização isoeétrica e a eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (O'Farrel, 1975). A focalização isoeétrica foi realizada em unidades de focalização isoeétrica IPGphor (Amersham Biosciences), pertencentes ao Laboratório de Química de Proteínas, Laboratório de Bioquímica do Exercício ou do Laboratório de Enzimologia – IB/UNICAMP. As fitas ou “strips” IPG (gradiente de pH imobilizado) com gradiente de pH não-linear de 3-10, de 18 cm, foram reidratadas em 350 µL de tampão de reidratação que continha 150 µg de proteínas, 7 M de uréia, 2 M de tiouréia, 60 mM de ditiotreitol (DTT), 5% de tampão IPG pH 3-10 não-linear e, em alguns casos, 65mM de CHAPS. 2 mL de óleo mineral (“Fluid Cover”, Amersham Biosciences) foram colocados sobre as fitas IPG para evitar a evaporação dos reagentes durante a hidratação. Após 12 horas de reidratação a focalização isoeétrica foi iniciada nas seguintes condições: 50 µA/fita; no primeiro estágio utilizou-se 500V durante 1 hora; no segundo estágio 1000V durante 1 hora; e no terceiro estágio 8000V até atingir 64000Vh (Ruiz-Romero *et al.*, 2006).

Imediatamente após o término da focalização isoeétrica as fitas IPG foram equilibradas para a segunda dimensão (SDS-PAGE) ou congeladas a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

As fitas IPG foram equilibradas em duas etapas: a primeira durante 10 min em tampão contendo 6 M de uréia, 30% de glicerol, 2% de SDS, 50 mM de Tris-HCl (pH 8,8) e 1% de DTT e a segunda, durante 12 min no mesmo tampão, substituindo-se DTT por 2,5% de iodoacetamida. Em seguida as fitas IPG foram transferidas para a segunda dimensão (SDS-PAGE) nas condições descritas no item III.7, porém com gel de 16 cm. A coloração foi feita por impregnação com prata (Blum et al., 1987).

### **III. 9 – Coloração por Comassie Blue**

Ao término das corridas, os géis nativo e desnaturante, com exceção do gel de 16 cm (eletroforese bidimensional), foram imersos em solução corante contendo 50% de metanol, 10% de ácido acético glacial e 0,075% de Comassie Blue (R250) por 2 horas. Depois de removida a solução corante, os géis foram imersos em solução descorante contendo 50% de metanol e 10% de ácido acético glacial, até se obter uma boa resolução das bandas.

### **III. 10 - Análise de Imagens**

A detecção de “spots” dos géis bidimensionais foi feita através do software Image Master 2D Platinum (versão 6.0), da Amersham Biosciences.

### **III. 11 – Análise dos Surfatantes**

#### **III.11.a - Eficiência**

Após a extração das proteínas de membrana, uma alíquota foi separada para os testes de dosagem protéica, antes de sua utilização em eletroforese.

Para comparar a habilidade dos diferentes surfatantes em extrair proteínas da MMI o parâmetro de Eficiência foi calculado, de acordo com a seguinte equação, para fins comparativos (Berger *et al.*, 2005 adaptado):

$$\text{Eficiência} = \frac{[\text{Proteínas solubilizadas com um determinado surfatante}]}{[\text{Proteínas solubilizadas com dodecil maltosídeo}]}$$

O dodecil maltosídeo foi utilizado para comparação por ser o surfatante de escolha por diversos pesquisadores (Schägger, 1995; Zerbetto *et al.*, 1997; Coster *et al.*, 2001; Molnar *et al.*, 2004; Vesela *et al.*, 2005), permitindo assim a comparação dos resultados obtidos com outros surfatantes, neste estudo.

Numa primeira etapa foram testados os surfatantes em concentrações sugeridas na literatura, a saber: Dodecil maltosídeo 10% (195,8 mM – Schägger, 1995; Zerbetto *et al.*, 1997; Coster *et al.*, 2001; Molnar *et al.*, 2004; Vesela *et al.*, 2005), C<sub>12</sub>E<sub>8</sub> 2% (37 mM – Hagestrand *et al.*, 1999), Triton X-100 2% (31,6 mM – Kuryatov *et al.*, 2005), Digitonina 3% (24,4 mM – Wittig & Schägger, 2005), Colato de sódio 2% (46,4 mM – Berger *et al.*, 2005), CHAPS 4% (65 mM – Low *et al.*, 2002; Aivaliotis *et al.*, 2004; Twine *et al.*, 2005; Zuobi-Hasona *et al.*, 2005), ASB-14 2% (46 mM – Henningsen *et al.*, 2002) e ASB-16 2% (43,2 mM - Henningsen *et al.*, 2002).

Além disso testamos: o uso de iguais concentrações de surfatantes, de acordo com a melhor concentração de solubilização descrita na literatura.

### III. 11. b – Seletividade

Nos géis de eletroforese 1D, para avaliar a capacidade dos diferentes surfatantes em solubilizar diferencialmente os complexos da MMI foi realizada eletroforese nativa com as proteínas solubilizadas por todos os surfatantes e analisado o volume das bandas (análise 3D) dos complexos protéicos, através da razão da área da base circular detectada (“spot “ manualmente detectado) x altura dos picos, através do software Image Master 2D Platinum versão 6.0.

## IV- RESULTADOS E DISCUSSÃO

### IV.1 - Determinação de um protocolo para eletroforese nativa

A técnica de eletroforese foi sempre caracterizada por limitações metodológicas ou experimentais. A alta concentração de sais usados nos protocolos padrão para purificação de proteínas perturba a mobilidade eletroforética das proteínas. A carga geralmente vem na adição de um detergente, o dodecil sulfato de sódio (SDS), que se liga às proteínas e confere uma carga “uniforme” (minimiza a diferença de cargas das proteínas) e com isso possibilita a mobilidade eletroforética e separação por diferença de massas (Nijtmans *et al.*, 2002).

O desenvolvimento de protocolos de gel nativo foi um grande acréscimo para o estudo de proteínas no estado funcional, pois com os protocolos anteriores havia dois grandes problemas: a tendência à agregação de proteínas de membrana solubilizadas e a desnaturação dessas proteínas, causada pelos surfatantes (Schagger, 1995).

Para resolver isso, foram desenvolvidas técnicas para gel nativo que mantinha o protocolo de eletroforese (Laemmli *et al.*, 1970) porém retirava o SDS dos tampões e da composição do gel. Esta técnica tornou-se bastante útil na separação de proteínas e na visualização de interações entre proteínas (Wang & Pan, 1991; Su *et al.*, 1994).

A Figura 10a mostra um gel nativo preparado de acordo com a metodologia descrita por Laemmli *et al.* (1970) - uma das mais utilizadas atualmente - em amostras de membrana mitocondrial interna extraída dos músculos gastrocnêmios de ratos. Nesse experimento 20 µg de proteínas foram separadas em gel nativo de poliacrilamida 7,5% (gel de corrida) e 3% (gel de estoque).

De acordo com a Figura 10a concluímos que o protocolo proposto por Laemmli *et al.* (1970) não é adequado para a separação das proteínas de membrana mitocondrial interna, já que a visualização das bandas fica dificultada, dando a entender que, no caso dessa membrana, se faz necessário um detergente ou algum reagente que gere uma mobilidade eletroforética maior nas proteínas.

A necessidade de modificação da técnica que induzisse uma maior interação dos reagentes presentes no tampão de amostra com as proteínas nos levou-nos a testar o protocolo de BN-PAGE, um técnica desenvolvida por Shägger e von Jagow em 1991, na qual um corante conhecido como Serva Blue G (Comassie Blue G 250) é adicionado à amostra. O corante é carregado negativamente e se liga aparentemente em todas as proteínas de membrana; essas proteínas carregadas se repelem uma das outras, ficando assim diminuída a sua tendência à agregação. Na ausência de surfatantes, o corante se liga fortemente às proteínas de membrana, devido a sua baixa solubilidade em água, com isso nenhum detergente é usado nessa técnica, diminuindo o risco de desnaturação proteica.

A partir dessas informações, utilizou-se a técnica de BN-PAGE para uma melhor visualização das proteínas em estudo (Figura 10b). Nesse experimento 20 µg de proteínas foram separadas em gel nativo de gradiente 5 a 13%.

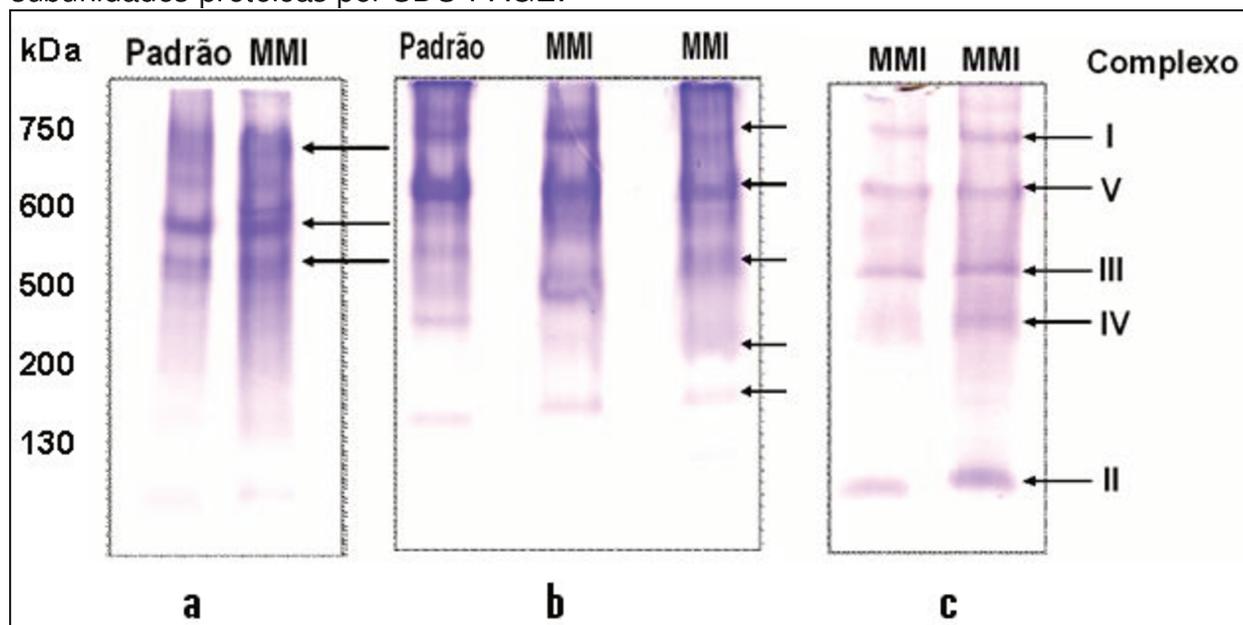
De acordo com a Figura 10b, obtivemos uma visualização mais nítida das bandas, porém esta técnica apresentou ainda algumas desvantagens na sua preparação e manuseio: i) alguns reagentes utilizados nos tampões de corrida e na composição dos géis são diferentes daqueles utilizados nas eletroforeses convencionais e um pouco mais caros; ii) outra dificuldade refere-se à troca de tampões no meio da corrida. Este procedimento requer uma parada momentânea da passagem da corrente (parada na corrida), induzindo aumento na temperatura do sistema (o sistema era mantido a 4°C durante a corrida), além de atrasar o procedimento, cujo tempo total de corrida era de cerca de 4 horas. iii) o uso do corante Comassie Blue G-250 em um dos tampões de corrida (tampão de cátodo A), impregnava todo o equipamento, que precisava de limpeza especial para a retirada dos resíduos do tampão, pós corrida. Essas desvantagens já haviam sido descritas por Eubel et al, 2004 e Zerbetto et al, 1997 e foi confirmada no presente estudo.

Tendo em vista essas dificuldades, procuramos testar novos protocolos para eletroforese nativa. Como havia relatos na literatura de que a interação da amostra com o corante Comassie Blue melhorava a resolução do gel (Schägger et al, 1994), foi criado um novo protocolo no qual manteve-se o tampão de amostra descrito no procedimento de BN-PAGE, mas os outros passos da técnica foram adaptados, considerando-se o

protocolo de Laemmli et al (1970). As modificações metodológicas introduzidas neste protocolo inovador estão apresentadas de forma esquemática na Tabela 4 e item III.5.C de métodos.

Nesse experimento 20  $\mu\text{g}$  de proteínas foram separadas em gel de poliacrilamida, 7,5% (gel de corrida) e 3% (gel de estoque).

Os resultados obtidos podem ser visualizados na Figura 10c. Com a utilização deste protocolo foi possível a visualização das proteínas da MMI com maior resolução que a obtida com os protocolos anteriores (figuras 10a e 10b). Com isso, comprovamos que a interação entre os reagentes descritos em BN-PAGE e a amostra é essencial para a boa visualização das proteínas, porém não há necessidade de modificação nas composições do gel de corrida e gel de estoque mesmo porque a função deste é somente empacotar as proteínas, preparando-as para a subsequente corrida eletroforética, e também não há necessidade de utilizar o tampão de corrida descrito em BN-PAGE pois segundo Zerbetto et al, 1997, o excesso de corante no tampão gera problemas na resolução de subunidades protéicas por SDS-PAGE.



**Figura 10** - Perfil eletroforético (gel 1-D) de proteínas de membrana mitocondrial interna de mitocôndria de rato, obtido de acordo com: (a) protocolo de Laemmli *et al.* (1970); (b) protocolo de BN-PAGE; (c) protocolo modificado descrito em métodos. P.M: Padrão, MIM: proteínas da membrana mitocondrial interna (em b e c- duplicata). As bandas visualizadas estão indicadas com setas.

Em comparação com os géis acima demonstrados, com o protocolo modificado visualizam-se menos bandas, porém as bandas de interesse (aparentemente com os complexos da cadeia de transporte de elétrons) aparecem bem mais nítidas.

Assim, foi possível obter em temperatura ambiente um gel com boa resolução, em menor tempo de corrida (de 1 a 2 horas), sem troca de tampões e contaminação do equipamento e empregando reagentes de menor custo (com o custo de um gel em BN-PAGE, é possível fazer oito géis do protocolo modificado), como mostrado na Tabela 5. Este protocolo pode ser uma alternativa para outros tipos de amostras.

**Tabela 5** – Demonstrativo de preços do protocolo modificado e BN – PAGE.

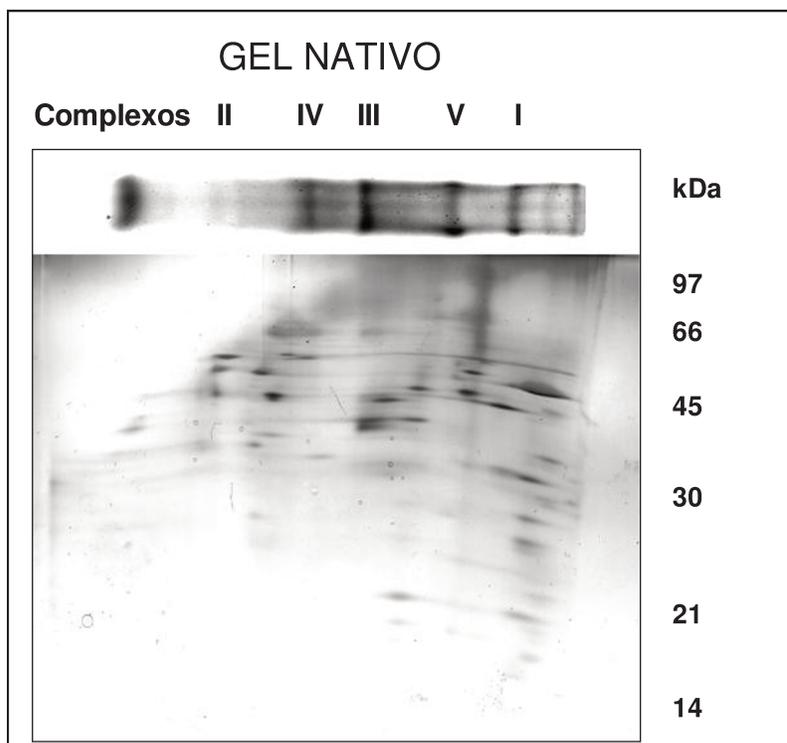
	BN-PAGE	Protocolo modificado
Custos* dos principais reagentes para um gel (1,5 mm de espessura e 7,5 cm de altura).	Bis-Tris: \$ 68,69 Ácido Aminocapróico: \$ 3,40 Tricina : \$ 8,82	Tris: \$ 6,08 Glicina: \$ 3,07
Total	\$ 80,91	\$9,15

\* Preços do catálogo da Sigma-Aldrich de 2006-2007.

Após a publicação dos dados do genoma humano um novo desafio se apresentou que é o do entendimento da(s) função(ões) de cada proteína expressa e suas relações com outros compartimentos celulares (Henningsen *et al.*, 2002). Com isso muitos experimentos eletroforéticos estão baseados em mais de um parâmetro de separação protéica, levando a um grande desenvolvimento na técnica de eletroforese bidimensional. Um protocolo muito descrito na literatura para separação de proteínas de membrana mitocondrial interna, utiliza o gel de BN-PAGE e a técnica de SDS-PAGE, separando assim os complexos adquiridos através do gel nativo, em seus constituintes desnaturados.

Essa técnica (gel nativo com SDS-PAGE) não foi testada com os demais protocolos (BN-PAGE e Laemmli *et al.*, 1970) porque o objetivo era apenas confirmar se com o protocolo modificado era possível esse tipo de experimento, e não comparar se há melhorias em relação aos demais.

Decidimos utilizar o novo protocolo descrito acima para obtenção do gel nativo e depois submeter as amostras a uma nova corrida em SDS-PAGE para separação das proteínas por peso molecular, como descrito no item III. 7 de métodos (Figura 11).



**Figura 11** - Perfil eletroforético (2-D) de proteínas de membrana mitocondrial interna de mitocôndria de rato. 20  $\mu\text{g}$  de proteínas foram separadas em gel nativo de poliacrilamida com o protocolo modificado e então separadas em gel desnaturante (SDS-PAGE) como descrito por Nijtmans *et al*, 2002. Uma coluna foi retirada do gel nativo, e inserida no gel de estoque para a separação desnaturante em gel de poliacrilamida 12,5%.

Na Figura 11 podemos observar “spots” com proteínas de baixo peso molecular que possivelmente sejam subunidades dos complexos que estavam no gel nativo e que sofreram desnaturação.

Esse gel mostrou que é possível a separação por peso molecular das proteínas de MMI a partir do gel nativo preparado com o novo protocolo, podendo este, também ser utilizado nessa etapa de separação, assim como o BN-PAGE.

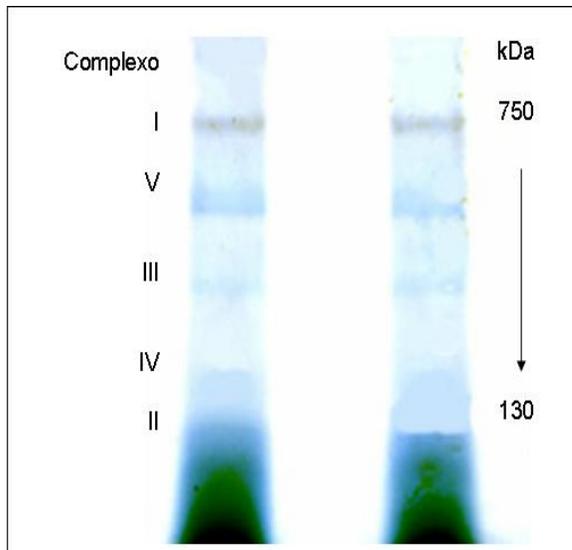
## IV.2- Avaliação do Protocolo por testes enzimáticos

Para comprovar que o novo protocolo mantinha as proteínas em seu estado funcional, foram realizados alguns testes enzimáticos. Utilizou-se a técnica de Zerbetto et al. (1997) que é uma combinação entre BN-PAGE e utilização de coloração enzimática específica.

A importância dessa técnica encontra-se na combinação do gel nativo com o teste de atividade em um mesmo gel, gerando uma análise simultânea da integridade do complexo protéico e da atividade enzimática (Sabar *et al.*, 2005).

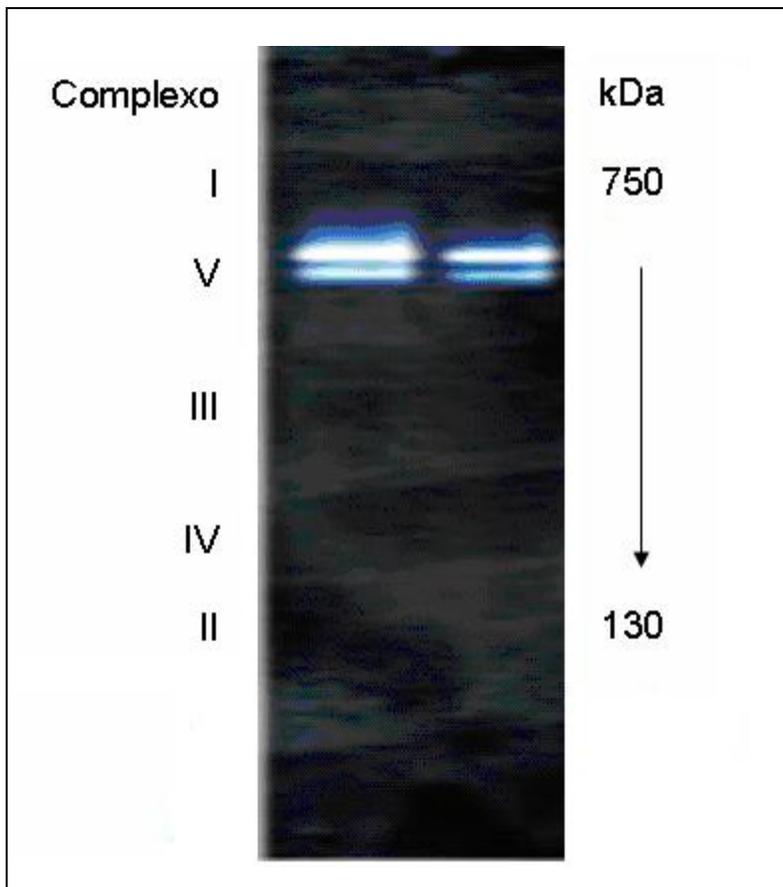
Essa técnica não foi testada com os demais protocolos (BN-PAGE e Laemmli et al, 1970) porque o objetivo era apenas confirmar se as bandas existentes no gel com o protocolo modificado eram realmente os complexos da cadeia de transporte de elétrons, e não comparar se há melhorias em relação aos demais.

A Figura 12 mostra o teste enzimático para o Complexo I, realizado em gel nativo preparado com o novo protocolo. Observa-se a coloração púrpura na banda que se apresenta em torno de 750 kDa, correspondente a NADH desidrogenase. A coloração indica que a atividade enzimática do Complexo I foi mantida pois reflete a formação de cristais derivadas da redução do Cloreto de Tetrazólio Nitro-azul (NBT), esse corante é incolor e serve como um acceptor de hidrogênio proveniente do NADH (Sabar *et al.*, 2005).



**Figura 12:** Teste em duplicata de atividade enzimática da NADH desidrogenase (Zerbetto *et al.*, 1997) em gel de poliacrilamida preparado de acordo com protocolo modificado aqui proposto.

A Figura 13 mostra o teste enzimático realizado para o Complexo V (ATP sintase) realizado em gel nativo preparado de acordo com o novo protocolo. Nela é possível visualizar a reação enzimática (coloração clareada) na banda (em torno de 750 kDa, sugerindo que a ATP sintase manteve-se ativa, já que a reação enzimática medida é específica, e se baseia na precipitação do nitrato de chumbo pelo fosfato inorgânico produzido durante a hidrólise de ATP (Sabar *et al.*, 2005).



**Figura 13:** Teste em duplicata de atividade enzimática da ATP sintase (Zerbetto *et al.*,1997) em gel de poliacrilamida preparado de acordo com protocolo modificado aqui proposto. A figura foi escaneada com as cores invertidas para dar ênfase à coloração característica da reação na banda do Complexo V.

Estes testes indicaram que o novo protocolo, aqui proposto, é eficiente para a separação das proteínas da MMI em seu estado nativo, assim como o BN-PAGE.

### IV. 3 - Avaliação dos surfatantes quanto à eficiência

As Tabelas 6 e 7 descrevem os valores de eficiência (item III.11.a em métodos) calculado com a média dos valores de concentração protéica encontrados nos sobrenadantes após solubilização da amostra de membrana mitocondrial interna, realizada de acordo com o método de Lowry *et al.* (1951). A curva-padrão utilizada para derivação da equação e cálculos (Figura 9 no item III.4 em métodos) foi feita com soroalbumina bovina.

Primeiramente as concentrações dos surfatantes utilizadas na preparação das amostras foram diferentes, seguindo as concentrações mais citadas na literatura para cada tipo de surfatante.

**Tabela 6** – Valores de eficiência calculados de acordo com as concentrações protéicas presentes nas amostras solubilizadas de MMI.

Surfatantes	Eficiência
<b>Dodecil maltosídeo (10%/ 195,8mM)</b>	<b>1,00</b>
ASB-14(2%/ 46mM)	0,613
CHAPS (4%/ 65mM)	0,662
Digitonina (3%/24,4mM)	0,675
Colato de sódio(2%/46,4mM)	0,798
C <sub>12</sub> E <sub>8</sub> (2%/37,1mM)	0,972
Triton X-100(2%/31,6mM)	0,980
ASB-16 (2%/43,2mM)	1,066

Não foi avaliada a concentração protéica inicial da membrana, pois o objetivo não foi avaliar quanto de proteína foi solubilizado em relação a concentração inicial da membrana, mas sim comparar a solubilização dos surfatantes em comparação com o surfatante dodecil maltosídeo.

De acordo com os valores de eficiência, o surfatante zwitteriônico ASB-16 foi o mais efetivo, solubilizando mais proteínas que o dodecil maltosídeo, usado como padrão. Porém, como os surfatantes foram utilizados em concentrações diferentes, foi necessário normalizar as concentrações para avaliar a eficiência corretamente. Pelos dados de eficiência escolhemos a concentração de 43,2 mM, correspondente a concentração utilizada de ASB-16 (2%), com os melhores resultados.

Na Tabela 7, estão os dados de eficiência obtidos nas amostras preparadas com os diferentes surfatantes, na concentração 43,2 mM.

**Tabela 7** – Valores de eficiência calculados de acordo com as concentrações protéicas presentes nas amostras solubilizadas de MMI. Amostras obtidas pela solubilização com diferentes surfatantes, na concentração de 43,2 mM.

Surfatantes (43,2 mM)	Eficiência
<b>Dodecil maltosídeo</b>	<b>1,00</b>
CHAPS	0,478
Colato	0,577
ASB-14	0,578
Digitonina	0,625
Triton X-100	0,680
C <sub>12</sub> E <sub>8</sub>	0,862
ASB-16	1,241

Assim, de acordo com os valores de eficiência, novamente o surfatante zwitteriônico ASB-16 mostrou-se o melhor solubilizador das proteínas de MMI, se comparado com o dodecil maltosídeo e demais surfatantes testados. O surfatante não-iônico C<sub>12</sub>E<sub>8</sub> também teve uma efeito solubilizador marcante, apesar de não superar os valores da solubilização do dodecil maltosídeo.

Outra observação importante é que o dodecil maltosídeo apresentou melhor ação solubilizadora mesmo estando bem abaixo da concentração preconizada pela literatura (Tabela 7), em contraste com o zwitteriônico CHAPS, que foi o menos eficiente. Apesar do surfatante dodecil maltosídeo estar abaixo da concentração preconizada, ele está 100 vezes acima de sua CMC, sendo que o CHAPS está apenas em torno de 10 vezes, explicando a diferença no efeito desses surfatante, pois a CMC é um parâmetro marcante no poder de solubilização de um surfatante (Prive, 2007).

A partir desses resultados, foram realizados testes de eletroforese bidimensional e nativas para avaliar os perfis e a seletividade dos surfatantes pelas proteínas em estudo.

#### **IV. 4 - Perfil de eletroforese bidimensional das proteínas de MMI obtida com os diversos surfatantes**

A necessidade de melhorar a resolução e a reprodutibilidade dos géis em estudos de proteoma tem estimulado avanços nas tecnologias de eletroforese. Um marco importante foi a introdução da focalização isoeletrica, oferecendo uma alternativa de grande valia para a caracterização protéica por eletroforese (Molloy *et al.*, 1999; Molloy,

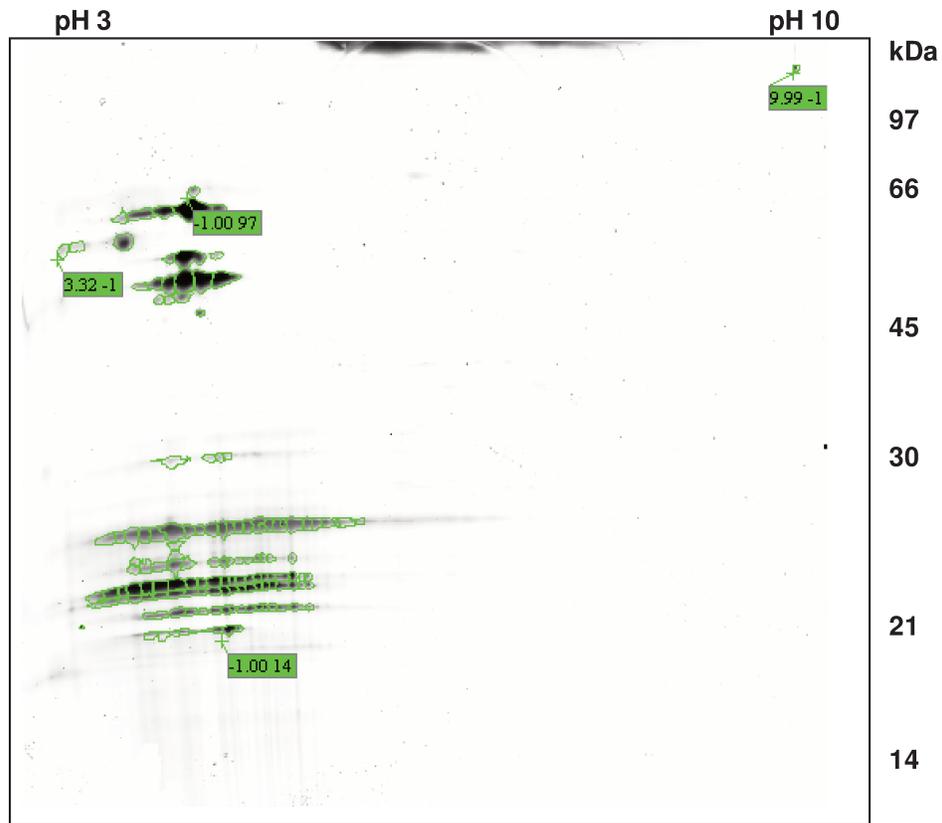
2000). Juntamente com esses avanços, muitos experimentos vêm sendo descritos para melhorar a solubilização de proteínas hidrofóbicas, com uso de diferentes surfatantes na extração e solubilização dessas proteínas (Zuobi-Hasona *et al.*, 2005).

Uma separação eficiente em IPGs durante a focalização isoelétrica requer baixa concentração de íons, porque eles migram através do campo elétrico e interferem na focalização. Isso exclui o uso de potentes surfatantes iônicos como o SDS e também por isso, o tampão de focalização contém agentes caotrópicos (uréia e tiouréia) como componentes desnaturantes e surfatantes não-iônicos ou zwitteriônicos (Braun *et al.*, 2007). De acordo com esses estudos, utilizamos diferentes surfatantes descritos na literatura e, para testar seus efeitos, empregamos a técnica de eletroforese bidimensional descrita por Bjellqvist *et al.* (1982).

Os surfatantes foram divididos nas suas classes, para fins de comparação: zwitteriônicos (CHAPS, ASB-14 e ASB-16), não-iônicos (Digitonina, C<sub>12</sub>E<sub>8</sub> e Triton X-100) e aniônico (colato de sódio).

Antes do início dos testes com os surfatantes obtivemos perfis eletroforéticos com o surfatante dodecil maltosídeo, que foi utilizado como padrão, para comparação com os demais detergentes. Um gel 2D de proteínas de MMI obtido por extração com uso de 43,2mM de dodecil maltosídeo é mostrado na Figura 14. Um total de 136 *spots* foram detectados e seus valores aproximados de massa molecular e pI estão descritos na Tabela 14 em anexos.

Na Figura 14, assim como em todos os géis há quadros com números que indicam a massa molecular ou o ponto isoelétrico das proteínas presentes nos *spots* visualizados. Devido à formatação do software de análises de imagens, as anotações 3.3 -1 e 9.99 -1 indicam pontos isoelétricos de 3.3 e 9.99, respectivamente, e -1 97 e -1 14 indicam pesos moleculares de 97 e 14 kDa, respectivamente.



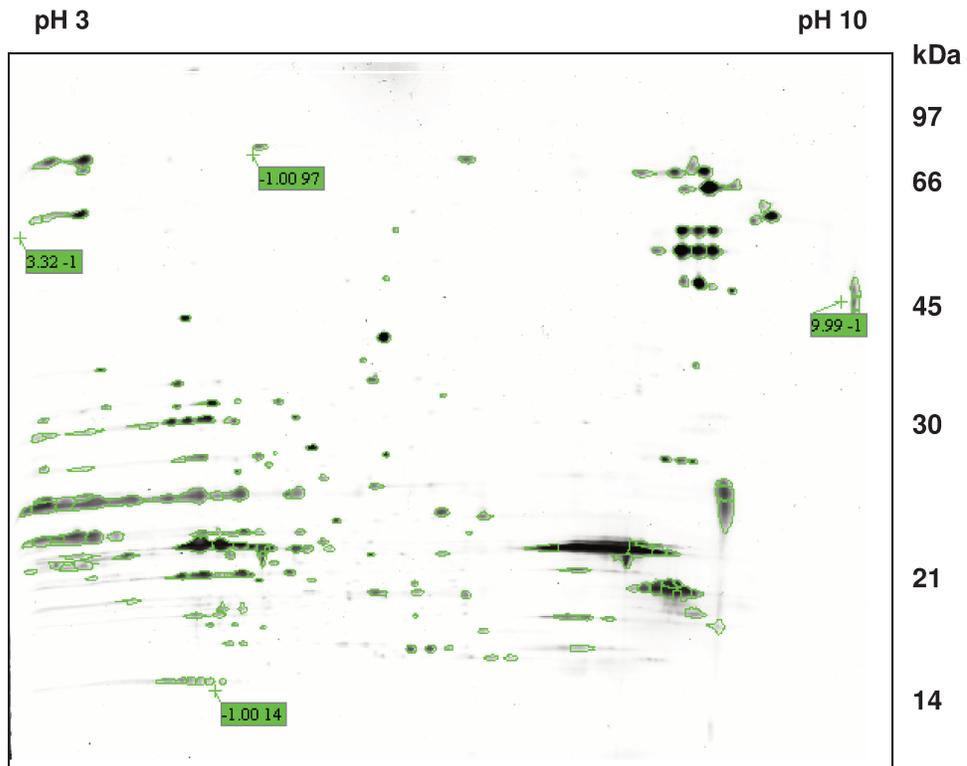
**Figura 14-** Separação de proteínas de membrana mitocondrial interna de rato por eletroforese bidimensional. Utilizou-se 60 µg de proteínas previamente solubilizadas com 43,2 mM de Dodecil maltosídeo. A focalização isoelétrica foi feita em gradiente de pH 3-10 não-linear e a coloração feita por impregnação com prata.

Segundo Lê Maire. (2000) o surfatante dodecil maltosídeo apresenta uma baixa capacidade de translocação (“flip-flop”) na membrana, o que dificulta a solubilização das proteínas membranares. Assim, a solubilização por esse surfatante seria devida à extração de moléculas de fosfolipídios diretamente da membrana, pelas micelas do surfatante (Lê Maire *et al.*, 2000).

Com o crescente uso da técnica de eletroforese, muitas adaptações no protocolo vêm sendo feitas, por diversos pesquisadores, e uma delas é o acréscimo de detergentes mais potentes no tampão de amostra, utilizado na etapa de Focalização Isoelétrica (Henningsen *et al.*, 2002)

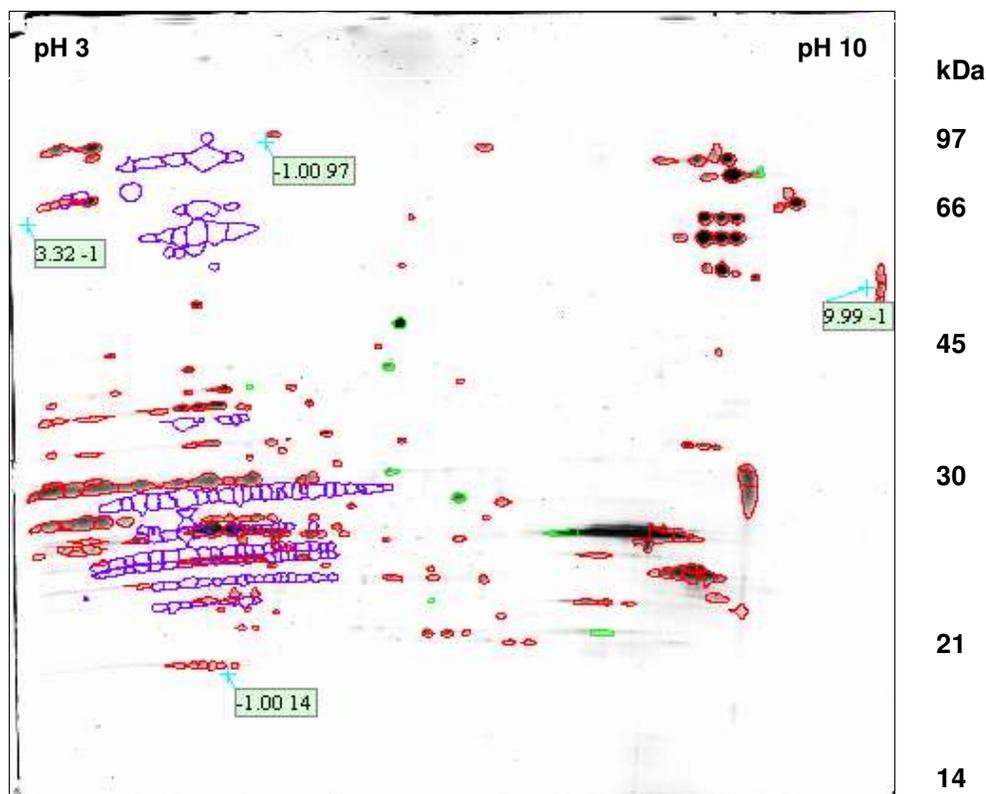
A adição de surfatantes a sais caotrópicos como uréia e tiouréia nos tampões de amostra da focalização isoelétrica demonstrou aumentar o número de “spots” visualizados em gel bidimensional, permitindo separar proteínas hidrofóbicas como as integrais de membrana. Na prática, por causa da exposição dos resíduos hidrofóbicos das proteínas à desnaturação por uréia, os surfatantes também são usados para ajudar na solubilização das proteínas e, nos últimos anos, CHAPS tem sido o surfatante de escolha (Herbert, 1999).

Baseados nessas informações, preparamos um gel com amostra de MMI extraída com uso de 43,2 mM de dodecil maltosídeo, mas com o acréscimo de 65mM de CHAPS no tampão de focalização (Figura 15). Com essa modificação no protocolo houve a detecção de 183 “spots”, ou seja, 47 a mais (34,5%) do que o obtido com o gel anteriormente descrito (Figura 14). Os valores aproximados de massa molecular e pI das proteínas destes *spots* estão descritos na Tabela 15 em anexos.



**Figura 15-** Separação de proteínas de membrana mitocondrial interna de rato por eletroforese bidimensional. Utilizou-se 60  $\mu\text{g}$  de proteínas previamente solubilizadas com 43,2 mM de Dodecil maltosídeo e com 65 mM de CHAPS no tampão de focalização. A focalização isoelétrica foi feita em gradiente de pH 3-10 não-linear e a coloração feita por impregnação com prata.

Na Figura 16 comparamos os dois géis acima descritos. Visualmente nota-se que o uso de CHAPS contribuiu principalmente para melhor solubilização de proteínas básicas (com *pI* perto de 10), tanto de alta como de baixa massa molecular.



**Figura 16** – Comparação dos “spots” de proteínas de membrana mitocondrial interna de rato. Em roxo estão os “spots” detectados no gel realizado com tratamento de 43,2 mM de Dodecil maltosídeo e em vermelho estão os “spots” detectados no gel com tratamento de 43,2 mM de Dodecil maltosídeo e 65 mM de CHAPS no tampão de focalização. Em verde estão os “spots” encontrados em ambos os géis; segundo o relatório dado pelo software de análise Platinum há 9 “spots” iguais em ambos os géis.

Esse número baixo de equivalências (“matchings”) pode ser explicado pelo fato dos géis terem sido realizados em momentos diferentes, o que gera muitos artefatos e dificulta a detecção dos “matchings”, pois o software não reconhece algumas tortuosidades ou diferenças de tamanho dos géis.

Além dos “matchings”, foi realizada uma análise das tabelas no Programa Microsoft Excel 2003. Os “spots” foram separados por faixas de *pI* e sobrepostos (os “spots” dos diversos géis com os “spots” do gel com associação dos surfatantes dodecil

maltosídeo e CHAPS). As tabelas nas faixas de pI que obtiveram “spots” similares estão mostradas em anexos.

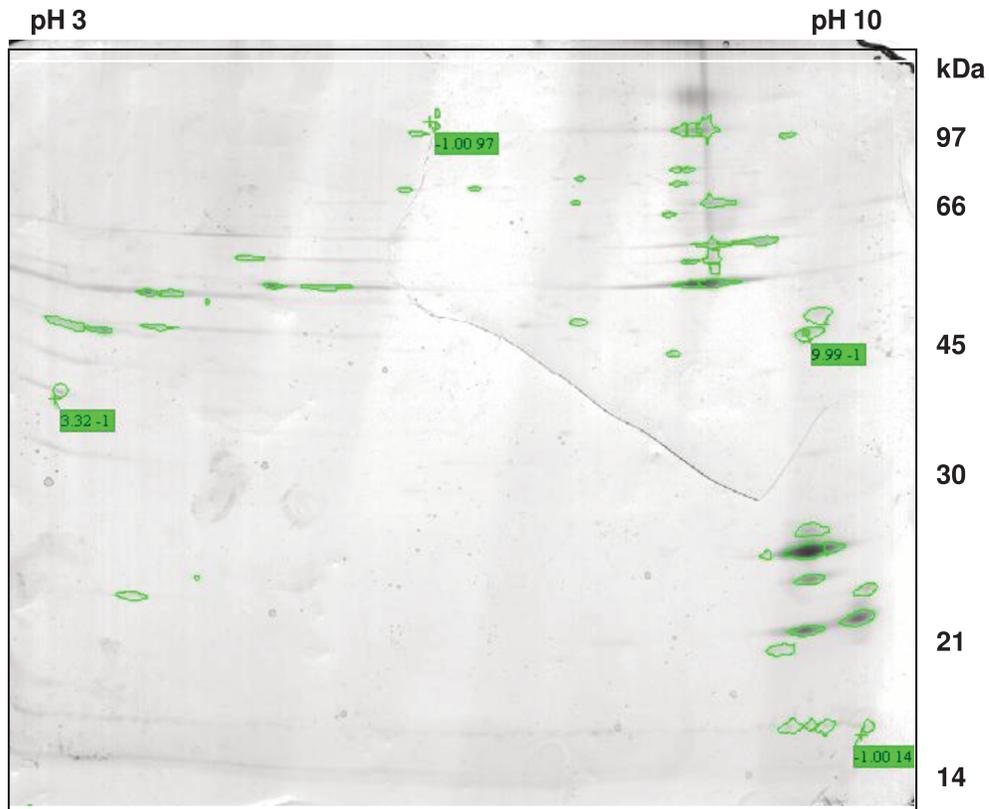
No caso dos géis anteriormente mostrados (dodecil maltosídeo e dodecil maltosídeo + CHAPS), “spots” similares apareceram nas faixas de pI 3 a 6 (Tabelas 23, 24 e 25 em anexos).

Com esses resultados, optou-se por utilizar o surfatante CHAPS nos tampões de focalização das demais amostras pois, como já descrito por Molloy (2000) e Kashino (2003), para uma boa solubilização de proteínas de membrana é necessário um surfatante eficiente, que tenha uma boa interação com os agentes caotrópicos presentes no tampão de focalização isoelétrica, sendo o CHAPS um dos mais eficientes. De fato, Zhang et al (2005) testou 4% de CHAPS com um surfatante não-iônico e obteve melhores resultados do que com ASB-14, que foi considerado um surfatante promissor na extração de membrana total ou proteínas de membrana; os autores desse estudo discutem que pela complexidade das biomembranas, com proteínas muito diversas, é razoável pensar que um único surfatante pode não ser suficiente para uma adequada solubilização, sendo necessária a complementação com um surfatante zwitteriônico.

#### **IV. 4. a – Surfatantes zwitteriônicos**

Embora o uso de soluções com tiouréia/uréia tenha trazido avanços na solubilização de proteínas pela técnica de eletroforese 2D, a combinação do uso destes agentes caotrópicos com novos surfatantes da família das sulfobetainas tem fornecido soluções ainda melhores na solubilização de proteínas em géis 2D (Herbert, 1999).

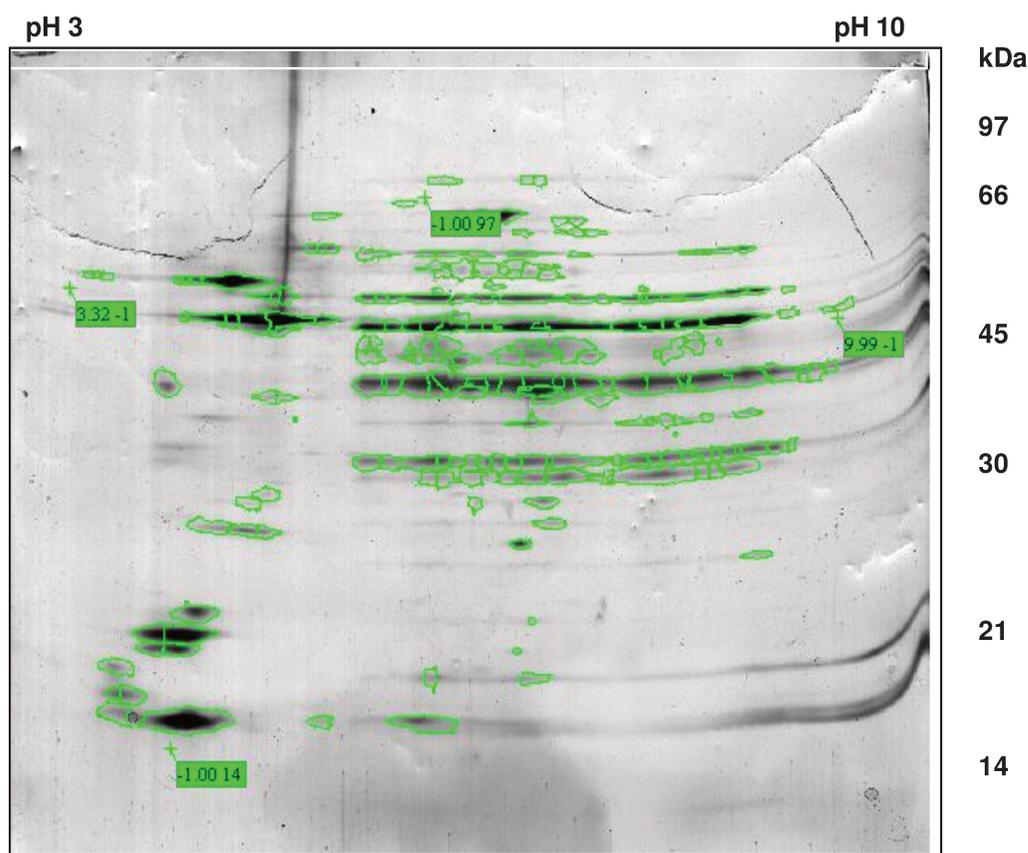
A Figura 17 mostra um gel preparado com amostra de MMI cujas proteínas foram extraídas com uso de 43,2 mM de ASB-14 e com 65mM de CHAPS no tampão de focalização. Um total de 53 “spots” foram detectados e seus valores aproximados de massa molecular e pI estão listados na Tabela 16 em anexos.



**Figura 17-** Separação de proteínas de membrana mitocondrial interna de rato por eletroforese bidimensional. Utilizou-se 60 µg de proteínas previamente solubilizadas com 43,2 mM de ASB-14 e com 65 mM de CHAPS no tampão de focalização. A focalização isoeétrica foi feita em gradiente de pH 3-10 não-linear e a coloração com impregnação com prata.

Segundo experimentos realizados por Martins *et al.* (2007) com proteínas de cérebro humano, quando há associação de ASB-14 e CHAPS, ocorre uma maior solubilização de proteínas ácidas, sendo que com o uso do ASB-14 isoladamente, há predominância de proteínas básicas. De acordo com o gel seguinte (Figura 18), o uso do CHAPS colaborou para o aumento do número de “spots” visualizados, mas manteve as características de solubilização por ASB-14, i.e., com predomínio das proteínas básicas. Estes autores encontraram ainda que, com o uso do CHAPS, houve maior solubilização de proteínas com alto peso molecular (acima de 45 kDa), o que também ocorreu nesse estudo.

A Figura 18 mostra um gel que foi preparado com amostra de MMI cujas proteínas foram extraídas com uso de 43,2 mM de ASB-16 e com 65mM de CHAPS no tampão de focalização. Um total de 205 “spots” foram detectados e seus valores aproximados de massa molecular e pI estão listados na Tabela 17 em anexos.

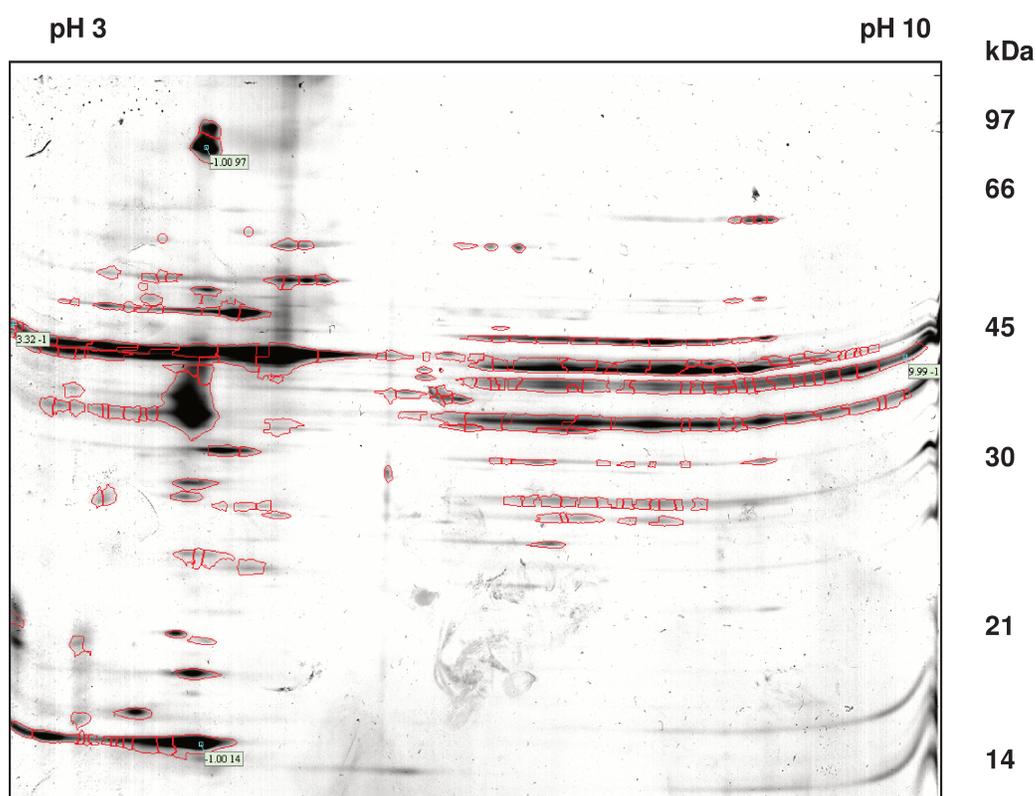


**Figura 18-** Separação de proteínas de membrana mitocondrial interna de rato por eletroforese bidimensional. Utilizou-se 60 µg de proteínas previamente solubilizadas com 43,2 mM de ASB-16 e e com 65 mM de CHAPS no

tampão de focalização. A focalização isoelétrica foi feita em gradiente de pH 3-10 não-linear e a coloração feita por impregnação com prata.

Observa-se que nesta associação com CHAPS, o surfatante ASB-16 (figura 18) promoveu acréscimo de 386% no número de “spots” em relação ao surfatante ASB-14 (Figura 17), que é da mesma família (amidosulfobetaínas).

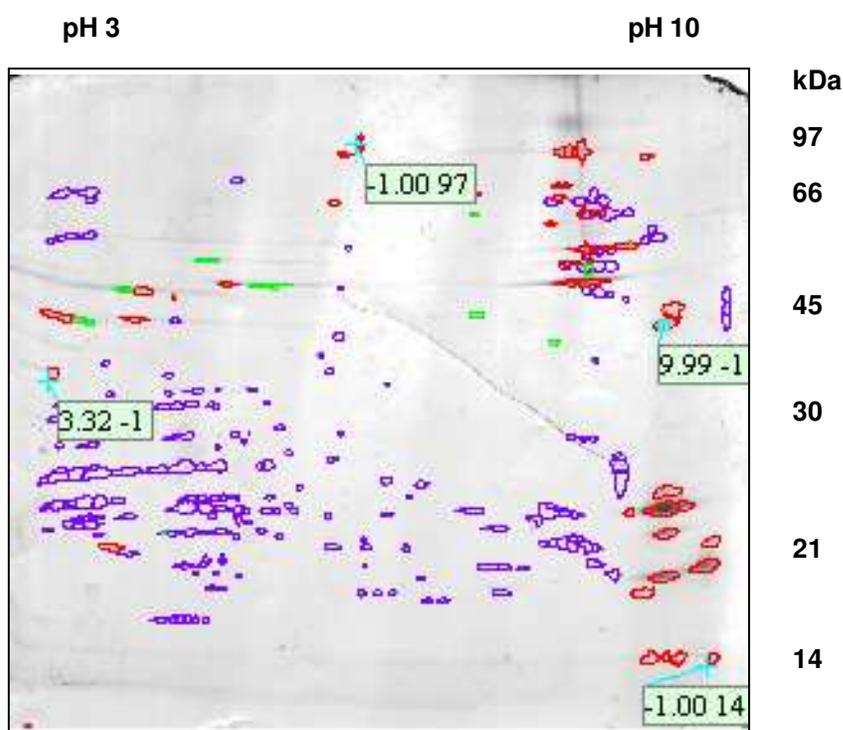
A Figura 19 mostra um gel que foi preparado com proteínas de MMI extraídas com uso de 43,2 mM de CHAPS na etapa de extração das proteínas, e 65mM deste mesmo surfatante no tampão de focalização. Um total de 131 “spots” foram detectados e seus valores aproximados de massa molecular e pI estão listados na Tabela 18 em anexos.



**Figura 19-** Separação de proteínas de membrana mitocondrial interna de rato por eletroforese bidimensional. Utilizou-se 60 µg de proteínas previamente solubilizadas com 43,2 mM de CHAPS e com 65 mM desse mesmo surfatante no tampão de focalização. A focalização isoelétrica foi feita em gradiente de pH 3-10 não-linear e a coloração feita por impregnação com prata.

Embora o emprego de CHAPS na fase de extração tenha proporcionado um acréscimo de 247% no número de “spots”, em comparação com o surfatante ASB-14, o resultado foi 36% menor que o atingido com o uso do ASB-16 (Figura 18, Tabela 17).

Na Figura 20 comparamos géis preparados com os surfatantes ASB-14 (Figura 17) e dodecil maltosídeo (Figura 15), na solubilização, ambos com 65 mM de CHAPS no tampão de focalização. Visualmente e também pelos números das Tabelas 15 e 16, o uso de ASB-14 não contribuiu para melhorar a solubilização de proteínas de MMI, se comparado com o surfatante comumente usado (dodecil maltosídeo).

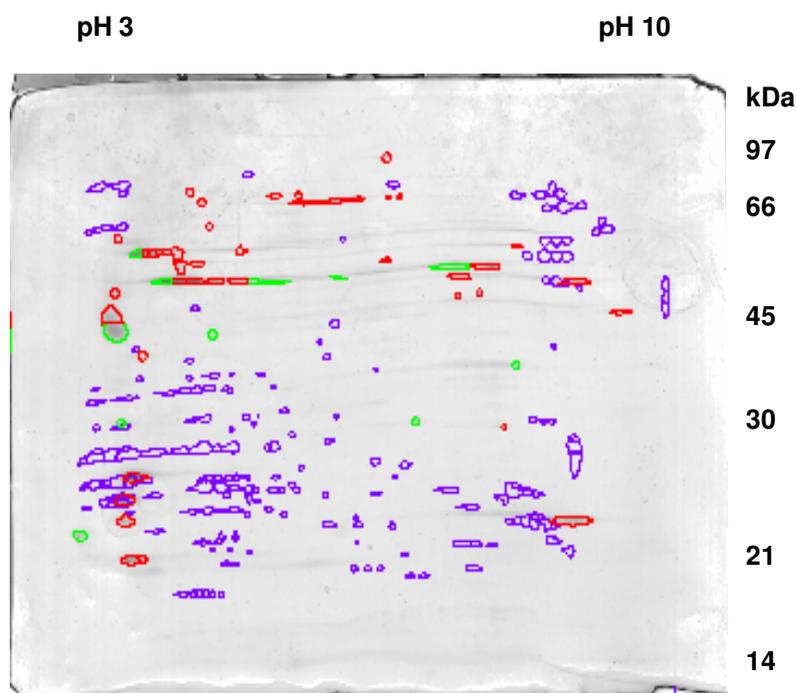


**Figura 20** – Comparação dos “spots” de proteínas de membrana mitocondrial interna de rato. Em roxo estão os “spots” detectados no gel realizado com tratamento de 43,2 mM de Dodecil maltosídeo, em vermelho estão os “spots” detectados no gel com tratamento de ASB-14, ambos com 65 mM de CHAPS no tampão de focalização. Em verde estão os “spots” encontrados em ambos os géis, conforme análise feita no software Platinum, revelando 9 “spots” iguais.

Na análise feita pelo Microsoft Excel, os “spots” similares entre os géis de dodecil maltosídeo e ASB-14, apareceram na faixa de pI 3 a 5 (Tabelas 26 e 27 em anexos).

A Figura 21 compara os géis preparados com uso de ASB-16 (Figura 18) e com dodecil maltosídeo (Figura 15) na solubilização, e com 65mM de CHAPS no tampão de

focalização. Visualmente e pelos números nas Tabelas 15 e 17, o uso de ASB-16 contribuiu significativamente para melhorar a solubilização de proteínas da MMI em comparação com o dodecil maltosídeo. Esta maior solubilização revela-se também no número de “spots” que aparecem em ambos os géis (“matching”) que, apesar de continuar pequeno, aumentou para 12.

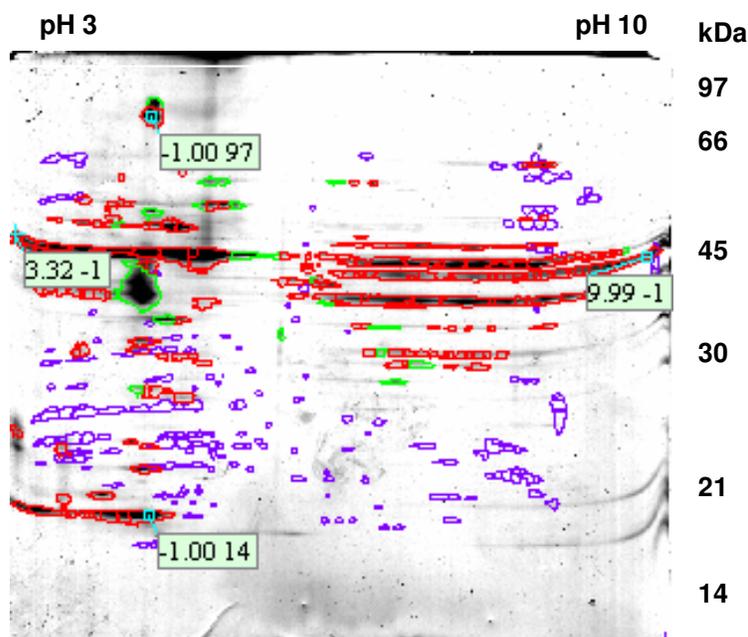


**Figura 21**– Comparação dos “spots” de proteínas de membrana mitocondrial interna de rato. Em roxo estão os “spots” detectados no gel realizado com tratamento de 43,2 mM de Dodecil maltosídeo, em vermelho estão os “spots” detectados no gel com tratamento de ASB-16, ambos com 65 mM de CHAPS no tampão de focalização. Em verde estão os “spots” encontrados em ambos os géis, conforme análise feita no software Platinum, revelando 12 “spots” iguais.

Na análise feita pelo Microsoft Excel, os “spots” similares entre os géis de dodecil maltosídeo e ASB-16, apareceram na faixa de pI 4 a 10 (Tabelas 28, 29, 30, 31, 32 e 33 em anexos).

A Figura 22 mostra a comparação entre os géis realizados com os surfatantes CHAPS (figura 19) e o gel realizado com dodecil maltosídeo (Figura 15) no processo de extração e com 65 mM de CHAPS no processo de preparação para eletroforese. Visualmente e pelos números nas Tabelas 15 e 18 o uso de CHAPS contribuiu significativamente para a solubilização de proteínas, em relação ao surfatante

comumente usado (dodecil maltosídeo). O “matching” (23), nesse caso, foi ainda maior do que o obtido com ASB-16, apesar do maior número de “spots” revelado por aquele surfatante. Isso pode indicar que o gel, nesse caso, foi preparado em condições mais próximas (manuseio da amostra, forma de agitação e temperatura do ambiente) daquelas do gel realizado com o dodecil maltosídeo.



**Figura 22** – Comparação dos “spots” de proteínas de membrana mitocondrial interna de rato. Em roxo estão os “spots” detectados no gel realizado com tratamento de 43,2 mM de Dodecil maltosídeo, em vermelho estão os “spots” detectados no gel com tratamento de CHAPS, ambos com 65 mM de CHAPS no tampão de focalização. Em verde estão os “spots” encontrados em ambos os géis, conforme análise feita no software Platinnum, revelando 23 “spots” iguais.

Na análise feita pelo Microsoft Excel, os “spots” similares entre os géis de dodecil maltosídeo e CHAPS, apareceram na faixa de pI 3 a 6 e 8 a 9 (Tabelas 34, 35, 36 e 37 em anexos).

**TABELA 8** – Síntese dos resultados obtidos com surfatantes zwitteriônicos (número de “spots” e número de “matchings”, tendo como referência a Figura 21).

Surfatante	Número de “spots”	Número de “matchings”
ASB-14	53	9
ASB-16	205	12
CHAPS	131	23

Segundo Rabilloud *et al.* (1999), a eficiente solubilização pelo surfatante ASB-16 se deve a maior interação dos surfatantes da família das amidosulfobetaínas com os agentes caotrópicos do tampão de focalização isoelétrica (uréia e tiouréia), aumentando a solubilidade de proteínas de membrana.

O aparecimento de maior número de “spots” nos géis com ASB-16, em comparação ao ASB-14 - da mesma família (amidosulfobetaínas), pode ser atribuído à maior hidrofobicidade do ASB-16 cuja cadeia hidrocarbônica tem 2 carbonos a mais que o ASB-14. Chevallet e col. (1998) afirmaram que sutis modificações químicas induzem grandes mudanças nas propriedades físico-químicas desses surfatantes, bem como em suas propriedades de solubilização. A combinação de ASB-16 com CHAPS apresentou os melhores resultados pois, como já descrito por Domingues *et al.* (2007), esses dois surfatantes apresentam solubilização diferencial, ou seja, quando testados separadamente, apresentam “spots” em regiões diferentes do gel, apresentando, portanto, uma ação complementar quando associados. Embora CHAPS e os ASB sejam surfatantes da mesma família (amidosulfobetaínas), a porção hidrofóbica do CHAPS é distinta e isso pode levar à formação de um agregado micelar que favoreça essa diferença na solubilização (Domingues *et al.*, 2007).

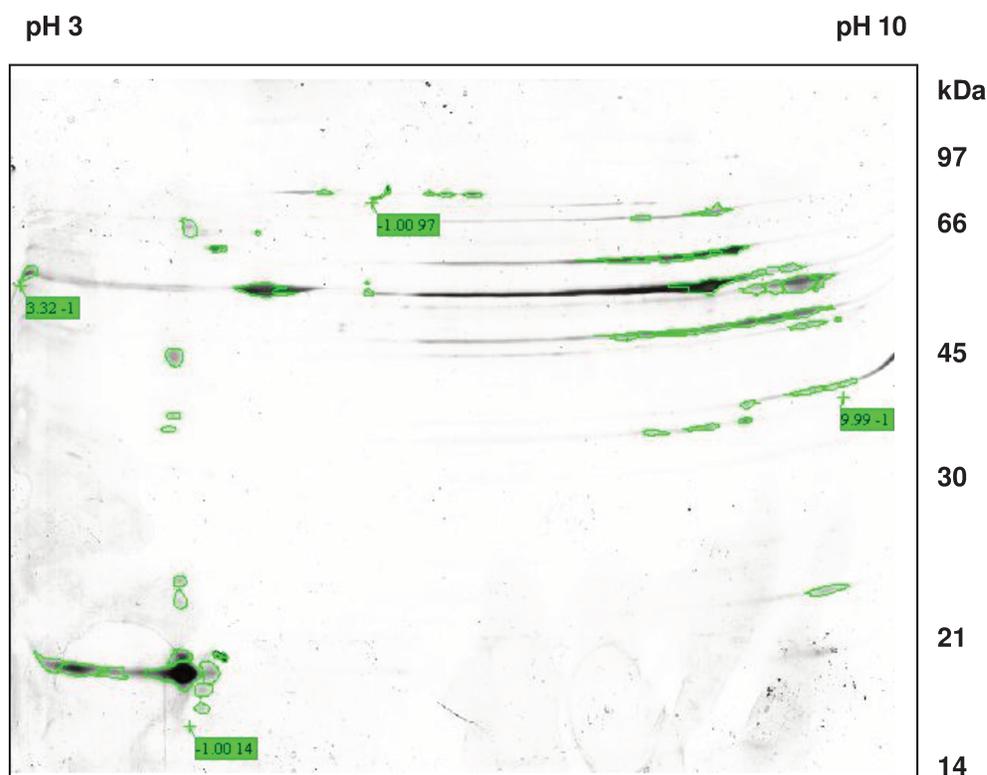
Como descrito por Heerklotz e Seelig (2000), quanto menor a CMC do surfatante, maior seu efeito lítico. Com isso, considerando as propriedades de agregação (Tabela 3) e os resultados obtidos com os surfatantes estudados percebe-se que o ASB-16, com o menor valor de CMC, teve os melhores resultados em solubilização das proteínas. Em relação aos demais detergentes, o ASB-16 atuou em concentração muito acima da sua CMC, que é menor que a de todos os surfatantes testados ( $1.10^{-5}M$ ), mesmo quando as concentrações foram iguais em 43,2mM. Este resultado está de acordo com Lê Maire *et al.* (2000) que atribui as micelas de surfatantes a responsabilidade pela solubilização proteica afirmando que, não há limite para a solubilização, que é tanto maior quanto maior for a concentração do surfatante, quando acima da sua CMC.

#### IV. 4. b – Surfatantes não-iônicos

Os surfatantes não-iônicos são, geralmente, fracos agentes desnaturantes podendo ser normalmente utilizados para solubilizar proteínas de membranas sem afetar, significativamente, sua estrutura (Le Maire *et al.*, 2000).

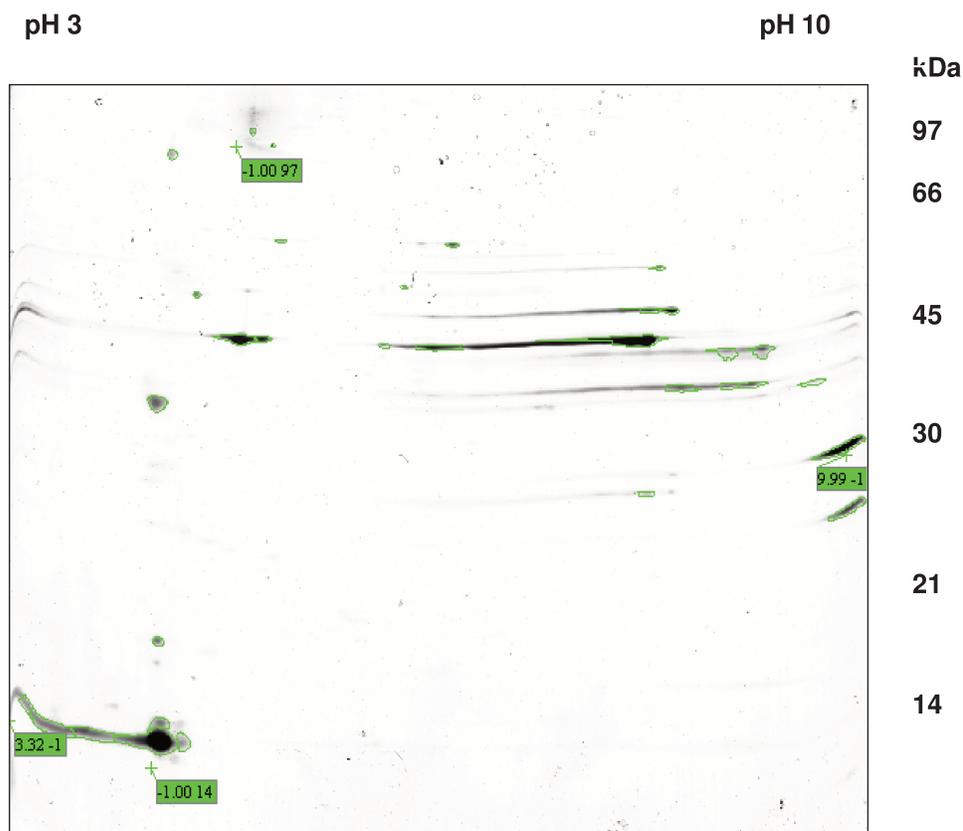
A escolha de surfatantes não-iônicos para estudos de proteínas de membrana se deve a 3 fatores importantes: a eficiência desse surfatantes em quebrar interações entre lipídios e entre proteínas e lipídios; a ineficiência em enfraquecer interações entre proteínas e a propriedade em serem menos desnaturantes do que surfatantes iônicos (Santos *et al.*, 2002).

A Figura 23 mostra um gel que foi feito com amostra de MMI cujas proteínas foram extraídas com uso de 43,2 mM de Digitonina e com 65mM de CHAPS no tampão de focalização. Um total de 62 “spots” foram detectados e seus valores aproximados de massa molecular e pI estão listados na Tabela 19 em anexos.



**Figura 23-** Separação de proteínas de membrana mitocondrial interna de rato por eletroforese bidimensional. 60 µg de proteínas foram previamente solubilizadas com 43,2 mM de Digitonina e com 65 mM de CHAPS no tampão de focalização. A focalização isoeétrica foi feita em gradiente de pH 3-10 não-linear e a coloração feita por impregnação com prata.

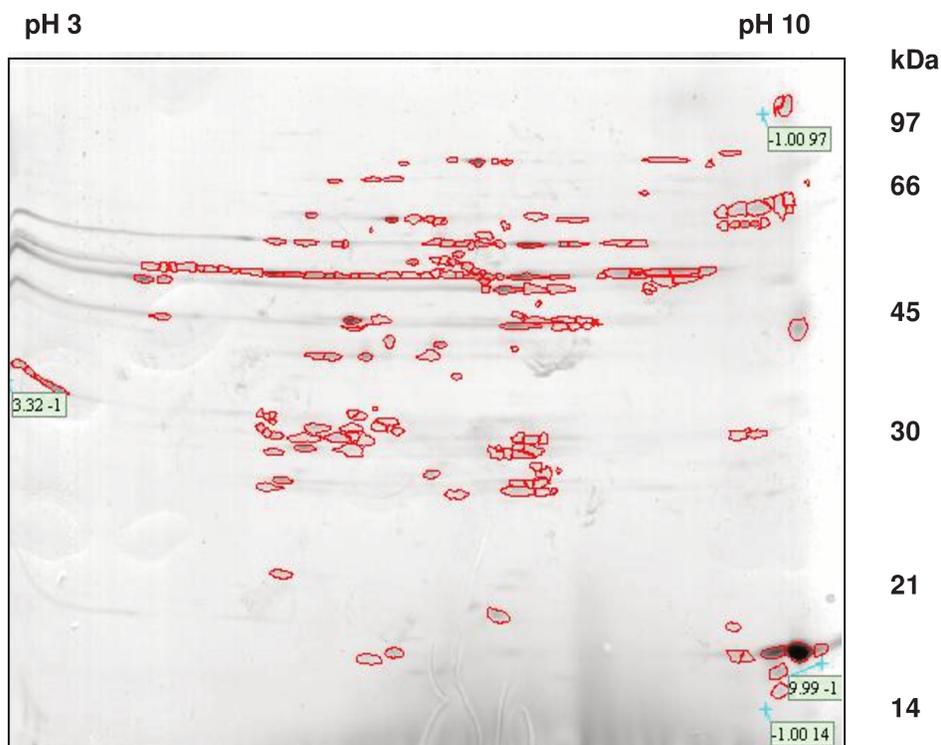
A Figura 24 mostra um gel preparado com proteínas de MMI extraídas com uso de 43,2 mM de  $C_{12}E_8$  e com 65mM de CHAPS no tampão de focalização. Um total de 32 “spots” foram detectados e seus valores aproximados de massa molecular e pI estão listados na Tabela 20 em anexos.



**Figura 24-** Separação de proteínas de membrana mitocondrial interna de rato por eletroforese bidimensional. 60  $\mu$ g de proteínas foram previamente solubilizadas com 43,2 mM de  $C_{12}E_8$  e com 65 mM de CHAPS no tampão de focalização. A focalização isoeétrica foi feita em gradiente de pH 3-10 não-linear e a coloração feita por impregnação com prata.

Com o surfatante  $C_{12}E_8$  houve um decréscimo de 48% no número de *spots*, em relação ao surfatante Digitonina.

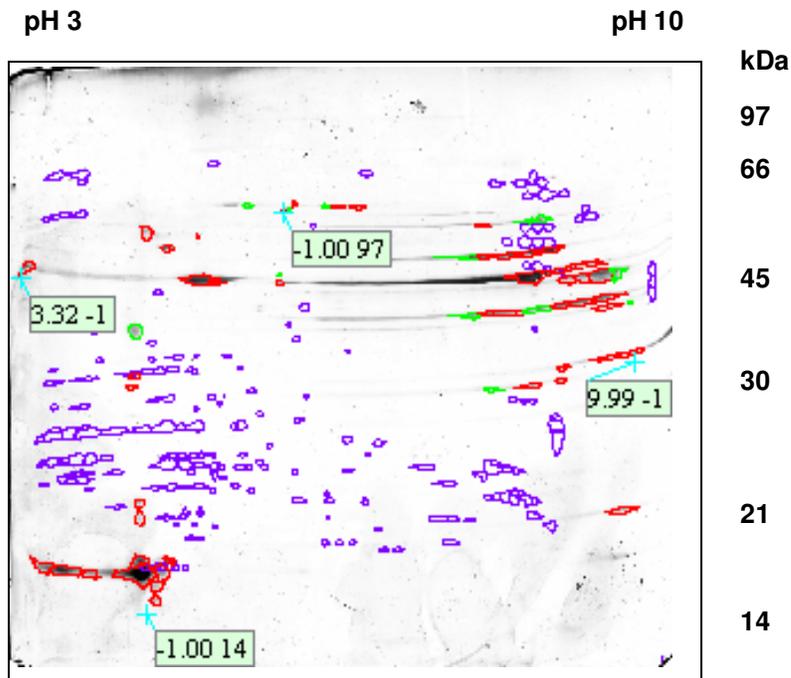
A figura 25 mostra um gel com amostra de MMI cujas proteínas foram extraídas com uso de 43,2 mM de Triton X-100 e 65mM de CHAPS no tampão de focalização. Um total de 190 “spots” foram detectados e seus valores aproximados de massa molecular e pI estão descritos na Tabela 21 em anexos.



**Figura 25-** Separação de proteínas de membrana mitocondrial interna de rato por eletroforese bidimensional. 60  $\mu\text{g}$  de proteínas foram previamente solubilizadas com 43,2 mM de Triton X-100 e com 65 mM de CHAPS no tampão de focalização. A focalização isoeétrica foi feita em gradiente de pH 3-10 não-linear e a coloração feita por impregnação com prata.

Com o surfatante Triton X-100 obteve-se um acréscimo de 306% no número de “spots”, em relação ao surfatante Digitonina e de 593%, em relação ao surfatante  $\text{C}_{12}\text{E}_8$ .

A Figura 26 mostra a comparação entre o gel preparado com o surfatante Digitonina (figura 23) e o gel feito com dodecil maltosídeo (Figura 15) na solubilização, ambos com 65mM de CHAPS no tampão de focalização.

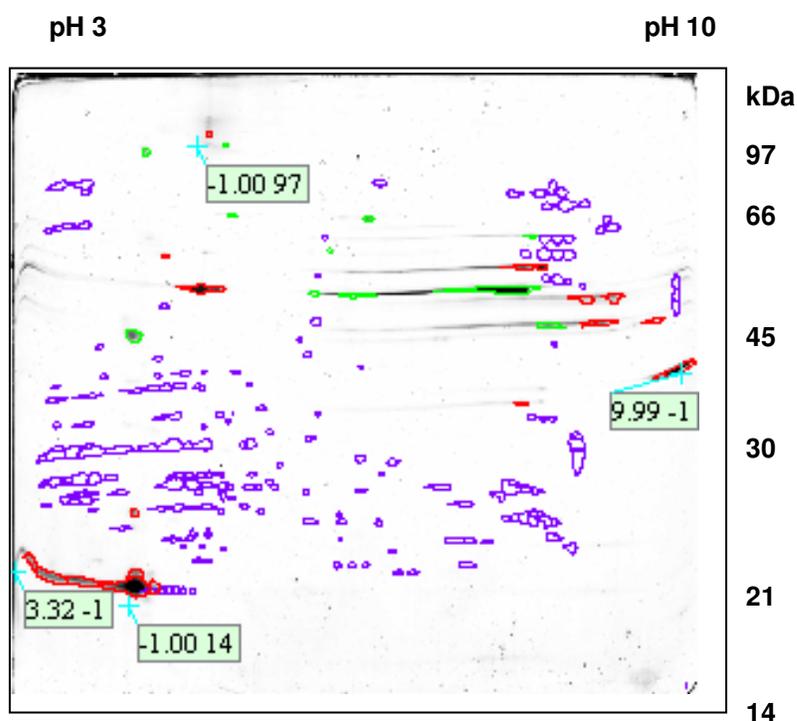


**Figura 26** – Comparação dos “spots” de proteínas de membrana mitocondrial interna de rato. Em roxo estão os “spots” detectados no gel realizado com tratamento de 43,2 mM de Dodecil maltosídeo ; em vermelho estão os “spots” detectados no gel com tratamento de Digitonina, ambos com 65 mM de CHAPS no tampão de focalização. Em verde estão os “spots” encontrados em ambos os géis, conforme análise feita no software Platinum, revelando 12 “spots” iguais.

Visualmente e pelos números nas Tabelas 15 e 19, o uso de Digitonina não contribuiu para a melhor solubilização de proteínas, se comparado ao surfatante dodecil maltosídeo.

Na análise feita pelo Microsoft Excel, os “spots” similares entre os géis de dodecil maltosídeo e Digitonina, apareceram na faixa de pI 4 a 5 e 8 a 10 (Tabelas 38, 39 e 40 em anexos).

A Figura 27 mostra a comparação entre géis preparados com os surfatantes  $C_{12}E_8$  (Figura 24) e dodecil maltosídeo (Figura 15) na solubilização, ambos com 65mM de CHAPS no tampão de focalização.

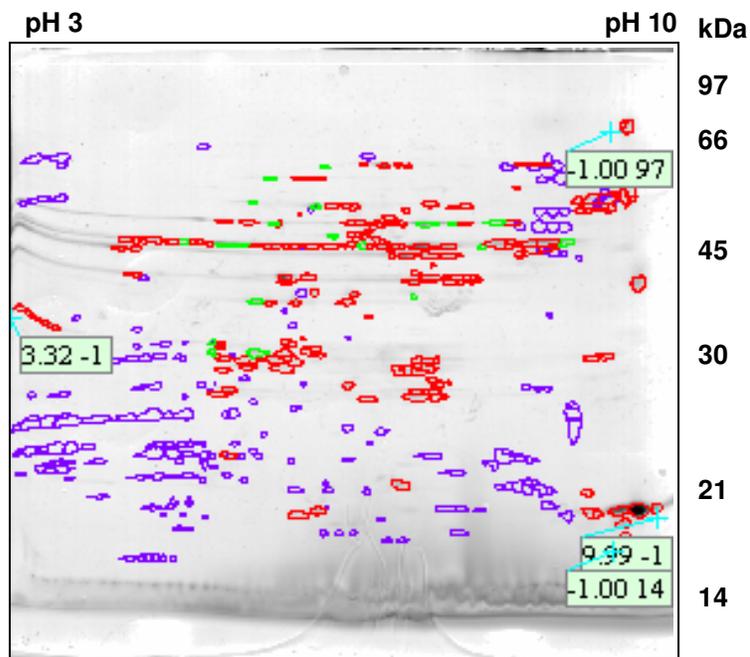


**Figura 27**– Comparação dos “spots” de proteínas de membrana mitocondrial interna de rato. Em roxo estão os “spots” detectados no gel realizado com tratamento de 43,2 mM de Dodecil maltosídeo ; em vermelho estão os “spots” detectados no gel com tratamento de  $C_{12}E_8$ , ambos com 65 mM de CHAPS no tampão de focalização. Em verde estão os “spots” encontrados em ambos os géis, conforme análise feita no software Platinum, revelando 11 “spots” iguais.

Visualmente e pelos números das Tabelas 15 e 20, o uso de  $C_{12}E_8$  também não contribuiu significativamente para a solubilização de proteínas, em comparação com o surfatante dodecil maltosídeo.

Na análise feita pelo Microsoft Excel, os “spots” similares entre os géis de dodecil maltosídeo e  $C_{12}E_8$ , apareceram na faixa de pI 4 a 5 (Tabela 41 em anexos).

A Figura 28 traz a comparação entre os géis preparados com os surfatantes Triton X-100 (Figura 25) e o gel preparado com dodecil maltosídeo (Figura 15) na solubilização, ambos com 65mM de CHAPS no tampão de focalização.



**Figura 28** – Comparação dos “spots” de proteínas de membrana mitocondrial interna de rato. Em roxo estão os “spots” detectados no gel realizado com tratamento de 43,2 mM de Dodecil maltosídeo; em vermelho estão os “spots” detectados no gel com tratamento de Triton X-100, ambos com 65 mM de CHAPS no tampão de focalização. Em verde estão os “spots” encontrados em ambos os géis, conforme análise feita no software Platinum, revelando 20 “spots” iguais.

Visualmente e pelos números nas Tabelas 15 e 21, o uso de Triton X-100 contribuiu significativamente para a solubilização de proteínas, se comparado com o dodecil maltosídeo, principalmente para proteínas com massa molecular entre 97 e 30 kDa. O “matching” nesse caso foi maior do que o obtido com os outros surfatantes. Este resultado pode indicar: 1) que o gel foi feito em condições mais próximas daquele realizado com o dodecil maltosídeo 2) que o surfatante Triton X-100 tem um efeito de solubilização parecido ao do dodecil maltosídeo.

Esse efeito similar ao dodecil maltosídeo pode ser relacionado aos valores próximos de CMC, HLB e número de agregação, entre esses surfatantes (Tabela 3).

Segundo experimentos descritos por Kragh-Hansen et al (1993) e Kragh-Hansen et al (1998), é essencial uma interação cooperativa entre moléculas dos surfatantes e dos lipídios da membrana para uma solubilização eficiente. A extensão da eficiência de solubilização depende da capacidade de cada tensoativo de penetrar e atravessar a membrana.

Dadas as propriedades anfífilas das cabeças polares (polioxietileno), de surfatantes como  $C_{12}E_8$  e Triton X-100, estes podem ter um “flip-flop” rápido através da membrana (Lê Maire, 2000). Sendo assim, os resultados obtidos com o surfatante Triton X-100 podem ser explicados por essa característica. Porém, no caso do surfatante  $C_{12}E_8$ , apesar dessa característica, e de seu alto efeito lítico (Prete *et al.*, 2002), não encontramos boa solubilização protéica nas amostras de MMI.

Na análise feita pelo Microsoft Excel, os “spots” similares entre os géis de dodecil maltosídeo e Triton X-100, apareceram na faixa de pI 5 a 7 e 9 e 10 (Tabelas 42, 43 e 44 em anexos).

**TABELA 9** – Síntese dos resultados obtidos com surfatantes não-iônicos (número de *spots*, porcentagem de acréscimo ou decréscimo de “spots” e número de “matchings”).

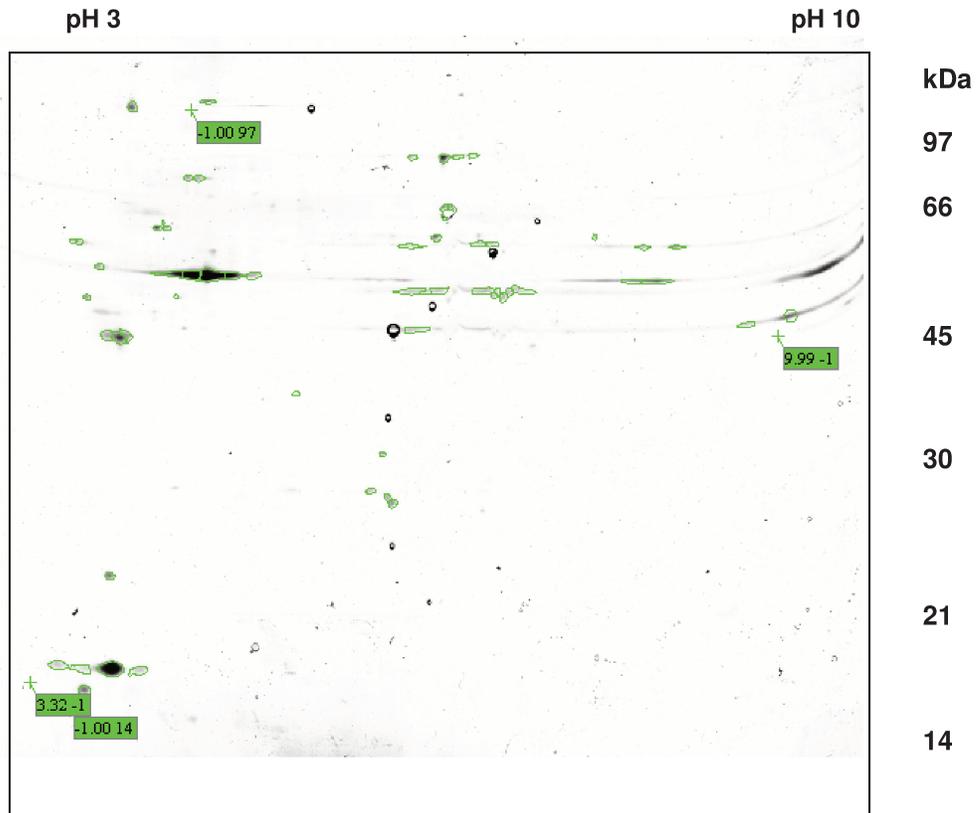
Surfatante	Número de “spots”	Número de “matchings”
Digitonina	62	12
$C_{12}E_8$	32	11
Triton X-100	190	20

Com os resultados descritos acima concluímos que o surfatante Triton X-100, dentre os surfatantes não-iônicos testados, apresenta os melhores resultados em comparação com o gel padrão de proteínas solubilizadas com dodecil maltosídeo, confirmando que o Triton X-100 pode ser muito útil na extração de proteínas de biomembranas, como descrito por Morandat *et al.*, (2002).

#### IV. 4. c – Surfatante aniônico

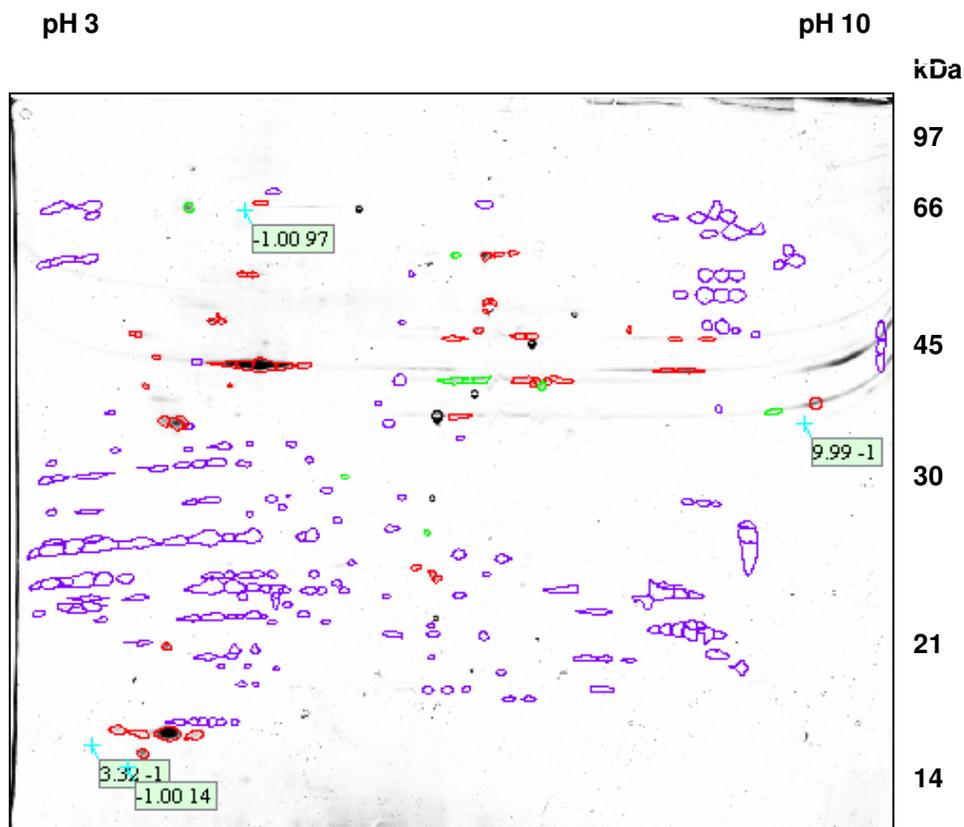
Dando seqüência a investigação do perfil de solubilização de proteínas da MMI pelos surfatantes mais empregados na literatura (Tabela 2), investigamos o detergente aniônico Colato de sódio, um sal biliar.

A Figura 29 mostra um gel que foi preparado com amostra de MMI cujas proteínas foram solubilizadas com uso de 43,2 mM de Colato de sódio e com 65mM de CHAPS no tampão de focalização. Um total de 58 “spots” foram detectados e seus valores aproximados de massa molecular e pI estão listados na Tabela 22 em anexos.



**Figura 29-** Separação de proteínas de membrana mitocondrial interna de rato por eletroforese bidimensional. 60  $\mu\text{g}$  de proteínas foram previamente solubilizadas com 43,2 mM de Colato de sódio e com 65 mM de CHAPS no tampão de focalização. A focalização isoeétrica foi feita em gradiente de pH 3-10 não-linear e a coloração feita por impregnação com prata.

A Figura 30 mostra a comparação entre o gel preparado com o surfatante Colato de sódio (Figura 29) e aquele preparado com dodecil maltosídeo (Figura 15) na etapa de solubilização, tendo 65mM de CHAPS no tampão de focalização.



**Figura 30** – Comparação dos “spots” de proteínas de membrana mitocondrial interna de rato. Em roxo estão os “spots” detectados no gel realizado com tratamento de 43,2 mM de Dodecil maltosídeo ; em vermelho estão os “spots” detectados no gel com tratamento de Colato de sódio, ambos com 65 mM de CHAPS no tampão de focalização. Em verde estão os “spots” encontrados em ambos os géis. Segundo análise feita com o software de análise Platinum, há 8 “spots” iguais em ambos os géis.

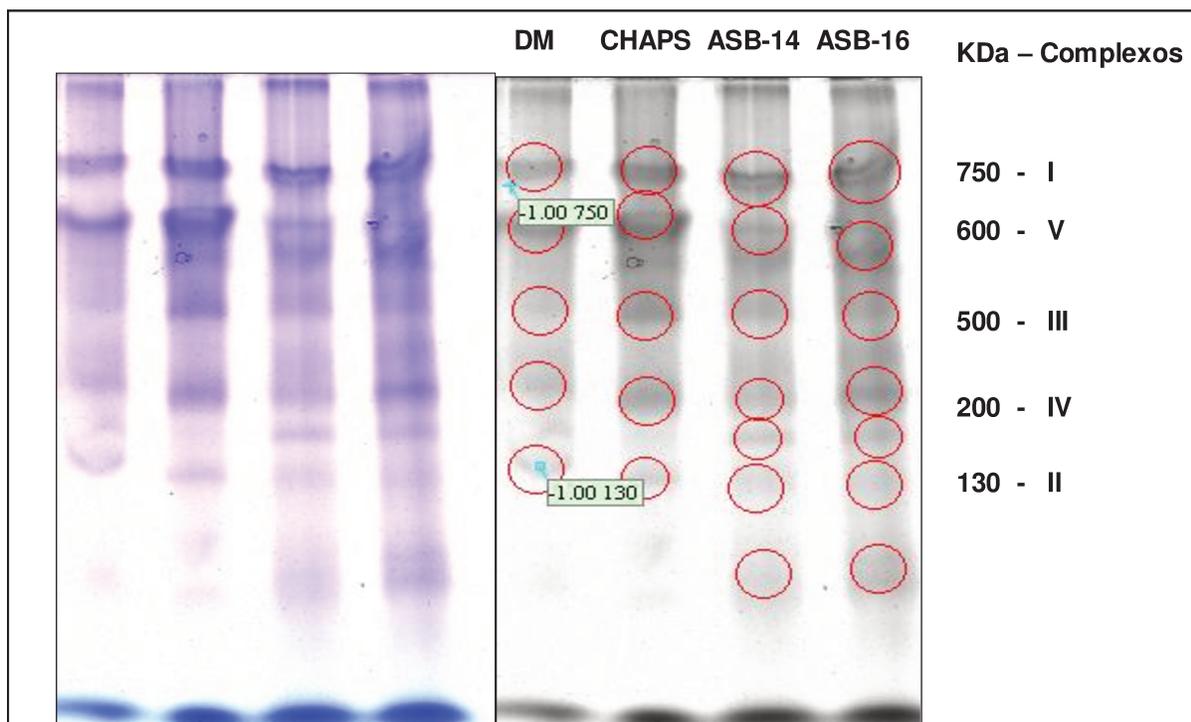
De acordo com a Figura anterior, o surfatante colato é capaz de solubilizar proteínas de membrana mitocondrial interna, porém não apresenta nenhuma vantagem em relação ao dodecil maltosídeo. Não há acréscimo no número de *spots* e a fase de focalização isoelétrica dessa amostra foi prejudicada, devido as propriedades deste surfatante, demorando em torno de 48 a 52 horas. Esses dados comprovam a descrição anterior de Seddon e col. (2004), de que os surfatantes sais biliares são fracos em relação ao poder de solubilização de proteínas, sendo em geral não-desnaturantes. A baixa solubilização também encontra respaldo no “flip-flop” muito lento através da membrana que esse sal biliar apresenta (Lasch, 1995; Wüstner *et al.*, 1998).

Na análise feita pelo Microsoft Excel, os “spots” similares entre os géis de dodecil maltosídeo e Colato de sódio, apareceram na faixa de pI 4 a 5 e 6 e 7 (Tabelas 45 e 46 em anexos).

De acordo com Berger et al. (2005) os valores de HLB constituem um parâmetro interessante para compreensão das interações entre proteínas e surfatantes, favorecendo o desenvolvimento de uma seleção sistemática de surfatantes. Assim, para cada membrana haveria uma faixa de HLB mais apropriada para solubilização de suas proteínas, sendo os surfatantes com esta razão hidrofílica/lipofílica os mais eficientes. Por isso, analisando os dados do presente estudo, propomos que a faixa de HLB para a seleção de surfatantes para a solubilização da membrana mitocondrial interna está entre 10 e 13.

#### **IV. 5 - Avaliação da seletividade dos surfatantes na eletroforese em gel nativo**

A figura 31 mostra perfis de eletroforese nativa, obtidos com amostras de MMI cujas proteínas foram extraídas com os surfatantes zwitteriônicos em estudo, em comparação com dodecil maltosídeo. Do lado esquerdo aparece a coloração nativa de cada gel (com Comassie Blue) e a direita é mostrada, a detecção e análise das bandas através do Software Platinum 6.0.



**Figura 31** - Perfil eletroforético (1-D) de proteínas de membrana mitocondrial interna de rato solubilizadas com detergentes zwitteriônicos (CHAPS, ASB 14 e ASB 16) e com dodecil maltosídeo para comparação. 20  $\mu$ g de proteínas foram separadas em gel nativo de poli-acrilamida, de acordo com o novo protocolo aqui desenvolvido.

A Tabela 10 mostra os valores de massa molecular e volume das bandas detectadas na Figura 31. As bandas foram numeradas por ordem decrescente de massa molecular.

**Tabela 10** - Valores aproximados de massa molecular, porcentagem de volume das bandas presentes no gel nativo realizado com proteínas de membrana mitocondrial interna de mitocôndria de rato, solubilizadas com 43,2 mM de surfatantes zwitteriônicos (CHAPS, ASB-14 E ASB-16) ou Dodecil maltosídeo (DM).

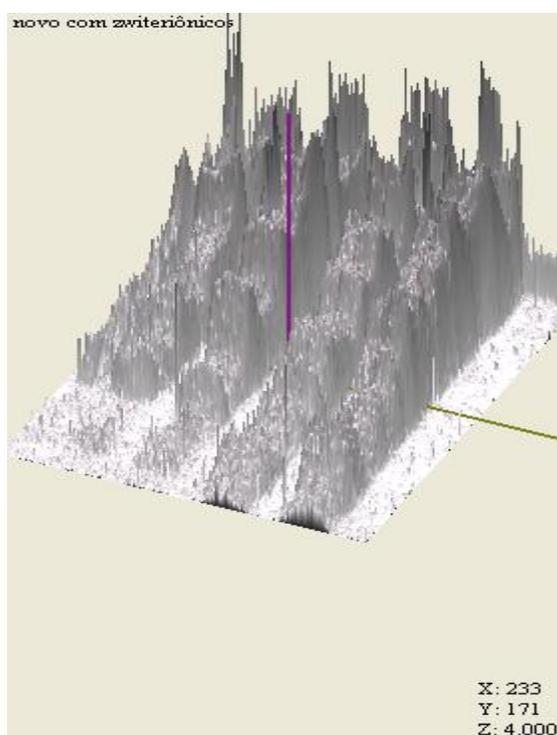
Bandas com DM	Massa molecular (kDa)	% volume
1	826	432,9
2	660	149,8
3	522	288,2
4	340	302,7
5	130	228,6
Bandas com CHAPS		
1	817	175,2
2	680	246,1
3	524	331,6
4	333	469,6
5	127	250,4
Bandas com ASB-14		
1	783	780,4
2	619	625,1
3	524	288,6
4	333	435,8
4b	156	204,9
5	122	179,4
5b	114	247,2
Bandas com ASB-16		
1	835	554,1
2	574	613,3
3	524	343,4
4	338	394,8
4b	156	180,2
5	130	200,5
5b	116	499,9

As massas moleculares das bandas 1 a 5 nos permitem atribuí-las aos complexos I, V, III, IV e II, respectivamente, de acordo com dados da literatura (Schägger & von Jagow, 1991). No caso das aminosulfobetaínas ASB-14 e ASB-16, duas bandas extras (4b e 5b), além daquelas correspondentes aos complexos I a V puderam ser visualizadas. Como descrito por Molnar *et al.* (2004) os complexos I e V correm no gel em seu estado monomérico, com pesos moleculares entre 750 a 600 kDa, respectivamente, enquanto o complexo III corre como um dímero, com massa molecular de 500 kDa. O complexo IV, 200 kDa, corre em sua forma monomérica mas, ocasionalmente, uma segunda banda desse complexo é detectada, possivelmente representando um dímero do mesmo. Portanto, as bandas que surgiram (4b e 5b) podem

corresponder a subunidades do complexo III, indicando que esses surfatantes desnaturaram alguns complexos, ou podem representar dímeros do Complexo IV.

Há também a possibilidade de que estes surfatantes tenham promovido a solubilização de outras proteínas de membrana, menos abundantes que aquelas da Cadeia de Transporte de Elétrons, permitindo sua visualização, o que estaria de acordo com relatos da literatura que mostraram que esses surfatantes aumentam a solubilidade de proteínas de vários tipos de membranas, permitindo a visualização e identificação de proteínas não detectadas anteriormente (Chevallet *et al.*, 1998).

A Figura 32 mostra, a título de demonstração, a visualização tridimensional do gel, usada para a quantificação das bandas listadas na Tabela 10, pelo software Platinum.



**Figura 32-** Visualização tridimensional do gel apresentado na figura 31. Os dados de volume das bandas estão listados na Tabela 8.

O surfatante dodecil maltosídeo apresentou dados inferiores aos surfatantes acima citados mostrando que, em termos de separação protéica por eletroforese nativa, as amostras extraídas com surfatantes zwitteriônicos apresentam melhores resultados, o que pode indicar uma maior interação desses surfatantes com os reagentes utilizados na preparação da eletroforese.

Os valores da Tabela 10 foram normalizados em função da variação de volume (Tabela 11), para fins de comparação com o dodecil maltosídeo. Note-se que a somatória das porcentagens é 100 em todas as colunas, tal que não é possível comparar o efeito global de cada surfatante sobre o volume, como na Tabela 10.

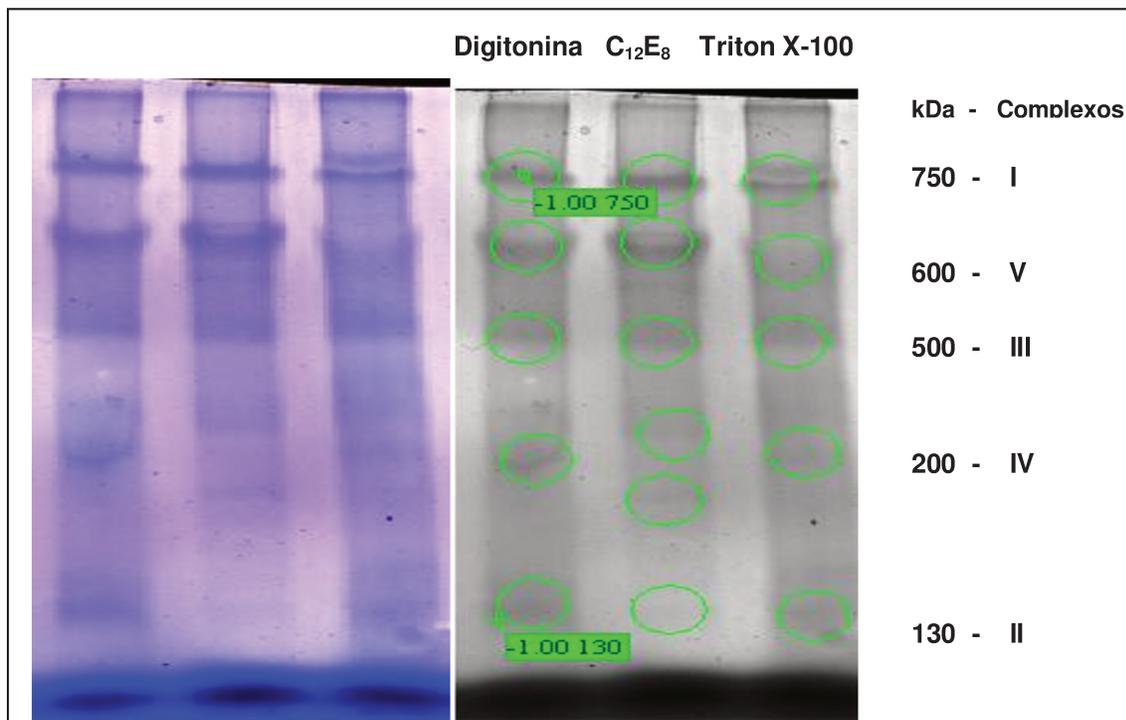
**Tabela 11** – Variação porcentual no volume nas bandas presentes no gel nativo (valores normalizados a partir das medidas absolutas da Tabela 10) de proteínas de membrana mitocondrial interna de mitocôndria de rato, solubilizadas com 43,2 mM de surfatantes zwitteriônicos (CHAPS, ASB-14 E ASB-16) ou Dodecil maltosídeo.

Bandas	Complexo	Dodecil Maltosídeo	CHAPS	ASB-14	ABS-16
1	I	30,9	11,9	28,3	19,9
2	V	10,7	16,7	22,6	22,0
3	III	20,6	22,5	10,4	12,3
4	IV	21,6	31,9	15,8	14,2
4b				7,4	6,5
5	II	16,3	17,0	6,5	7,2
5b				9,0	17,9

De acordo com estes dados (Tabela 9) o surfatante CHAPS teve uma maior seletividade pela banda que corresponde ao complexo IV, enquanto os surfatantes ASB-14 e ASB-16 foram mais seletivos para o complexo V, se comparados com o dodecil maltosídeo.

Os menores valores de solubilização dos complexos III e IV por ASB-14 e ASB-16 podem ser indício de que as bandas 4b e 5b realmente correspondem a subunidades de um ou ambos daqueles complexos, separadas por ação destes detergentes.

A figura 33 mostra perfis de eletroforese nativa, obtidos com amostras de MMI cujas proteínas foram extraídas com os surfatantes não iônicos estudados. Do lado esquerdo aparece a coloração nativa de cada gel com Comassie Blue e, à direita, demonstra-se a detecção e análise das bandas, através do Software Platinum 6.0.



**Figura 33** - Perfil eletroforético (1-D) de proteínas de membrana mitocondrial interna de rato, solubilizadas com detergentes não-iônicos. 20 µg de proteínas foram separadas em gel nativo de poliacrilamida, de acordo com o protocolo modificado aqui apresentado.

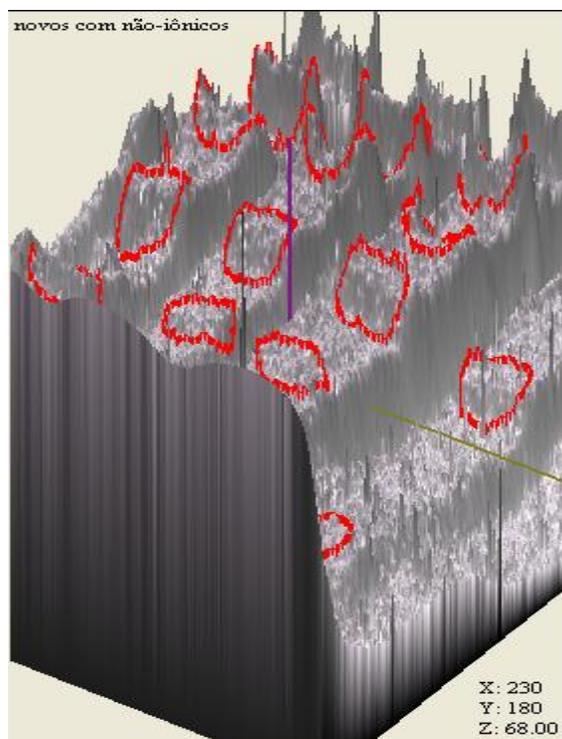
A Tabela 12 mostra os valores de massa molecular, porcentagem de volume por bandas detectadas na figura. A numeração das bandas na tabela é decrescente, em relação a massa molecular correspondente

**Tabela 12** - Valores aproximados de massa molecular, porcentagem de intensidade e volume das bandas presentes no gel nativo realizado com proteínas de membrana mitocondrial interna de rato, solubilizadas com 43,2 mM de surfatantes não-iônicos.

Bandas com DM	Massa molecular (kDa)	% volume
1	826	432,9
2	660	149,8
3	522	288,2
4	340	302,7
5	130	228,6
Bandas com Digitonina	Massa molecular (kDa)	% volume
1	750	775,9
2	649	739,5
3	520	851,5
4	244	655,3
5	146	186,5
Bandas com C <sub>12</sub> E <sub>8</sub>		
1	734	952,0
2	650	787,4
3	520	469,8
4	270	332,3
4b	230	470,4
5	137	291,4
Bandas com Triton X-100		
1	734	123,8
2	600	405,0
3	540	568,5
4	251	388,6
5	131	299,9

O surfatante dodecil maltosídeo apresentou menor solubilização (Tabela 10) que os surfatantes não iônicos da Tabela 12, mostrando que em termos de separação protéica por eletroforese nativa, o dodecil maltosídeo é o surfatante não-iônico menos efetivo dentre os analisados.

A Figura 34 mostra a visualização tridimensional do gel, usada para quantificação das bandas listadas na Tabela 12, pelo software Platinum.



**Figura 34-** Visualização tridimensional do gel da Figura 38. Os dados de volume encontram-se na tabela 10.

Os valores da Tabela 12 foram normalizados em função da variação de volume (Tabela 13), para comparação com o dodecilmaltosídeo. Note-se que a somatória das porcentagens é 100 em todas as colunas, não sendo possível comparar o efeito global de cada surfatante sobre o volume, como na Tabela 12.

**Tabela 13** – Variação percentual no volume nas bandas presentes no gel nativo (valores normalizados a partir das medidas absolutas da Tabela 12) de proteínas de membrana mitocondrial interna de rato, solubilizadas com 43,2 mM de surfatantes não-iônicos (Digitonina, C<sub>12</sub>E<sub>8</sub> e Triton X-100).

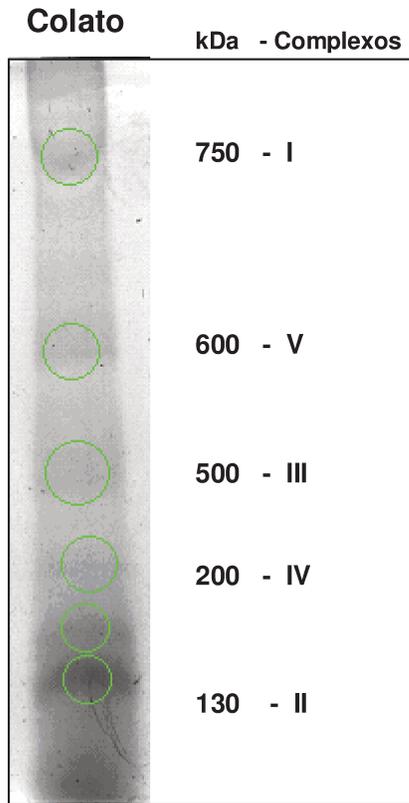
Bandas	Complexo	DodecilMaltosídeo	Digitonina	C <sub>12</sub> E <sub>8</sub>	Triton X-100
1	I	30,9	24,1	28,8	6,9
2	V	10,7	23,0	23,8	22,6
3	III	20,6	26,5	14,2	31,8
4	IV	21,6	20,4	10,1	21,7
4b				14,2	
5	II	16,3	5,9	8,9	16,9

No caso do éter de polioxietileno C<sub>12</sub>E<sub>8</sub>, uma banda extra (4b), além daquelas correspondentes aos complexos I a V da Cadeia de transporte de Elétrons, pôde ser

visualizada. Neste caso, como discutido anteriormente para o efeito dos surfatantes ASB, esta banda adicional pode se atribuída a subunidades advindas da quebra, por desnaturação branda dos complexos protéicos, visto que, esse surfatante apresenta um rápido “flip-flop” na bicamada, penetrando e solubilizando mais rapidamente a membrana (Kragh-Hansen *et al.*, 1998; Le Maire *et al.*, 2000).

De acordo com os valores de volume obtidos na Tabela 13, em relação ao dodecilmaltosídeo, o surfatante Triton X-100 teve uma maior seletividade pelas bandas que corresponderiam aos complexos II, III e IV, o surfatante C<sub>12</sub>E<sub>8</sub> pelos complexos I e V (ATP sintase) e o surfatante Digitonina pelos complexos IV e V, mas com dados inferiores aos demais.

A Figura 35 mostra perfis de eletroforese nativa obtidos com amostras de MMI cujas proteínas foram extraídas com o surfatante aniônico colato de sódio, em comparação com o dodecil maltosídeo. Do lado esquerdo aparece a coloração nativa de cada gel com Comassie Blue e, a direita, demonstra-se a detecção e análise das bandas, através do Software Platinum 6.0.



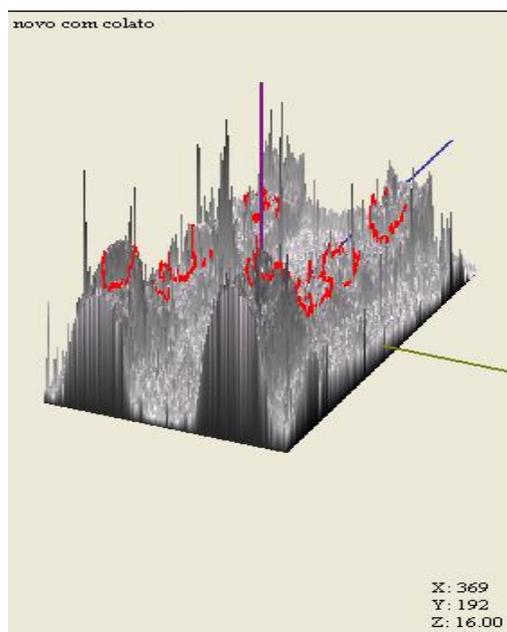
**Figura 35** - Perfil eletroforético (1-D) de proteínas de membrana mitocondrial interna de rato, solubilizadas com o detergente colato de sódio. 20  $\mu$ g de proteínas foram separadas em gel nativo de poliacrilamida, de acordo com protocolo modificado.

A Tabela 14 mostra os valores de massa molecular, porcentagem de volume por bandas detectadas na figura 40. A numeração das bandas é decrescente, em relação a massa molecular correspondente.

**Tabela 14** - Valores aproximados de massa molecular, porcentagem de volume das bandas presentes no gel nativo realizado com proteínas de membrana mitocondrial interna de rato, solubilizadas com 43,2 mM de surfatante colato de sódio, em comparação com dodecil maltosídeo.

Bandas com DM	Massa molecular (kDa)	% volume
1	826	432,9
2	660	149,8
3	522	288,2
4	340	302,7
5	130	228,6
Bandas com Colato	Massa molecular (kDa)	% Volume
1	877	831,4
2	453	649,6
3	397	696,6
4	217	669,6
4b	175	748,1
5	145	550,5

Na Figura 36 tem-se a visualização tridimensional do gel, usada para a quantificação das bandas listadas na Tabela 14, pelo software Platinum.



**Figura 36** - Visualização tridimensional do gel acima. Os dados de volume encontram-se na tabela acima.

Uma banda (4b) além daquelas correspondentes aos complexos I a V pôde ser visualizada, e pode ser resultado de alguma desnaturação protéica (como descrito anteriormente para os ASB e  $C_{12}E_8$ ), sendo o seu uso descrito como pouca relevância no isolamento de proteínas e glicoproteínas funcionais, (Jones, 1999).

De acordo com os valores de volume obtidos (Tabela 14) o surfatante Colato de sódio teve uma maior solubilização em relação ao padrão, dodecil maltosídeo. Na Tabela 13, os valores de volume da Tabela 14 foram normalizados em função da variação de volume, para comparação com o dodecilmaltosídeo. Neste caso observa-se que o Colato de sódio solubilizou com maior seletividade as bandas que corresponderiam aos complexos V (ATP sintase) e II, em relação ao dodecil Maltosídeo.

**Tabela 15** – Variação percentual no volume nas bandas presentes no gel nativo (valores normalizados a partir das medidas absolutas da Tabela 14) de proteínas de membrana mitocondrial interna de mitocôndria de rato, solubilizadas com 43,2 mM do surfatante aniônico colato de sódio.

Bandas	Complexo	Colato de sódio
1	I	20,0
2	V	15,6
3	III	16,8
4	IV	16,1
4b		18,0
5	II	13,5

Para um melhor análise sobre a seletividade de cada surfatante, experimentos com testes enzimáticos e análises mais detalhadas dos géis acima precisam ser realizados.

Igualmente para avaliação da eficiência dos surfatantes, são necessárias ainda análises mais detalhadas dos géis, por espectrometria de massas além de um conhecimento mais aprofundado sobre as características de solubilização de cada surfatante estudado, pois a solubilização de proteínas é complexa e favorecida pela interação proteína-surfatante, que por sua vez é determinada pelo tipo de agregado que o detergente forma (tamanho e forma da micela, no. agregação).

#### **IV. 6- Avaliação da estabilidade das amostras**

Nas descrições em literatura sobre as proteínas de membrana mitocondrial interna não há informação clara sobre o tempo em que as amostras podem ser armazenadas sem perda da integridade proteica, dificultando assim a escolha entre utilizar a mesma amostra após algum tempo ou purificar novas alíquotas. Por este motivo uma alíquota da preparação de MMI foi armazenada a -70°C por alguns meses para ser utilizada em

separação por SDS-PAGE, para sabermos se as proteínas ainda se encontravam íntegras na amostra.

O uso de SDS-PAGE não permite avaliar o estado funcional das proteínas mas permitiu avaliar se as amostras estocadas poderiam ser usadas em técnicas desnaturantes como eletroforese bidimensional (IEF + SDS-PAGE). A figura 37a mostra o gel de SDS-PAGE 1D obtido com a amostra fresca, recém preparada. Observa-se um maior número de bandas e ainda menor tamanho das bandas protéicas reveladas (em relação aos experimentos em condições não desnaturantes – Figuras 10 a 13) indicando a separação das subunidades proteicas dos complexos enzimáticos da MMI nas condições de preparo da SDS-PAGE.

Este experimento foi repetido usando-se amostra congelada a  $-70^{\circ}\text{C}$  por três meses, e os resultados são mostrados na Figura 37b. Nessa figura é possível observar que algumas proteínas de baixo peso molecular (com menos de 30 kDa) não foram visualizadas, dando a entender que foram degradadas após esse período de armazenamento. Porém as proteínas com maior peso molecular, mantiveram-se intactas.

Após seis meses, outra alíquota descongelada foi submetida a eletroforese SDS-PAGE 1D, como mostra a Figura 37c. Neste caso a visualização das bandas protéicas começou a ficar comprometida. As proteínas com peso molecular acima de 30 kDa mantiveram-se aparentemente intactas mas foi necessário maior tempo de descoloração da amostra para melhor visualização das mesmas, indicando que houve uma queda aparente na quantidade dessas proteínas.

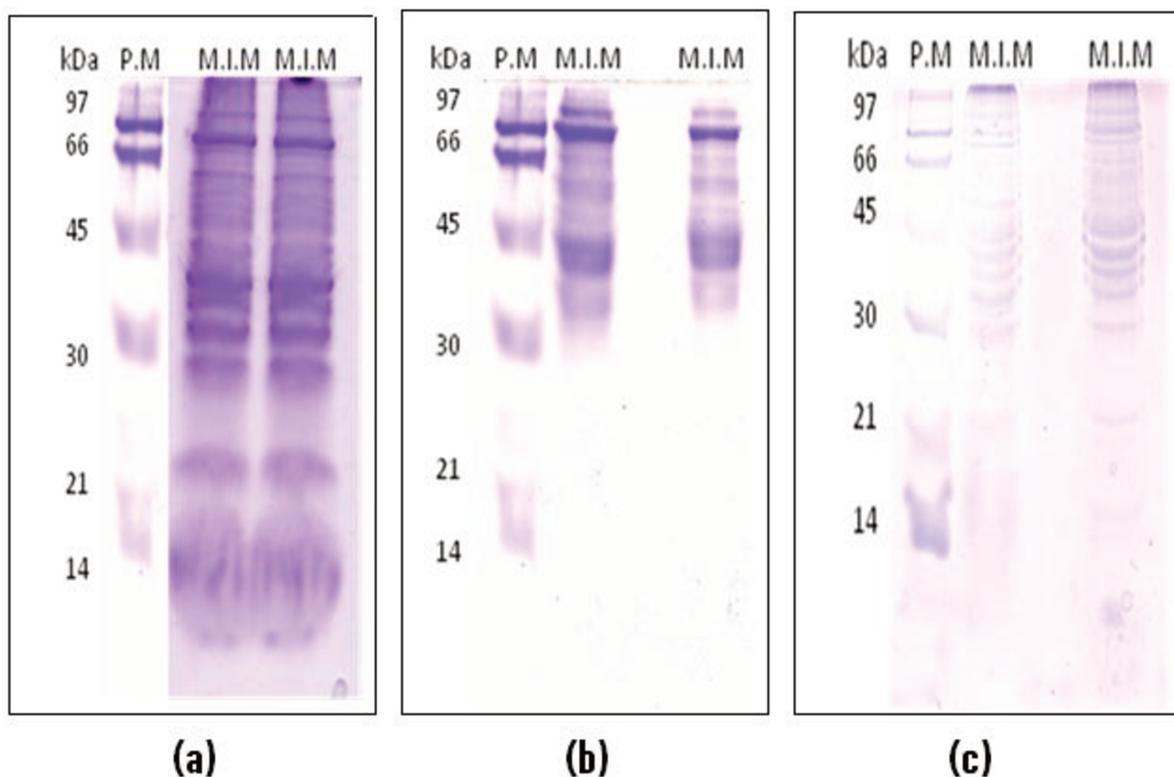
A extração dessas proteínas envolveu a maceração do tecido, que tornou a célula exposta ao solvente. Com isso, algumas proteases e enzimas de degradação ganham acesso a compartimentos aos quais não tinham acesso, resultando em uma potente degradação protéica (Olivieri *et al.*, 2001).

Esse risco é minimizado por baixa temperatura ( $-70^{\circ}\text{C}$ ), por manipulação rápida da amostra e por uso de inibidores de proteases e outros inibidores enzimáticos. Idealmente, o tipo de atividade de protease deveria ser determinada para que inibidores específicos fossem usados, mas na prática, muitas vezes por conveniência, um cocktail de inibidores é adicionado (Ericsson *et al.*, 2006).

No presente estudo foram utilizados dois inibidores de proteases: PMSF (inibidor de serino proteases) e EDTA (inibidor de metaloproteases).

Com os testes de validação da amostra acima mostrados, podemos concluir que é interessante utilizar as preparações de MMI recém-preparadas (com até 90 dias) já que parece haver perda da integridade protéica com o armazenamento. A manutenção em 90 dias, foi adquirida com o armazenamento a  $-70^{\circ}\text{C}$  e a pouca manipulação, ou seja, as amostras foram armazenadas em pequenas alíquotas, sendo descongeladas apenas a quantidade necessária para o experimento do momento, ficando as outras amostras intocadas.

A perda da integridade após 90 dias pode ser devido ao PMSF ter uma curta meia-vida (Ericsson *et al.*, 2006), podendo gerar a atuação das serinoproteases após alguns meses.



**Figura 37-** Perfil eletroforético (1-D) de proteínas de membrana mitocondrial interna de rato, 20  $\mu\text{g}$  de proteínas foram separadas em condições desnaturantes, em gel de poliácridamida a 12,5% (SDS-PAGE). (a) amostra recém preparada; (b) amostra após 3 meses; (c) amostra após 6 meses. P.M: padrão, M.I.M: proteínas da membrana mitocondrial interna em duplicata.

## V – Conclusões

### 1. ELETROFORESE EM CONDIÇÕES NATIVAS

- A metodologia utilizada para eletroforese em gel nativo descrita por Laemmli *et al.* (1970) é a menos adequada para a separação das proteínas de membrana mitocondrial interna de músculo gastrocnêmio de ratos Wistar, pois a visualização das bandas fica dificultada.

- Como esperado, a metodologia BN-PAGE (Shägger & von Jagow, 1991), também utilizada para separação de proteínas em sua forma nativa, mostrou-se capaz de separar as proteínas da MMI, embora com algumas desvantagens metodológicas, a saber: i) alguns reagentes usados nos tampões de corrida e na composição dos géis são diferentes dos utilizados nas eletroforeses convencionais (nativas e desnaturantes) e um pouco mais caros; ii) é necessário realizar a troca de tampões no meio da corrida eletroforética, induzindo desestabilização na temperatura e aumento do tempo de corrida (cerca 4 h); iii). o corante Comassie Blue G-250, usado em um dos tampões de corrida impregna todo o equipamento.

- Desenvolvemos um novo protocolo para eletroforese em gel nativo, no qual foi mantido o tampão de amostra descrito no procedimento de BN-PAGE e se adaptou outros passos da técnica, considerando-se o protocolo de Laemmli *et al.* (1970).

#### **Este novo protocolo:**

- ✚ Possibilitou a preparação em temperatura ambiente, de um gel com as proteínas de MMI de boa resolução, com menor tempo de corrida (1-2 horas), empregando reagentes de menor custo e sem haver necessidade de troca de tampões ou impregnação do equipamento durante a corrida.

✚ É eficiente para a separação das proteínas da MMI em seu estado nativo, de acordo com testes enzimáticos realizados para as bandas relativas aos Complexos I e V da Cadeia Respiratória.

✚ Pode ser usado em substituição ao BN-PAGE, na etapa de separação em gel nativo das proteínas da MMI para uso em géis de eletroforese bidimensional (Nijtmans et al.,2002).

- Os testes de validação da amostra (técnica de SDS-PAGE) indicam que, para preparação do gel nativo, é aconselhada a utilização das preparações de MMI recém-preparadas ou com até 90 dias pós preparo, pois há perda da integridade protéica com o armazenamento.

## 2. COMPARAÇÃO ENTRE SURFATANTES EM GÉIS NATIVOS E EM CONDIÇÕES DESNATURANTES

- O surfatante não-iônico dodecil maltosídeo, de uso preconizado na literatura para preparo dos géis 2D, apresentou boa ação solubilizadora sobre as proteínas de MMI, mesmo quando usado em concentrações menores (43,2 mM) do que a preconizada na literatura (10% ou 195,8 mM).

- Em uma mesma concentração (43,2 mM), o detergente zwitteriônico ASB-16 é o melhor solubilizador das proteínas de MMI em géis 2D. Dentre os surfatantes não-iônicos, o Triton X-100 apresentou também um efeito solubilizador marcante, apesar de não superar os valores da solubilização (números de spots) do dodecil maltosídeo.

- A associação de cada surfatante com 65 mM de CHAPS no tampão de amostra para focalização isoeletrica induziu um aumento significativo no número total de spots visualizados nos géis 2D.

- Levando-se em conta os resultados do uso de surfatantes no processo de solubilização de proteínas de MMI, o surfatante mais eficiente em relação ao número de “spots” visualizados em géis 2D foi o ASB-16 (zwiteriônico), seguido pelo não-iônico Triton X-100 e pelo zwiteriônico CHAPS. O perfil de solubilização entre os detergentes testados foi: ASB-16 > Triton X-100 > CHAPS > Digitonina > Colato de sódio > ASB-14 > C<sub>12</sub>E<sub>8</sub>.

- De acordo com os dados dos surfatantes propomos que a faixa de HLB para a seleção de surfatantes para a solubilização da membrana mitocondrial interna está entre 10 e 13.

- Nos géis de eletroforese nativa das amostras de proteínas de MMI extraídas com os surfatantes zwiteriônicos em estudo, o CHAPS apresentou maior seletividade pelas bandas que correspondem aos complexos III e IV, enquanto ambos surfatantes da série ASB foram seletivos para o complexo V, em comparação com o dodecilmaltosídeo. A relativa menor solubilização dos complexos III e IV pelos ASB foi concomitante à detecção de bandas extras de baixas massas molares nos géis 1D, e que poderiam corresponder a subunidades daqueles complexos, separadas por ação desnaturante branda dos detergentes amidosulfobetaínas.

- Nos géis nativos de proteínas de MMI com detergentes não iônicos, o Triton X-100 mostrou maior seletividade pelas bandas correspondentes aos complexos II, III e IV; o C<sub>12</sub>E<sub>8</sub> pelos complexos I e V e a Digitonina pelos complexos IV e V. Também no caso do éter de polioxietileno C<sub>12</sub>E<sub>8</sub>, uma banda extra, além daquelas correspondentes aos complexos I a V da Cadeia de transporte de Elétrons, foi visualizada, podendo ser atribuída à desnaturação branda dos complexos protéicos.

- O surfatante colato de sódio (aniônico) em todos os experimentos apresentou efeito inferior aos demais surfatantes estudados, em relação a proteínas de MMI, corroborando relatos da literatura que o descrevem como um surfatante de baixa capacidade solubilizadora de proteínas.

## VI - Perspectivas

- Determinar protocolos de solubilização específicos para cada complexo protéico da Cadeia Respiratória de MMI, baseados nos dados de seletividade dos surfatantes estudados.
- Conduzir a validação da amostra através de congelamento e descongelamento das amostras.
- Conduzir a validação de amostras armazenadas por eletroforese nativa bidimensional, em relação a atividade enzimática das proteínas da membrana interna da mitocôndria.
- Avaliar o efeito de tratamentos prévios (uso de solventes orgânicos, carbonato e outros sais) na precipitação de proteínas, previamente a solubilização por surfatantes.

## VII- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abidi, T. F.; Flanagan, T.D. (1984) Cell-mediated cytotoxicity against targets bearing Sendai virus glycoproteins in the absence of viral infection. **J. Virol.** **50**: 380-386.

Ackrell, B. A. C. (2002). Cytopathies involving mitochondrial complex II. **Mol.Asp. Med.** **23**: 369-384.

Aivaliotis, M.; Corvey, C.; Tsirogianni, I.; Karas, M.; Tsiotis, G. (2004) Membrane proteome analysis of the green-sulfur bacterium *Chlorobium tepidum*. **Electrophoresis** **25**: 3468-3874.

Alba, F., Arenas JC, Lopez MA (1995) Properties of rat brain dipeptidyl aminopeptidases in the presence of detergents. **Peptides** **16**: 325-329.

Dreyfus, G., Celis H, Ramirez J (1984) Isolation of the mitochondrial F1-F0 adenosine triphosphatase by sepharose hexylammonium chromatography: Properties and reconstitution in liposomes. **Anal. Biochem.** **142**: 215-220.

Alessio, H. M.; Hagerman, A. E.; Fulkerson, B. K.; Ambrose, J.; Rice, R. E.; Wiley, R.L (2000). Generation of reactive oxygen species after exhaustive aerobic and isometric exercise. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, **32**: 1576-1581.

Antonenkov, V. D.; Rokka, A.; Sormunem, R. T.; Benz, R.; Hiltunen, J. K. (2005) Solute traffic across mammalian peroxisomal membrane – single-channel conductance monitoring reveals pore-forming activities in peroxisomes. **Cell Mol. Life Sci.** **62**: 2886-2895.

Attwood, D.; Florence, A .T. (1983) **Surfactant Systems-Their Chemistry, Pharmacy and Biology**, 2<sup>a</sup>. Ed, N.Y. London. Chapman and Hall.

Baharvand, H.; Fathi, A.; van Hoof, D.; Salekdeh, G. H. (2007) Concise review: Trends in stem cell proteomics. **Stem Cells** **25**: 1889-1903.

Berg, J.M.; Tymoczko, J.L.; Stryer, L. Biochemistry. 15<sup>o</sup> ed. New York, Freeman, 2002.

Berger, B. W.; Garcia, R. Y.; Lenhoff, A. M.; Kaler, E. W.; Robinson, C. R. (2005) Relating Surfactant Properties to activity and solubilization of the Human Adenosine A<sub>3</sub> Receptor. **Biophysical J.** **89**: 452-464.

Betts, J.; Lightowers, R. N.; Turnbull, D. M. (2004) Neuropathological aspects of mitochondrial DNA disease. **Neurochem. Res.** **29**: 505-511.

Betts, J.; Jaros, E.; Perry, R. H, et al (2006) Molecular neuropathology of MELAS: level of heteroplasmy in individual neurones and evidence of extensive vascular involvement. **Neuropathol. Appl. Neurobiol.** **32**: 359-373.

Bhairi, S. M. (2001) **Detergents – A Guide to the Properties and Uses of Detergents in Biological Systems.** Calbiochem-Novabiochem Corporation. La Jolla.

Bhairi, S. M.; Mohan, C. (2007) **Detergents – A Guide to the Properties and Uses of Detergents in Biological Systems.** Calbiochem-Novabiochem Corporation. La Jolla.

Bjellqvist, B., Ek, K., Righetti, P. G., Gianazza, E., Görg, A., Westermeier, R., and Postel, W. (1982) Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: Principle, methodology and some applications **J. Biochem. Biophys. Meth.** **6**, 317-339.

Blum, H., Beier, H.; Gross, H. J. (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrilamide gels. **Electrophoresis** **8**: 93-95.

Braun, R. J.; Kinkl, N.; Beer, M. (2007) Two-dimensional electrophoresis of membrane proteins. **Anal. Bioanal. Chem.** **389**: 1033-1045.

Brenner, C.; Jan, G.; Chevalier, Y.; Wroblewski, H. (1995) Evaluation of the efficacy of zwitterionic dodecyl carboxybetaine surfactants for the extraction and the separation of mycoplasma membrane protein antigens. **Anal. Biochem.** **224**:515-523.

Brown, G. K.; Squier, M. V. (1996) Neuropathology and pathogenesis of mitochondrial diseases. **J. Inherit. Metab. Dis.** **19**: 553-572.

Bruschi, M.; Seppi, C.; Arena, S.; Musante, L.; Santucci, L.; Balduini, C.; Scaloni, A.; Lanciotti, M.; Righetti, P. G.; Candiano, G. (2005) Proteomic Analysis of Erythrocytes Membranes by Soft Immobiline Gels Combined with Differential Protein Extraction. **J. Proteome Res.** **4**: 1304-1309.

Bumgarner, G. W.; Zampell, J. C.; Nagarajan, S.; Poloso, N. J.; Dorn, A. S.; D'Souza, M. J.; Selvaraj, P. (2005) Modified cell ELISA to determine the solubilization of cell surface proteins: Applications in GPI-anchored protein purification. **J. Biochem Biophys Meth.** **64**: 99-109.

Carelli, V.; La Morgia, C.; Iommarini, L.; Carroccia, R.; Mattiazzi, M.; Sangiorgi, S.; Farne, S.; Maresca, A.; Foscari, B.; Lanzi, L.; Amadori, M.; Bellan, M.; Valentino, M. L. (2007) Mitochondrial optic neuropathies: how two genomes may kill the same cell type? **Biosci Rep.** **27**: 173-184.

Chevallet, M.; Sabtoni, V.; Poinas, A.; Rouquié, D; Fuchs, A.; Kieffer, S.; Rossignol, M.; Lunardi, J.; Garin, J.; Rabilloud, T. (1998) New zwitterionic detergents improve the analysis of membrane proteins by two-dimensional electrophoresis. **Electrophoresis** **19**: 1901-1909.

Clark, J. M.; Marks, M. P.; Adalsteinsson, E, et al (1996) MELAS: Clinical and pathologic correlations with MRI, xenon/CT, and MR spectroscopy. **Neurobiology** **46**: 223-227.

Cooper, J.M.; Mann, V. M.; Krige, D.; Schapira, A. H. V. (1992) Human mitochondrial complex I dysfunction. **Biochim. Biophys. Acta**, **1101**:198-203.

Cornelius, F.; Skou, J.C.(1984) Reconstitution of sodium-potassium ATPase into phospholipids vesicles with full recovery of its specific activity. **Biochim. Biophys. Acta** **772**: 357-373.

Coster, R. V.; Smet, J.; George, E.; Meirleir, D.L.; Seneca, S.; Hove, J. V.; Sebire, G.; Verhelst, H.; Bleecker, J. D.; Vlem, B. V.; Verloo, P.; Leroy, J. (2001) Blue Native Polyacrilamide Gel Electrophoresis: A Powerful Tool in Diagnosis of Oxidative Phosphorylation Defects. **Pediatric Res.** **50**: 658-665.

Cramer, W. A.; Knaff, D. B. **Energy Transduction in Biological Membranes: A textbook of Bioenergetics.** 1<sup>a</sup> ed. New York: Spring-Verlag. 1991. 579p.

Cullis, P. R; Hope, M. J. Physical properties and functional roles of lipids in membranes, in: **Biochemistry of lipids and membrane.** California-Menlo Park. Dennis E. Vance and Jean F. Vance eds. 1985, 25-72.

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

Davies, J.A.; Packer, L.; Brooks, G.A. (1981) Biochemical adaptation of mitochondria, muscle, and whole-animal respiration to endurance training. **Arch. Biochem. Biophys.** **209**: 539-554.

Dencher. N.; Heyn, M. P. (1978) Solubilization of purple membrane by the nonionic detergents TRITON X-100 and octyl-beta-D-glucoside. **Dev. Halophilic Microorg.** **1**: 233-238.

De Planque, M. R.; Killian, J. A. (2003) Protein-lipid interactions studied with designed transmembrane peptide: Role of hydrophobic matching and interfacial anchoring. **Mol. Membr. Biol.** **20(4)**: 271-284.

Detmer, S. A.; Chan, D. C. (2007) Functions and Dysfunctions of mitochondrial dynamics. **Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.** **8**: 870-879.

DiMauro, S.; Schon, E. (2003) Mitochondrial respiratory-chain diseases. **N. Engl. J. Med.** **348**: 2656-2668.

Dodge J.T.; Hanahan D.J.; Mitchell C. (1963) Preparation and chemical characteristics of Hemoglobin-Free Ghosts of Human Erythrocytes. **Arch Biochim Biophys** **100**:119–130.

Domingues, C. C. (2004) **Avaliação da Solubilização de membranas eritrocitárias e suas proteínas por novos surfatantes zwitteriônicos**. Tese de Mestrado, Instituto de Biologia, UNICAMP, Campinas.

Domingues, C. C.; Cunha, E. S.; Winck, F. W.; Malheiros, S. V. P.; de Paula, E. (2007) Avaliação de Detergentes na Solubilização de Proteínas de Membrana Eritrocitária Humana em Eletroforese Bidimensional. **Revista de Ciências Biológicas e Saúde – grupo Anhanguera Educacional, II (2):** 38-46.

Douette, P., Navet, R., Gerkens, P., Pauw, E., Leprince, P., Sluse-Goffart, C., Sluse, F. E. (2005) Steatosis-Induced Proteomic Changes in Liver Mitochondria Evidenced by Two-Dimensional Differential In-Gel Electrophoresis. **J. Prot. Res. 4:** 2024-2031.

Dreyfus, G.; Célis, E.; Ramírez, J. (1984) Isolation of the mitochondrial F1-F0 adenosine triphosphatase by sepharose hexylammonium chromatography: Properties and reconstitution in liposomes. **Anal. Biochem. 142:** 215-220.

Duchen, M. R. (2004) Mitochondria in health and disease: perspectives on a new mitochondrial biology. **Mol. Asp. Med. 25:** 365-451.

Ericsson, C.; Franzén, Bo.; Nistér, M. (2006) Frozen Tissue Biobanks. Tissue handling, cryopreservation, extraction, and use for proteomic analysis. **Acta Oncol. 45:** 643-661.

Eubel, H.; Heinemeyer, J.; Sunderhaus, S.; Braun, H. P. (2004) Respiratory chain supercomplexes in plant mitochondria. **Plant Physiol. Biochem. 42:** 937-942.

Filosto, M.; Tomelleri, G.; Tonin, P.; Scarpelli, M.; Vattemi, G.; Rizzuto, N.; Padovani, A.; Simonati, A. (2007) Neuropathology of mitochondrial diseases. **Biosci Rep. 27:** 23-30.

Frey, T. G.; Manella, C. A. (2000) The internal structure of mitochondria. **Trends. Biochem. Sci. 25:** 319-324.

Fricke, B. (2000) Quantitative determination of Zwitterionic detergents using salt-induced phase separation of Triton X-100. **Anal. Biochem. 281:** 144-150.

Galembeck, E.; Alonso, A. & Meirelles, N. C. (1998). Effects of polyoxyethylene chain length on erythrocyte hemolysis induced by poly[oxyethylene (n) nonyphenol] non-ionic surfactants. *Chem. Biol. Inter.* 113:91-103.

Griffin, W. C. (1949) Classification of surface-active agents by HLB. **J. Soc. Cosmet. Chem. 1:** 311-319.

Goto, Y.; Horai, S.; Matsuoka, T, et al (1992) Mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes (MELAS): a correlative study of the clinical features and mitochondrial DNA mutation. **Neurology 42:** 545-550. Griffin, W.

C. (1949) Classification of surface-active agents by HLB. **J. Soc. Cosmet. Chem.** **1**:311-319.

Hägerhäll, C. (1997) Succinate: quinine oxidoreductases variations on a conserved theme. **Biochim. Biophys. Acta.** **1320**: 107-141.

Haworth, R. H.; Hunter, O. R. (1980) Allosteric inhibition of the  $\text{Ca}^{+2}$ -activated hydrophilic channel of the mitochondrial inner membrane by nucleotides. **J. Memb. Biol.** **54**:231-236.

Haynes, P. A.; Yates, J. R. (2000) Proteome profiling-pitfalls and progress. **Yeast** **17**:81-87.

Heerklotz, H.; Seelig, J. (2000a) Correlation of membrane/water partition coefficients of detergents with the critical micelle concentration. **Biophys. J.** **78**: 2435-2440.

Helenius, A.; Simons, K. (1975) Solubilization of membranes by detergents. **Biochim. Biophys. Acta** **415**: 29-79.

Henningsen, R.; Gale, B.L.; Straub, K.M., DeNagel, D.C. (2002) Application of zwitterionic detergents to the solubilization of integral membrane proteins for two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. **Proteomics** **2**: 1479-1488.

Herbert, B. (1999) Advances in protein solubilization for two-dimensional electrophoresis. **Electrophoresis** **20**: 660-663.

Hill, B. C.; Horowitz, P. M.; Robinson, N. C. (1986) Detection, characterization, and quenching of the intrinsic fluorescence of bovine heart cytochrome c oxidase. **Biochemistry** **25**: 2287-2292.

Houssin, C.; Le Maire, M.; Aggerbeck, L. P.; Shechter, E. (1985) The lactose permease of *Escherichia coli*: Evidence in favor of a dimmer. **Arch. Biochem. Biophys.** **240**: 593- 606.

Kashino, Y. (2003) Separation methods in the analysis of protein membrane complexes. **J. Chrom. B.** **797**: 191-216.

Kaufmann, S. H. Earnshaw, W. C (2000). Induction of apoptosis by cancer chemotherapy . **Exp.Cell. Res** **256**: 42-49.

Konishi, H.; Maeshima, M.; Komatsu, S. (2005) Characterization of vacuolar membrane proteins changed in rice root treated with Gibberellin. **J. Proteome Res.** **4**: 1775-1780.

Kragh-Hansen, U.; le Maire, M.; Noël, J.P.; Gulik-Krzywicki, T.; Moller, J. V. (1993). Transitional steps in the solubilization of protein-containing membranes and liposomes by nonionic detergent. *Biochemistry* 32: 1648-1656.

Kragh-Hansen, U.; le Maire, M.; Moller, J. V. (1998) The mechanism of detergent solubilization of liposomes and protein-containing membranes. **Biophys. J.** 75: 2932-2946.

Kuryatov, A.; Luo, J.; Cooper, J.; Lindstrom, J. (2005) Nicotine acts as a pharmacological chaperone to up-regulate human  $\alpha 4\beta 2$  acetylcholine receptors. **Mol. Pharmacol.** 68: 1839-1851.

Janssen, R. J.; Nijtmans, L. G. (2006) Mitochondrial complex I: Structure, function and pathology. **J. Inherit. Metab. Dis.** 29: 499-515.

Jiang, X.; Wang, X. (2004) Cytochrome C-mediated apoptosis. **Annu. Rev. Biochem.** 73: 87-106.

Jones, M. N. (1999) Surfactants in membrane solubilisation **Int. J. Pharm.** 177:137-159.

Lasch, J. (1995) Interaction of detergents with lipid vesicles. **Biochim. Biophys. Acta** 1241:269-292.

Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature** 227: 680-685.

Lee, A. G. (2003) Lipid-protein interactions in biological membranes: A structure perspective. **Biochim. Biophys Acta** 1612: 1-40.

Lee, S.; Lee, D.; Son, W.; Joo, W.; Kim, C. (2005) Proteomic characterization of Rat Liver Exposed to 2,3,7,8-Tetrachlorobenzo-*p*-dioxin. **J. Proteome Res.**4: 335-343.

Le Maire, M.; Champeil, P.; Moller, J. V. (2000) Interaction of membrane proteins and lipids with solubilizing detergents. *Biochim. Biophys. Acta* 1508: 86-111.

Lichtenberg, D. (1985) Characterization of the solubilization of lipid bilayers by surfactants. **Biochim. Biophys. Acta** 821:470-478.

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.

Lizotte, E.; Tremblay, A.; Allen, B. G.; Fiset, C. (2005) Isolation and characterization of subcellular protein fractions from mouse heart. **Anal. Biochem.** 345: 47-54.

Logan, D. C. (2006) The mitochondrial compartment. **J. Exp. Bot.** **57**: 1225-1246.

Low, T. Y.; Seow, T. K.; Chung, M. C. M. (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**: 1229-1239.

Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farrah, S.; Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.** **193**: 265-275.

Luft, R. (1995) The development of mitochondrial medicine. **Biochim. Biophys. Acta**, **1271**:1-6.

Martins, D.; Winck, F.V; Oliveira, B.M.; Horiuchi, R.S.O; Domingues, C.C.; de Paula, E.; Marangoni, S.; Dias-Neto, E.; Novello, J.C. The use of ASB Detergents in Combination with CHAPS is the best for solubilization of Human Brain Proteins for Two-Dimensional Gel Electrophoresis. **Brief. Funct. Gen. Proteomics** **6**:70-75, doi:10.1093/bfgp/elm009, 2007.

Mattsson, J. P.; Schlesinger, P. H.; Keeling, D. J.; Teitelbaum, S. L.; Stone, D. K.; Xie, X. S. (1994) Isolation and reconstitution of a vacuolar-type proton pump of osteoclast membrane. **J. Biol. Chem.** **269**: 24979-24982.

McEnery, M. W.; Buhle, E. L; Aebi, Jr. E. L.; Pedersen, P. L. (1984) Proton ATPase of Rat liver mitochondria: Preparation and visualization of a functional complex using the novel zwitterionic detergent 3-(3-cholamidopropyl)dimethyl-ammonio-1-propane-sulfonate. **J.Biol.Chem.** **259**: 4642-4651.

McIntosh, D. B.; Ross, D. C. (1985) Role of phospholipids and protein-protein association in activation and stabilization of soluble calcium-ATPase of sarcoplasmic reticulum. **Biochemistry** **24**: 1244-1251.

Minuth, T.; Thommes, J.; Kula, M. R. (1995) Extraction of cholesterol oxidase from nocardia-rhodochrous using a nonionic surfactant-based aqueous 2-phase system. **J. Biotechnol.** **38**:151-164.

Mizuno, Y.; Ikebe, S., Hattori, N., Nakagawa-Hatori, Y.; Mochizuki, H.; Tanaka, M.; Ozawa, T. (1995) Role of mitochondria in the etiology and pathogenesis of Parkinson's disease. **Biochim. Biophys. Acta**, **1271**:265-274.

Molloy, M. (2000) Two-Dimensional Electrophoresis of Membrane Proteins using Immobilized pH Gradients. **Anal. Biochemistry** **280**:1-10.

Molloy, M.P.; Herbert, B.R.; Williams, K.L.; Gooley, A. A. (1999) Extraction of Escherichia coli proteins with organic solvents prior to two-dimensional electrophoresis. **Electrophoresis** **20**:701-704.

Molnar, A. M.; Alves, A. A.; Pereira-da-Silva, L.; Macedo, D. V.; Dabbeni-Sala, F. (2004) Evaluation by blue native polyacrylamide electrophoresis colorimetric staining of the effects of physical exercise on the activities of mitochondrial complexes in rat muscle. **Braz. J. Med. Biol. Res.** **37**: 939-947.

Morandat, S., Bortolato, M., Roux, B. (2002) Cholesterol-dependent insertion of glycosylphosphatidylinositol-anchored enzyme. **Biochim. Biophys. Acta** **1564**: 473-478.

Moynes, C. D.; Hood, D. A. (2003) Origins and consequences of mitochondrial variation in vertebrate muscle. **Annual Rev. Physiol.** **65**:177-201.

Nandakumar, R.; Nandakumar, M. P.; Marten, M. R.; Ross, J. M. (2005) Proteome analysis of membrane and cell wall associated proteins from *Staphylococcus aureus*. **J. Proteome Res.** **4**: 250-257.

Neugebauer, J. (1994) **A Guide to the Properties and Uses of Detergents in Biology and Biochemistry**. Calbiochem-Novabiochem Int., La Jolla.

Nijtmans, L. G. J.; Henderson, N. S.; Holt, I, J. (2002) Blue Native electrophoresis to study mitochondrial and other protein complexes. **Methods** **26**: 327-334.

Nyholm, T. K.; Ozdirekcan, S.; Killian, J. A. (2007) How protein transmembrane segments sense the lipid environment. **Biochemistry** **46(6)**: 1457-1465.

O'Farrel, P. H (1975) High-resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. **J. Biol.Chem.** **250**: 4007-4021.

Olivieri, E.; Herbert, B.; Righetti, P. G. (2001) The effect of protease inhibitors on the two-dimensional electrophoresis pattern of red blood cell membranes. **Electrophoresis** **22**: 560-565.

Parsons, D. F.; Williams, G. R.; Chance, B. (1966) Characteristics of isolated and purified of the outer and inner membranes of mitochondria. **Ann. New York Acad. Sci.** 643-666.

Pávková, I.; Hubálek, M.; Zechovská, J.; Lenco, J.; Stulík, J. (2005) Francisella tularensis live vaccine strain: proteomic analysis of membrane proteins enriched fraction. **Proteomics** **5** (9): 2460-7.

Peterson, P. L (1995) The treatment of mitochondrial myopathies and encephalomyopathies. **Biochim. Biophys. Acta.** **1271**: 275-280.

Pieczenik, S. R.; Neustadt, J. (2007) Mitochondrial dysfunction and molecular pathways of disease. **Exp. Mol. Pathol.** **83**: 84-92.

Pomorski, T.; Hrafnsdóttir, S./ Devaux, P. F./ van Meer, G. (2001) Lipid distribution and transport across cellular membranes. **Semin. Cell. Dev. Biol.** **12 (2)**: 139-148.

Prasad, R. Manual on Membrane Lipids. New York: Springer, 1996.

Preté, P. S. C.; Malheiros, S. V. P.; 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. C.; Gomes, K.; Malheiros, S. V. P.; 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.

Privé, G. G. (2007) Detergents for the stabilization and crystallization of membrane proteins. **Methods** **41**: 388-397.

PDB. **Protein Data Bank.** Disponível em: [http://blanco.biomol.uci.edu/Membrane\\_Proteins\\_xtal.html](http://blanco.biomol.uci.edu/Membrane_Proteins_xtal.html), acessado em 15/04/2008.

Rabilloud, T.; Blisnick, T.; Heller, M.; Luche, S.; Aebersold, R.; Lunardi, J.; Braun-Breton, C. (1999) Analysis of membrane proteins by two-dimensional electrophoresis: Comparison of the proteins extracted from normal or Plasmodium falciparum – infected erythrocyte “ghosts”. **Electrophoresis** **20**: 3603-3610.

Richard, E., Monteoliva, L., Juarez, S., Pérez, B., Desviat, L. R., Ugarte, M., Albar, J. P. (2005) Quantitative Analysis of Mitochondrial Protein Expression in Methylmalonic Acidemia by Two-Dimensional Difference Gel Electrophoresis. **J. Prot. Res.** **5**: 1602-1610.

Rivero, J. L.; Talmadge, R. J.; Edgerton, V. R. (1999) Interrelationships of myofibrillar ATPase activity and metabolic properties of myosin heavy chain-based. [\*\*Histochem Cell Biol.\*\*](#) 111:277-87.

Robinson, N. C.; Neumann, J.; Wiginton, D. (1985) Influence of detergent polar and apolar structure upon the temperature dependence of beet heart cytochrome c oxidase activity. **Biochemistry** **24**: 6298-6304.

Rohm & Haas (1986) **Surfactants, Microbiocides and Dispersants: Handbook of Physical Properties.** Rohm & Haas Co., Philadelphia, PA.

Rosevear, R., *et al.* (1980) Alkyl glycoside detergents: A simpler synthesis and their effects on kinetic and physical properties of cytochrome c oxidase. **Biochemistry** **19**: 4108-4115.

Ruiz-Romero, C.; López-Armada, M. J.; Blanco, F. J. (2006) Mitochondrial proteomic characterization of human normal articular chondrocytes. **Osteoarth. Cartilage** **14**: 507-518.

Sabar, M.; Balk, J.; Leaver, C. J. (2005) Histochemical staining and quantification of plant mitochondrial respiratory chain complexes using blue-native polyacrylamide gel electrophoresis. **Plant J.** **44**: 893-901.

Santos, H. L.; Lamas, R. P.; Ciancaglini, P. (2002) Solubilization of Na, K-ATPase from rabbit kidney outer medulla using only C<sub>12</sub>E<sub>8</sub>. **Braz J Med Biol Res.** **35**: 277-88.

Saraste, M. (1999) Oxidative phosphorylation at the *fin de siècle*. **Science**, **283**:1488-1493.

Sas, K.; Robotka, H.; Toldi, J.; Vécsei, L. (2007) Mitochondria, metabolic disturbances, oxidative stress and the kynurenine system, with focus on neurodegenerative disorders. **J. Neurol Sci.** **257**: 221-239.

Schägger, H.; Cramer, W. A.; von Jagow, G. (1994) Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by Blue Native Electrophoresis and Isolation of membrane protein complexes by Two-Dimensional Native Electrophoresis. **Anal. Biochem.** **217**: 220-230.

Schägger, H.; von Jagow, G. (1991) Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. **Anal. Biochem.** **199**: 223-231.

Schägger, H. (1995) Quantification of oxidative phosphorylation enzymes after blue native electrophoresis and two-dimensional resolution: Normal complex I protein amounts in Parkinson's disease conflict with reduced catalytic activities. **Electrophoresis** **16**:763-770.

Schägger, H.; Pfeiffer, K. (2001) The ratio of oxidative phosphorylation complexes I-V on bovine heart mitochondria and the composition of respiratory chain supercomplexes. **J. Biol. Chem.** **276**:37861-37867.

Schapira, A. H. (2002) Primary and secondary defects of the mitochondrial respiratory chain. **J. Inherit. Metab. Dis.** **25**:207-214.

Schapira, A. H. (2007) Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. **Cell Death Differ.** **14 (7)**: 1261-1266.

Schluesener, D.; Fischer, F.; Kruij, J.; Rögner, M.; Poetsch, A. (2005) Mapping the membrane proteome of *Corynebacterium glutamicum*. **Proteomics** **5**:1317-1330.

Schulenberg, B.; Patton, W. F. (2004) Combining microscale solution-phase isoelectric focusing with Multiplexed Proteomic® dye staining to analyze protein post-translational modifications. **Electrophoresis** **25**: 2539-2544.

Seddon, A. M.; Curnow, P.; Booth, P. J. (2004) Membrane proteins, lipids and detergents: not just a soap opera. **Biochim. Biophys. Acta** **1666**: 105-117.

Sickmann, A., Reinders, J., Wagner, Y., Joppich, C., Zahedi, R., Meyer, H. E., Schonfisch, B., Perschil, I., Chacinska, A., Guiard, B., Rehling, P., Pfanner, N., Meisinger, C. (2003) The proteome of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. **PNAS** **100** (23): 13207-13212.

Singer, S. J.; Nicolson, G. L. (1972) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. **Science** **175**:20-731.

Speers, A. E.; Wu, C. C (2007) Proteomics of integral membrane proteins – theory and application. **Chem. Rev.** **107** (8): 3687-3714.

Stickney, J. T.; Bacon, W. C.; Rojas, M.; Ratner, N. (2004) Activation of the tumor suppressor Merlin modulates its interaction with lipid rafts. **Cancer Res.** **64** (8): 2717-24.

Stubbs, G. W.; Smith, H. G. Jr.; Litman, B. J. (1976) Alkyl glucosides as effective solubilizing agents for bovine rhodopsin: A comparison with several commonly used detergents. **Biochim. Biophys. Acta** **426**:46-56.

Su, C.; Wanf, F.; Ciolek, D.; Pan, Yu-Ching. E.; (1994) Electrophoresis of proteins and protein-protein complexes in native polyacrylamide gels using a horizontal gel apparatus. **Anal. Biochem.** **223**: 93-98.

Tanford, C. (1980) **The hydrophobic effect: formation of micelles & biological membranes**, 2<sup>a</sup> ed., John Wiley & Sons, New York.

Tanji, K.; Kunimatsu, T.; Vu, T. H, et al (2001) Neuropathological features of mitochondrial disorders. **Semin. Cell. Dev. Biol.** **12**: 429-439.

Tiruppathi, C.; Alpers, D. H.; Seetharam, B. (1986) Phase separation of rat intestinal brush border membrane proteins using Triton X-114. **Anal. Biochem.** **153**:330-335.

Triscott, M. X.; Van de Rijn, I. (1986) Solubilization of hyaluronic acid synthetic activity from streptococci and its activation with phospholipids. **J. Biol. Chem.** **261**: 6004-6009.

Twine, S. M.; Mykytczuk, N. C.; Petit, M.; Tremblay, T. L.; Conlan, J. W.; Kelly, J. F. (2005) *Francisella tularensis* proteome: low levels of ASB-14 facilitate the visualization of membrane proteins in total protein extracts. **J Proteome Res.** **4** (5): 1848-1854.

Vercesi, A. E. (1998) Mitocôndria: da produção de ATP e calor à regulação da morte celular. **Ciência Hoje** **34**: 16-23.

Vesela, K.; Hansikova, H.; Tesarova, M.; Martasek, P.; Elleder, M.; Houstek, J.; Zeman, J. (2004) Clinical, biochemical and molecular analyses of six patients with

isolated cytochrome C oxidase deficiency due to mutations in the SCO2 gene. **Acta Paediatr.** **93**:1312-1317.

Wallace, A. V.; Kuhn, N. J. (1986) Incorporation into phospholipids vesicles of pore-like properties from Golgi membranes of lactating rat mammary gland. **Biochem. J.** **236**: 91-96.

Wallace, D. C. (1999) Mitochondrial Diseases in Man and Mouse. **Sci.** **283**:1482-1488.

Wallace, D. C. (2007) Why do we still have a maternally inherited mitochondrial DNA? Insights from evolutionary medicine. **Annu. Rev. Biochem.** **76**: 781-821.

**Wang, F.; Pan, Yu-Ching. E.; (1991)** Structural analyses of proteins electroblotted from native polyacrylamide gels onto polyvinylidene difluoride membranes. A method for determining the stoichiometry of protein-protein interaction in solution. **Anal. Biochem.** **198**: 285-291.

Wang, X (2001) The expanding role of mitochondria in apoptosis. **Genes Dev.** **15**: 2922-2933.

Warren, R.C. (1987) **Physics and architecture of cell membranes**, Adam-Hilger, Bristol and Philadelphia, cap. 1 e 2.

Weber, J. (2007) ATP synthase – the structure of the stator stalk. **Trends Biochem. Sci.** **32**: 53-56.

Wittig, I.; Schägger, H. (2005) Advantages and limitations of clear-native PAGE. **Proteomics** **4**:4338-4346.

Wüstner, D.; Pomorski, T.; Herrmann, A.; Müller, P. (1998) Release of phospholipids from erythrocyte membranes by taurocholate is determined by their transbilayer orientation and hydrophobic backbone. *Biochemistry* **37**: 17093-17103.

Yu, F.; McCarty, R. E. (1985) Detergent activation of the ATPase activity of chloroplast coupling factor 1. **Arch. Biochem. Biophys.** **238**: 61-68.

Zerbetto, E.; Vergani, L.; Dabbeni-Sala, F. (1997) Quantification of muscle mitochondrial oxidative phosphorylation enzymes via histochemical staining of blue native polyacrylamide gels. **Electrophoresis** **18**: 2059-2064.

Zhang, L.; Xie, J.; Wang, X.; Liu, X.; Tang, X.; Cao, R.; Hu, W.; Nie, S.; Fan, C.; Liang, S. (2005) Proteomic analysis of mouse liver plasma membrane: Use of differential extraction to enrich hydrophobic membrane proteins. **Proteomics** **5**: 4510-4524.

Zhou, M.; Veenstra, T. D. (2007) Proteomic Analysis of protein complexes. **Proteomics** **7** 2688-2697.

Zhu, Y. S.; Saito, T.; Asada, A.; Maekawa, S.; Hisanaga, S. (2005) Activation of latent cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5)-p35 complexes by membrane dissociation. **J. Neurochem.** **94**: 1535-45.

Zuobi-Hasona, K.; Crowley, P. J.; Hasona, A.; Bleiweis, A. S.; Brady, L. J. (2005) Solubilization of cellular membrane protein from *Streptococcus mutans* for two-dimensional gel electrophoresis. **Electrophoresis** **26**: 1200-1205.

## VII – ANEXOS

**Tabela 16** – Valores aproximados de pI e peso molecular dos “spots” presentes no gel realizada com proteínas de membrana mitocondrial interna de rato, previamente solubilizadas com 43,2 mM de Dodecil maltosídeo.

nº spot	pI	MM (kDa)	nº spot	pI	MM (kDa)	nº spot	pI	MM (kDa)
1	4,55	101	47	4,21	22	92	5,45	18
2	4,54	93	48	4,10	22	93	5,53	18
3	4,78	93	49	4,00	22	94	5,05	18
4	4,29	92	50	3,88	22	95	4,99	18
5	4,08	91	51	3,78	22	96	3,90	17
6	3,90	89	52	4,39	21	97	4,89	18
7	3,93	80	53	4,39	20	98	4,84	17
8	3,50	79	54	5,44	20	99	3,82	17
9	3,36	78	55	5,13	20	100	4,73	17
10	4,48	76	56	5,18	20	101	4,51	17
11	4,77	76	57	5,24	20	102	4,63	17
12	4,34	75	58	5,04	20	103	4,38	17
13	4,47	68	59	4,96	20	104	3,68	17
14	4,62	68	60	4,83	20	105	4,23	17
15	4,81	69	61	4,88	20	106	4,12	17
16	4,33	67	62	4,73	20	107	4,02	17
17	4,22	67	63	4,01	20	108	3,90	17
18	4,06	66	64	4,50	20	109	3,80	17
19	4,45	63	65	4,38	20	110	5,47	16
20	4,23	62	66	4,23	19	111	5,15	16
21	4,33	62	67	4,12	19	112	5,26	16
22	4,61	59	68	4,02	19	113	5,20	16
23	4,85	32	69	5,45	19	114	5,33	16
24	4,79	31	70	5,14	19	115	5,60	16
25	4,70	31	71	5,18	19	116	5,07	16
26	4,34	31	72	5,25	19	117	4,85	16
27	5,13	24	73	5,38	19	118	4,90	16
28	5,44	23	74	5,59	19	119	4,99	16
29	5,22	24	75	5,53	19	120	4,74	16
30	5,31	23	76	5,05	18	121	4,41	16
31	5,58	23	77	4,96	18	122	4,52	16
32	5,66	23	78	4,74	18	123	4,63	16
33	5,75	24	79	4,84	18	124	4,25	16
34	5,91	24	80	4,89	18	125	4,15	16
35	6,08	24	81	4,39	18	126	4,88	15
36	5,04	23	82	4,52	18	127	3,53	15
37	5,36	23	83	4,62	18	128	4,96	15
38	5,84	24	84	4,24	18	129	4,78	15
39	4,96	23	85	4,12	18	130	4,46	15
40	4,82	23	86	5,26	18	131	4,38	14
41	4,88	23	87	5,60	18	132	4,27	14
42	4,34	23	88	4,01	18	133	4,16	14
43	4,72	23	89	5,15	18	134	1,00	17
44	5,17	23	90	5,20	18	135	5,45	18
45	4,50	23	91	5,33	18	136	5,53	18
46	4,60	23						

**Tabela 17** – Valores aproximados de pI e peso molecular dos “spots” presentes no gel de proteínas de membrana mitocondrial interna de rato, previamente solubilizadas com 43,2 mM de Dodecil maltosídeo e com 65 mM de CHAPS no tampão de focalização.

Nº spot	pI	MM (kDa)	nº spot	pI	MM (kDa)	nº spot	pI	MM (kDa)
1	5,26	100	62	4,79	32	123	3,81	23
2	3,84	95	63	8,56	32	124	5,28	22
3	6,95	95	64	4,62	32	125	8,24	22
4	3,56	94	65	8,69	32	126	5,38	22
5	8,78	93	66	8,79	32	127	3,62	22
6	8,88	91	67	5,34	32	128	3,84	22
7	3,83	91	68	3,51	31	129	3,70	22
8	8,64	91	69	3,84	31	130	7,85	22
9	8,36	91	70	5,08	31	131	3,39	22
10	8,91	86	71	5,78	30	132	5,12	21
11	9,11	86	72	9,04	30	133	5,50	21
12	8,72	86	73	6,19	29	134	4,82	21
13	9,36	81	74	5,10	28	135	4,94	21
14	3,81	78	75	4,77	28	136	5,19	21
15	9,43	78	76	5,57	29	137	4,63	21
16	3,59	78	77	9,05	29	138	5,00	21
17	3,45	77	78	4,92	28	139	3,92	21
18	9,28	76	79	5,49	28	140	5,26	21
19	8,70	74	80	3,84	28	141	5,69	21
20	8,83	74	81	4,53	28	142	8,59	21
21	8,95	74	82	4,22	28	143	8,48	20
22	6,36	74	83	3,91	28	144	8,67	21
23	8,69	68	84	3,53	28	145	6,52	21
24	8,83	69	85	3,65	27	146	8,38	20
25	8,95	68	86	3,50	27	147	8,29	20
26	8,49	69	87	9,05	27	148	8,57	20
27	6,29	62	88	3,37	27	149	8,73	20
28	8,71	61	89	6,74	27	150	6,20	20
29	8,83	61	90	7,08	26	151	6,54	20
30	8,94	60	91	5,89	26	152	8,80	20
31	1,00	60	92	5,14	25	153	6,94	20
32	9,10	59	93	5,25	25	154	4,23	19
33	1,00	57	94	5,59	25	155	4,96	19
34	1,00	54	95	4,82	25	156	5,12	19
35	4,66	54	96	3,92	24	157	8,81	18
36	6,27	50	97	4,92	25	158	4,75	18
37	6,10	46	98	5,04	25	159	4,94	18
38	8,81	45	99	6,96	25	160	6,52	18
39	3,97	45	100	3,76	24	161	7,75	18
40	6,18	43	101	4,10	24	162	7,92	18
41	4,59	42	102	3,48	24	163	8,10	18
42	6,75	41	103	4,95	24	164	5,06	18
43	5,08	40	104	5,77	24	165	4,86	18
44	5,42	40	105	3,38	24	166	8,99	18
45	4,88	40	106	4,74	24	167	5,29	18
46	4,01	39	107	5,12	24	168	7,08	17
47	4,59	39	108	8,38	24	169	5,02	17

<b>48</b>	5,55	38	<b>109</b>	5,28	24	<b>170</b>	5,13	17
<b>49</b>	4,84	37	<b>110</b>	5,20	24	<b>171</b>	6,49	16
<b>50</b>	4,67	37	<b>111</b>	5,56	23	<b>172</b>	6,65	16
<b>51</b>	3,51	37	<b>112</b>	7,60	23	<b>173</b>	7,87	16
<b>52</b>	4,55	37	<b>113</b>	5,36	23	<b>174</b>	6,80	16
<b>53</b>	5,05	37	<b>114</b>	5,66	23	<b>175</b>	7,15	16
<b>54</b>	4,37	36	<b>115</b>	5,83	23	<b>176</b>	7,30	16
<b>55</b>	3,85	36	<b>116</b>	8,36	23	<b>177</b>	4,71	15
<b>56</b>	3,56	35	<b>117</b>	8,50	23	<b>178</b>	4,78	15
<b>57</b>	3,46	35	<b>118</b>	6,74	23	<b>179</b>	4,63	15
<b>58</b>	5,69	34	<b>119</b>	8,60	23	<b>180</b>	4,86	15
<b>59</b>	5,38	33	<b>120</b>	5,02	23	<b>181</b>	4,96	15
<b>60</b>	6,29	33	<b>121</b>	6,16	23	<b>182</b>	4,51	15
<b>61</b>	5,25	33	<b>122</b>	4,19	23	<b>183</b>	1,02	9

**Tabela 18** – Valores aproximados de pI e peso molecular dos “spots” presentes no gel de proteínas de membrana mitocondrial interna de rato, previamente solubilizadas com 43,2 mM de ASB-14, e com 65mM de CHAPS no tampão de focalização.

Nº spot	pI	MM (kDa)	Nº spot	pI	MM (kDa)	nº spot	pI	MM (kDa)
<b>1</b>	3,35	4	<b>19</b>	9,99	50	<b>37</b>	9,59	67
<b>2</b>	3,09	11	<b>20</b>	3,74	50	<b>38</b>	8,76	72
<b>3</b>	9,85	14	<b>21</b>	4,24	51	<b>39</b>	7,94	75
<b>4</b>	1,05	14	<b>22</b>	7,95	51	<b>40</b>	9,17	75
<b>5</b>	1,01	14	<b>23</b>	3,41	51	<b>41</b>	6,42	78
<b>6</b>	1,00	14	<b>24</b>	1,01	53	<b>42</b>	7,05	78
<b>7</b>	9,73	18	<b>25</b>	4,67	55	<b>43</b>	8,84	80
<b>8</b>	9,99	19	<b>26</b>	4,35	56	<b>44</b>	7,97	81
<b>9</b>	1,04	20	<b>27</b>	4,15	57	<b>45</b>	8,93	83
<b>10</b>	3,99	22	<b>28</b>	5,71	57	<b>46</b>	8,84	83
<b>11</b>	1,05	22	<b>29</b>	5,24	58	<b>47</b>	9,80	93
<b>12</b>	1,00	23	<b>30</b>	8,98	58	<b>48</b>	6,53	93
<b>13</b>	4,57	23	<b>31</b>	9,13	58	<b>49</b>	8,90	94
<b>14</b>	9,65	25	<b>32</b>	9,17	61	<b>50</b>	9,10	94
<b>15</b>	1,00	25	<b>33</b>	8,95	62	<b>51</b>	8,98	94
<b>16</b>	1,02	25	<b>34</b>	9,16	63	<b>52</b>	6,71	96
<b>17</b>	1,00	27	<b>35</b>	4,98	63	<b>53</b>	6,71	99
<b>18</b>	8,81	47	<b>36</b>	9,17	66			

**Tabela 19** – Valores aproximados de pI e massa molecular dos “spots” presentes no gel preparado com proteínas de membrana mitocondrial interna de rato, previamente solubilizadas com 43,2 mM de ASB-16 e com 65 mM de CHAPS no tampão de focalização.

Nº spot	pI	MM (kDa)	Nº spot	pI	MM (kDa)	Nº spot	pI	MM (kDa)
1	7,27	103	70	4,73	63	138	8,83	45
2	7,40	103	71	5,15	63	139	5,28	44
3	6,55	103	72	9,07	63	140	8,50	44
4	6,22	95	73	4,61	63	141	8,59	44
5	6,90	91	74	4,92	63	142	8,36	44
6	6,71	91	75	5,52	63	143	8,25	44
7	7,11	91	76	8,51	62	144	7,31	44
8	5,52	91	77	8,71	62	145	8,57	42
9	7,58	90	78	8,42	62	146	9,59	41
10	7,72	90	79	8,18	61	147	9,45	40
11	7,23	86	80	5,92	61	148	9,27	40
12	7,74	86	81	6,32	61	149	9,06	40
13	7,85	86	82	6,43	61	150	9,13	40
14	5,44	81	83	6,60	61	151	8,93	40
15	5,50	81	84	7,25	61	152	8,84	39
16	5,58	81	85	7,65	62	153	8,69	39
17	9,18	81	86	6,11	61	154	8,51	39
18	9,01	81	87	6,85	61	155	8,39	39
19	8,77	80	88	6,95	61	156	7,05	38
20	8,86	80	89	5,14	61	157	7,68	39
21	6,45	80	90	8,77	59	158	8,28	39
22	6,57	80	91	7,61	58	159	5,90	38
23	5,95	80	92	8,95	59	160	6,11	38
24	6,87	79	93	6,45	57	161	6,45	38
25	7,24	79	94	6,55	58	162	6,56	39
26	7,70	79	95	5,96	58	163	6,95	38
27	7,19	76	96	5,89	58	164	6,80	38
28	6,49	76	97	8,77	58	165	7,21	38
29	6,73	75	98	6,52	56	166	7,33	38
30	7,32	74	99	7,34	56	167	8,10	39
31	6,56	74	100	8,50	56	168	6,63	38
32	6,97	74	101	5,92	56	169	9,12	38
33	7,21	74	102	6,28	56	170	8,93	37
34	3,48	74	103	6,35	56	171	8,84	37
35	3,55	74	104	7,19	56	172	8,46	37
36	3,62	74	105	7,85	56	173	7,62	36
37	7,47	73	106	8,43	56	174	6,81	36
38	4,74	72	107	6,71	55	175	7,16	36
39	4,26	73	108	6,63	54	176	7,35	36
40	4,33	73	109	9,95	54	177	7,98	36
41	4,43	73	110	9,78	53	178	6,56	36
42	7,01	71	111	9,45	53	179	6,47	36
43	8,29	71	112	9,71	53	180	5,04	34
44	9,53	70	113	9,21	52	181	7,45	33
45	9,31	70	114	8,87	51	182	4,88	33
46	6,50	70	115	6,60	50	183	6,86	33
47	9,10	70	116	6,36	50	184	7,52	31
48	8,78	69	117	7,21	50	185	4,59	30

49	4,98	69	118	7,31	51	186	4,84	30
50	5,10	68	119	7,65	50	187	5,01	30
51	5,18	69	120	8,23	50	188	7,24	29
52	5,90	68	121	8,41	51	189	9,31	28
53	6,00	68	122	5,91	50	190	4,42	23
54	6,13	68	123	6,11	51	191	4,06	21
55	6,49	68	124	7,78	51	192	4,31	21
56	8,38	68	125	8,65	51	193	4,05	20
57	8,51	68	126	6,90	50	194	4,26	20
58	6,66	68	127	7,96	50	195	3,70	19
59	6,91	68	128	6,97	50	196	6,45	18
60	7,26	68	129	6,48	50	197	7,30	18
61	7,74	68	130	4,17	50	198	3,72	17
62	7,94	68	131	6,80	49	199	3,80	17
63	8,31	68	132	7,41	49	200	3,76	16
64	8,20	68	133	5,07	48	201	4,33	15
65	10,05	66	134	5,22	48	202	5,50	15
66	9,92	65	135	7,93	48	203	6,36	15
67	9,56	64	136	7,42	48	204	7,33	22
68	6,68	64	137	9,22	45	205	7,20	20
69	4,31	64						

**Tabela 20**– Valores aproximados de pI e massa molecular dos “spots” presentes no gel preparado com proteínas de membrana mitocondrial interna de rato, previamente solubilizadas com 43,2 mM de CHAPS e 65mM desse mesmo surfatante no tampão de focalização.

Nº spot	pI	MM (kDa)	Nº spot	pI	MM (kDa)	Nº spot	pI	MM (kDa)
1	4,43	98	45	7,45	55	89	3,67	94
2	5,08	98	46	7,38	55	90	9,68	94
3	4,04	14	47	7,18	55	91	3,58	94
4	4,33	14	48	7,07	55	92	9,82	97
5	4,12	14	49	3,97	55	93	6,66	97
6	4,07	14	50	4,61	56	94	6,58	97
7	4,47	14	51	4,01	55	95	6,49	98
8	4,17	14	52	4,65	61	96	9,90	98
9	3,86	14	53	6,12	64	97	3,32	98
10	4,72	14	54	8,35	67	98	4,84	98
11	3,91	14	55	8,11	67	99	5,08	98
12	3,82	14	56	7,92	67	100	4,66	98
13	3,58	15	57	7,71	68	101	4,96	98
14	3,38	15	58	7,24	68	102	4,41	98
15	3,81	16	59	7,00	69	103	4,29	98
16	4,24	17	60	8,93	69	104	4,19	98
17	4,67	21	61	6,92	69	105	4,01	98
18	3,80	25	62	5,05	73	106	3,77	98
19	4,77	25	63	4,88	73	107	3,71	98
20	4,54	26	64	7,49	81	108	8,71	98
21	3,36	28	65	7,44	81	109	8,91	98
22	5,08	38	66	5,29	83	110	4,35	98
23	4,80	40	67	6,74	83	111	4,78	98
24	4,70	41	68	6,67	83	112	4,29	98
25	4,62	41	69	8,34	84	113	5,65	98
26	7,34	43	70	8,75	85	114	5,52	98
27	7,94	49	71	8,63	84	115	5,39	98

<b>28</b>	8,19	49	<b>72</b>	8,52	84	<b>116</b>	5,31	98
<b>29</b>	7,44	50	<b>73</b>	8,08	84	<b>117</b>	4,35	98
<b>30</b>	7,58	50	<b>74</b>	7,62	85	<b>118</b>	4,48	98
<b>31</b>	7,38	50	<b>75</b>	7,34	85	<b>119</b>	4,43	98
<b>32</b>	5,31	51	<b>76</b>	8,93	86	<b>120</b>	4,03	98
<b>33</b>	5,20	53	<b>77</b>	6,89	86	<b>121</b>	7,10	98
<b>34</b>	4,88	53	<b>78</b>	6,65	87	<b>122</b>	6,89	98
<b>35</b>	5,03	53	<b>79</b>	9,18	88	<b>123</b>	5,38	98
<b>36</b>	8,46	54	<b>80</b>	6,32	89	<b>124</b>	6,68	98
<b>37</b>	8,29	54	<b>81</b>	4,29	89	<b>125</b>	5,50	98
<b>38</b>	8,12	54	<b>82</b>	4,37	90	<b>126</b>	8,99	98
<b>39</b>	8,19	54	<b>83</b>	4,23	90	<b>127</b>	8,83	98
<b>40</b>	8,05	54	<b>84</b>	9,45	90	<b>128</b>	8,72	98
<b>41</b>	7,93	54	<b>85</b>	4,07	91	<b>129</b>	8,91	98
<b>42</b>	7,86	54	<b>86</b>	4,01	92	<b>130</b>	4,76	97
<b>43</b>	7,71	55	<b>87</b>	3,97	92	<b>131</b>	4,81	97
<b>44</b>	7,61	55	<b>88</b>	3,78	94			

**Tabela 21** – Valores aproximados de pI e massa molecular das proteínas dos “spots” presentes no gel preparado com membrana mitocondrial interna de rato, previamente solubilizada com 43,2 mM de Digitonina e com 65 mM de CHAPS no tampão de focalização.

Nº spot	pI	MM (kDa)	Nº spot	pI	MM (kDa)	Nº spot	pI	MM (kDa)
<b>1</b>	6,29	102	<b>22</b>	9,80	73	<b>43</b>	4,55	44
<b>2</b>	5,78	100	<b>23</b>	9,62	72	<b>44</b>	9,18	43
<b>3</b>	6,63	100	<b>24</b>	8,86	72	<b>45</b>	8,89	42
<b>4</b>	6,75	100	<b>25</b>	6,12	72	<b>46</b>	4,51	42
<b>5</b>	6,98	100	<b>26</b>	9,42	71	<b>47</b>	8,43	41
<b>6</b>	6,23	99	<b>27</b>	9,28	71	<b>48</b>	4,61	24
<b>7</b>	6,18	98	<b>28</b>	5,22	70	<b>49</b>	9,85	23
<b>8</b>	8,95	94	<b>29</b>	6,13	70	<b>50</b>	4,61	22
<b>9</b>	8,31	91	<b>30</b>	9,66	65	<b>51</b>	4,89	18
<b>10</b>	4,69	88	<b>31</b>	9,41	63	<b>52</b>	4,64	18
<b>11</b>	5,24	87	<b>32</b>	9,94	63	<b>53</b>	4,97	18
<b>12</b>	4,90	82	<b>33</b>	9,21	62	<b>54</b>	4,92	18
<b>13</b>	4,97	82	<b>34</b>	9,71	62	<b>55</b>	4,97	18
<b>14</b>	9,09	81	<b>35</b>	8,93	61	<b>56</b>	3,58	18
<b>15</b>	8,84	80	<b>36</b>	8,74	60	<b>57</b>	4,64	17
<b>16</b>	8,59	79	<b>37</b>	8,40	60	<b>58</b>	3,77	17
<b>17</b>	8,34	79	<b>38</b>	8,24	59	<b>59</b>	4,08	17
<b>18</b>	8,20	78	<b>39</b>	4,56	55	<b>60</b>	4,86	17
<b>19</b>	9,53	76	<b>40</b>	9,96	50	<b>61</b>	4,79	16
<b>20</b>	3,38	75	<b>41</b>	9,72	48	<b>62</b>	4,78	15
<b>21</b>	9,22	74	<b>42</b>	9,20	46			

**Tabela 22** – Valores aproximados de pI e massa molecular de proteínas dos “spots” presentes no gel realizado com membrana mitocondrial interna de rato, previamente solubilizada com 43,2 mM de C<sub>12</sub>E<sub>8</sub> e com 65 mM de CHAPS no tampão de focalização.

Nº spot	pI	MM (kDa)	Nº spot	pI	MM (kDa)	Nº spot	pI	MM (kDa)
1	5,26	102	12	8,32	53	23	9,96	38
2	5,42	98	13	5,34	53	24	8,40	33
3	4,61	95	14	6,30	52	25	1,00	31
4	5,48	72	15	6,70	52	26	4,50	21
5	6,85	71	16	9,32	51	27	3,45	17
6	8,50	66	17	9,03	51	28	3,64	16
7	6,46	63	18	9,74	47	29	4,52	16
8	4,81	61	19	9,22	46	30	3,95	16
9	8,42	58	20	9,05	46	31	4,52	15
10	8,60	58	21	8,67	46	32	4,70	15
11	5,15	53	22	4,49	44			

**Tabela 23** – Valores aproximados de pI e massa molecular de proteínas dos “spots” presentes no gel preparado com membrana mitocondrial interna de rato, previamente solubilizada com 43,2 mM de Triton X-100 e com 65 mM de CHAPS no tampão de focalização.

Nº spot	pI	MM (kDa)	Nº spot	pI	MM (kDa)	Nº spot	pI	MM (kDa)
1	9,69	101	65	4,90	59	128	3,42	43
2	9,63	101	66	4,95	59	129	3,49	42
3	9,23	85	67	5,08	59	130	6,99	41
4	6,95	84	68	7,14	58	131	3,70	40
5	8,66	84	69	9,02	59	132	6,32	37
6	7,17	83	70	5,17	58	133	5,38	37
7	7,30	83	71	8,34	58	134	6,15	37
8	7,41	83	72	8,45	58	135	6,21	36
9	6,56	83	73	8,70	58	136	5,48	36
10	9,06	82	74	8,82	58	137	5,45	36
11	6,50	79	75	5,28	58	138	6,43	36
12	6,31	78	76	5,49	58	139	5,49	36
13	5,98	78	77	5,63	58	140	5,38	35
14	9,86	78	78	6,47	57	141	6,37	35
15	8,53	75	79	5,82	57	142	5,83	35
16	9,63	73	80	6,75	57	143	6,12	35
17	9,70	73	81	6,82	57	144	6,50	35
18	9,56	73	82	8,44	57	145	5,45	34
19	9,46	71	83	5,97	57	146	9,45	34
20	9,30	71	84	6,02	57	147	5,51	34
21	9,71	71	85	6,15	57	148	6,14	34
22	9,16	70	86	6,23	57	149	9,29	34
23	5,81	70	87	6,58	57	150	5,72	34
24	7,62	70	88	7,01	57	151	6,02	34
25	6,65	69	89	8,19	57	152	7,52	34
26	6,78	69	90	6,95	57	153	7,59	34
27	6,46	69	91	7,17	57	154	7,71	34
28	7,95	69	92	7,26	57	155	6,25	33
29	6,83	68	93	7,35	57	156	7,52	33

30	6,89	68	94	7,49	57	157	5,74	33
31	9,35	68	95	7,79	57	158	6,12	33
32	9,44	68	96	4,43	57	159	7,33	33
33	9,50	68	97	4,60	57	160	7,59	33
34	9,27	68	98	8,84	57	161	5,49	32
35	9,17	67	99	8,71	57	162	7,49	32
36	7,38	67	100	7,22	56	163	7,35	32
37	6,29	67	101	7,37	55	164	7,41	32
38	7,22	65	102	7,82	55	165	7,65	31
39	5,52	64	103	8,59	55	166	7,82	30
40	6,83	64	104	7,22	55	167	6,78	30
41	5,76	64	105	7,58	55	168	7,73	30
42	8,35	64	106	8,56	54	169	5,56	29
43	8,44	64	107	7,66	52	170	7,49	29
44	6,02	64	108	7,49	51	171	7,68	29
45	6,08	64	109	4,59	50	172	7,58	29
46	6,90	64	110	6,35	50	173	5,43	29
47	7,05	64	111	6,12	49	174	7,48	28
48	7,18	64	112	7,63	50	175	7,79	29
49	7,35	64	113	7,90	50	176	7,68	28
50	7,11	64	114	8,01	50	177	7,02	28
51	7,88	64	115	7,45	49	178	5,54	22
52	7,94	64	116	7,83	49	179	7,32	19
53	7,57	63	117	8,05	49	180	9,25	18
54	7,01	62	118	9,79	48	181	1,01	17
55	6,89	60	119	7,94	49	182	9,79	17
56	6,82	60	120	6,16	48	183	9,97	17
57	6,65	60	121	6,44	47	184	9,61	17
58	6,96	60	122	6,86	46	185	6,48	17
59	7,01	60	123	7,47	45	186	9,29	17
60	4,82	59	124	5,86	44	187	9,35	17
61	4,49	59	125	6,78	44	188	6,25	16
62	7,08	59	126	5,97	44	189	9,63	16
63	4,59	59	127	6,25	44	190	9,65	15
64	4,68	59						

**Tabela 24** – Valores aproximados de pI e massa molecular de proteínas dos “spots” presentes no gel realizado com membrana mitocondrial interna de rato, previamente solubilizada com 43,2 mM de Colato de sódio e com 65 mM de CHAPS no tampão de focalização.

Nº spot	pI	MM (kDa)	Nº spot	pI	MM (kDa)	Nº spot	pI	MM (kDa)
1	4,91	100	21	6,70	62	40	4,61	53
2	4,22	98	22	8,78	62	41	7,54	53
3	7,26	84	23	9,08	62	42	9,72	48
4	7,00	83	24	3,92	58	43	6,72	47
5	7,12	83	25	4,90	56	44	4,00	47
6	6,71	83	26	4,62	57	45	4,19	46
7	4,72	78	27	4,76	57	46	4,12	46
8	4,81	78	28	5,10	57	47	5,69	39
9	7,01	71	29	5,31	57	48	6,45	32
10	7,08	71	30	8,71	56	49	6,35	28
11	7,01	68	31	8,91	56	50	6,50	28
12	4,50	67	32	7,66	54	51	6,55	27

---

<b>13</b>	4,44	66	<b>33</b>	6,97	54	<b>52</b>	4,02	21
<b>14</b>	4,53	66	<b>34</b>	7,38	54	<b>53</b>	3,56	16
<b>15</b>	6,93	64	<b>35</b>	6,71	54	<b>54</b>	4,04	16
<b>16</b>	8,35	64	<b>36</b>	7,49	54	<b>55</b>	3,80	16
<b>17</b>	3,69	63	<b>37</b>	7,59	54	<b>56</b>	4,29	16
<b>18</b>	3,75	63	<b>38</b>	7,45	53	<b>57</b>	3,80	15
<b>19</b>	7,43	63	<b>39</b>	3,82	53	<b>58</b>	1,01	5
<b>20</b>	7,34	63						

**Tabela 25** - Análise de "spots" similares (grifados) na faixa de pI 3 a 4 entre as tabelas 16 (dodecil maltosídeo) e 17 (dodecil maltosídeo e CHAPS).

Dodecil Maltosídeo Associação- dodecil maltosídeo e CHAPS

nº spot	pI	MM (kDa)
6	3,9	89
7	3,93	80
8	3,5	79
9	3,36	78
50	3,88	22
51	3,78	22
96	3,9	17
99	3,82	17
104	3,68	17
108	3,9	17
109	3,8	17
127	3,53	15

Nº spot	pI	MM (kDa)
2	3,84	95
4	3,56	94
7	3,83	91
14	3,81	78
16	3,59	78
17	3,45	77
39	3,97	45
51	3,51	37
55	3,85	36
56	3,56	35
57	3,46	35
68	3,51	31
69	3,84	31
80	3,84	28
83	3,91	28
84	3,53	28
85	3,65	27
86	3,5	27
88	3,37	27
96	3,92	24
100	3,76	24
102	3,48	24
105	3,38	24
123	3,81	23
127	3,62	22
128	3,84	22
129	3,7	22
131	3,39	22
139	3,92	21

**Tabela 26** - Análise de "spots" similares (grifados) na faixa de pI 4 a 5 entre as tabelas 16 (dodecil maltosídeo) e 17 (dodecil maltosídeo e CHAPS).

## Dodecil Maltosídeo

nº spot	pI	MM (kDa)
1	4,55	101
2	4,54	93
3	4,78	93
4	4,29	92
5	4,08	91
10	4,48	76
11	4,77	76
12	4,34	75
13	4,47	68
14	4,62	68
15	4,81	69
16	4,33	67
17	4,22	67
18	4,06	66
19	4,45	63
20	4,23	62
21	4,33	62
22	4,61	59
23	4,85	32
24	4,79	31
25	4,7	31
26	4,34	31
39	4,96	23
40	4,82	23
41	4,88	23
42	4,34	23
43	4,72	23
45	4,5	23
46	4,6	23
47	4,21	22
48	4,1	22
49	4	22
52	4,39	21
53	4,39	20
59	4,96	20

## Associação- dodecil maltosídeo e CHAPS

nº spot	pI	MM (kDa)
35	4,66	54
41	4,59	42
45	4,88	40
46	4,01	39
47	4,59	39
49	4,84	37
50	4,67	37
52	4,55	37
54	4,37	36
62	4,79	32
64	4,62	32
75	4,77	28
78	4,92	28
81	4,53	28
82	4,22	28
95	4,82	25
97	4,92	25
101	4,1	24
103	4,95	24
106	4,74	24
122	4,19	23
134	4,82	21
135	4,94	21
137	4,63	21
154	4,23	19
155	4,96	19
158	4,75	18
159	4,94	18
165	4,86	18
177	4,71	15
178	4,78	15
179	4,63	15
180	4,86	15
181	4,96	15
182	4,51	15

61	4,88	20
62	4,73	20
63	4,01	20
64	4,5	20
65	4,38	20
66	4,23	19
67	4,12	19
68	4,02	19
77	4,96	18
78	4,74	18
79	4,84	18
80	4,89	18
81	4,39	18
82	4,52	18
83	4,62	18
84	4,24	18
85	4,12	18
88	4,01	18
95	4,99	18
97	4,89	18
98	4,84	17
100	4,73	17
101	4,51	17
102	4,63	17
103	4,38	17
105	4,23	17
106	4,12	17
107	4,02	17
117	4,85	16
118	4,9	16
119	4,99	16
120	4,74	16
121	4,41	16
122	4,52	16
123	4,63	16
124	4,25	16
125	4,15	16
126	4,88	15
128	4,96	15
129	4,78	15
130	4,46	15
131	4,38	14
132	4,27	14
133	4,16	14

**Tabela 27** - Análise de “spots” similares (grifados) na faixa de pI 5 a 6 entre as tabelas 16 (dodecil maltosídeo) e 17 (dodecil maltosídeo e CHAPS).

## Dodecil Maltosídeo

nº spot	pI	MM (kDa)
<b>27</b>	5,13	24
<b>28</b>	5,44	23
<b>29</b>	5,22	24
<b>30</b>	5,31	23
<b>31</b>	5,58	23
<b>32</b>	5,66	23
<b>33</b>	5,75	24
<b>34</b>	5,91	24
<b>36</b>	5,04	23
<b>37</b>	5,36	23
<b>38</b>	5,84	24
<b>44</b>	5,17	23
<b>54</b>	5,44	20
<b>55</b>	5,13	20
<b>56</b>	5,18	20
<b>57</b>	5,24	20
<b>58</b>	5,04	20
<b>69</b>	5,45	19
<b>70</b>	5,14	19
<b>71</b>	5,18	19
<b>72</b>	5,25	19
<b>73</b>	5,38	19
<b>74</b>	5,59	19
<b>75</b>	5,53	19
<b>76</b>	5,05	18
<b>86</b>	5,26	18
<b>87</b>	5,6	18
<b>89</b>	5,15	18
<b>90</b>	5,2	18
<b>91</b>	5,33	18
<b>92</b>	5,45	18
<b>93</b>	5,53	18
<b>94</b>	5,05	18
<b>110</b>	5,47	16
<b>111</b>	5,15	16
<b>112</b>	5,26	16
<b>113</b>	5,2	16
<b>114</b>	5,33	16
<b>115</b>	5,6	16

## Associação - dodecil maltosídeo e CHAPS

nº spot	pI	MM (kDa)
<b>1</b>	5,26	100
<b>43</b>	5,08	40
<b>44</b>	5,42	40
<b>48</b>	5,55	38
<b>53</b>	5,05	37
<b>58</b>	5,69	34
<b>59</b>	5,38	33
<b>61</b>	5,25	33
<b>67</b>	5,34	32
<b>70</b>	5,08	31
<b>71</b>	5,78	30
<b>74</b>	5,1	28
<b>76</b>	5,57	29
<b>79</b>	5,49	28
<b>91</b>	5,89	26
<b>92</b>	5,14	25
<b>93</b>	5,25	25
<b>94</b>	5,59	25
<b>98</b>	5,04	25
<b>104</b>	5,77	24
<b>107</b>	5,12	24
<b>109</b>	5,28	24
<b>110</b>	5,2	24
<b>111</b>	5,56	23
<b>113</b>	5,36	23
<b>114</b>	5,66	23
<b>115</b>	5,83	23
<b>120</b>	5,02	23
<b>124</b>	5,28	22
<b>126</b>	5,38	22
<b>132</b>	5,12	21
<b>133</b>	5,5	21
<b>136</b>	5,19	21
<b>138</b>	5	21
<b>140</b>	5,26	21
<b>141</b>	5,69	21
<b>156</b>	5,12	19
<b>164</b>	5,06	18
<b>167</b>	5,29	18

116	5,07	16
135	5,45	18
136	5,53	18

169	5,02	17
170	5,13	17

**Tabela 28** - Análise de “spots” similares (grifados) na faixa de pI 3 a 4 entre as tabelas 17 (dodecil maltosídeo + CHAPS) e 18 (ASB-14 e CHAPS).

## Dodecil Maltosídeo

Nº spot	pI	MM (kDa)
139	3,92	21
131	3,39	22
127	3,62	22
129	3,7	22
128	3,84	22
123	3,81	23
105	3,38	24
102	3,48	24
100	3,76	24
96	3,92	24
88	3,37	27
86	3,5	27
85	3,65	27
84	3,53	28
80	3,84	28
83	3,91	28
68	3,51	31
69	3,84	31
57	3,46	35
56	3,56	35
55	3,85	36
51	3,51	37
39	3,97	45
17	3,45	77
16	3,59	78
14	3,81	78
7	3,83	91
4	3,56	94
2	3,84	95

## ASB-14

Nº spot	pI	MM (kDa)
1	3,35	4
2	3,09	11
10	3,99	22
20	3,74	50
23	3,41	51

**Tabela 29** - Análise de “spots” similares (grifados) na faixa de pI 4 a 5 entre as tabelas 17 (dodecil maltosídeo + CHAPS) e 18 (ASB-14 e CHAPS).

## Dodecil Maltosídeo

Nº spot	pI	MM (kDa)
35	4,66	54
41	4,59	42
45	4,88	40
46	4,01	39
47	4,59	39
49	4,84	37
50	4,67	37
52	4,55	37
54	4,37	36
62	4,79	32
64	4,62	32
75	4,77	28
78	4,92	28
81	4,53	28
82	4,22	28
95	4,82	25
97	4,92	25
101	4,1	24
103	4,95	24
106	4,74	24
122	4,19	23
134	4,82	21
135	4,94	21
137	4,63	21
154	4,23	19
155	4,96	19
158	4,75	18
159	4,94	18
165	4,86	18
177	4,71	15
178	4,78	15
179	4,63	15
180	4,86	15
181	4,96	15
182	4,51	15

## ASB-14

Nº spot	pI	MM (kDa)
13	4,57	23
21	4,24	51
25	4,67	55
26	4,35	56
27	4,15	57
35	4,98	63

**Tabela 30** - Análise de “spots” similares (grifados) na faixa de pI 4 a 5 entre as tabelas 17 (dodecil maltosídeo + CHAPS) e 19 (ASB-16 e CHAPS).

## Dodecil Maltosídeo

Nº spot	pI	MM (kDa)
35	4,66	54
41	4,59	42
45	4,88	40
46	4,01	39
47	4,59	39
49	4,84	37
50	4,67	37
52	4,55	37
54	4,37	36
62	4,79	32
64	4,62	32
75	4,77	28
78	4,92	28
81	4,53	28
82	4,22	28
95	4,82	25
97	4,92	25
101	4,1	24
103	4,95	24
106	4,74	24
122	4,19	23
134	4,82	21
135	4,94	21
137	4,63	21
154	4,23	19
155	4,96	19
158	4,75	18
159	4,94	18
165	4,86	18
177	4,71	15
178	4,78	15
179	4,63	15
180	4,86	15
181	4,96	15
182	4,51	15

## ASB-16

Nº spot	pI	MM (kDa)
38	4,74	72
39	4,26	73
40	4,33	73
41	4,43	73
49	4,98	69
69	4,31	64
70	4,73	63
73	4,61	63
74	4,92	63
130	4,17	50
182	4,88	33
185	4,59	30
186	4,84	30
190	4,42	23
191	4,06	21
192	4,31	21
193	4,05	20
194	4,26	20
201	4,33	15

**Tabela 31** - Análise de “spots” similares (grifados) na faixa de pI 5 a 6 entre as tabelas 17 (dodecil maltosídeo + CHAPS) e 19 (ASB-16 e CHAPS).

Dodecil Maltosídeo			ASB-16		
Nº spot	pI	MM (kDa)	Nº spot	pI	MM (kDa)
43	5,08	40	8	5,52	91
44	5,42	40	14	5,44	81
48	5,55	38	15	5,5	81
53	5,05	37	16	5,58	81
58	5,69	34	23	5,95	80
59	5,38	33	50	5,1	68
61	5,25	33	51	5,18	69
67	5,34	32	52	5,9	68
70	5,08	31	71	5,15	63
71	5,78	30	75	5,52	63
74	5,1	28	80	5,92	61
76	5,57	29	89	5,14	61
79	5,49	28	95	5,96	58
91	5,89	26	96	5,89	58
92	5,14	25	101	5,92	56
93	5,25	25	122	5,91	50
94	5,59	25	133	5,07	48
98	5,04	25	134	5,22	48
104	5,77	24	139	5,28	44
107	5,12	24	159	5,9	38
109	5,28	24	180	5,04	34
110	5,2	24	187	5,01	30
111	5,56	23	202	5,5	15
113	5,36	23			
114	5,66	23			
115	5,83	23			
120	5,02	23			
124	5,28	22			
126	5,38	22			
132	5,12	21			
133	5,5	21			
136	5,19	21			
138	5	21			
140	5,26	21			
141	5,69	21			
156	5,12	19			
164	5,06	18			
167	5,29	18			
169	5,02	17			
170	5,13	17			

**Tabela 32** - Análise de “spots” similares (grifados) na faixa de pl 6 a 7 entre as tabelas 17 (dodecil maltosídeo + CHAPS) e 19 (ASB-16 e CHAPS).

## Dodecil Maltosídeo

Nº spot	pl	MM (kDa)
<b>3</b>	6,95	95
<b>22</b>	6,36	74
27	6,29	62
<b>36</b>	6,27	50
37	6,1	46
40	6,18	43
42	6,75	41
<b>60</b>	6,29	33
73	6,19	29
89	6,74	27
99	6,96	25
118	6,74	23
121	6,16	23
145	6,52	21
150	6,2	20
151	6,54	20
153	6,94	20
<b>160</b>	6,52	18
171	6,49	16
172	6,65	16
174	6,8	16

## ASB-16

Nº spot	pl	MM (kDa)
<b>3</b>	6,55	103
<b>4</b>	6,22	95
5	6,9	91
6	6,71	91
21	6,45	80
22	6,57	80
24	6,87	79
28	6,49	76
29	6,73	75
<b>31</b>	6,56	74
<b>32</b>	6,97	74
46	6,5	70
53	6	68
54	6,13	68
55	6,49	68
58	6,66	68
59	6,91	68
68	6,68	64
81	6,32	61
82	6,43	61
83	6,6	61
86	6,11	61
87	6,85	61
88	6,95	61
93	6,45	57
94	6,55	58
98	6,52	56
102	6,28	56
103	6,35	56
107	6,71	55
108	6,63	54
<b>115</b>	6,6	50
<b>116</b>	6,36	50
123	6,11	51
<b>126</b>	6,9	50
<b>128</b>	6,97	50
<b>129</b>	6,48	50
131	6,8	49
160	6,11	38

161	6,45	38
162	6,56	39
163	6,95	38
164	6,8	38
168	6,63	38
174	6,81	36
178	6,56	36
179	6,47	36
183	6,86	33
196	6,45	18
203	6,36	15

**Tabela 33** - Análise de “spots” similares (grifados) na faixa de pI 7 a 8 entre as tabelas 17 (dodecil maltosídeo + CHAPS) e 19 (ASB-16 e CHAPS).

## Dodecil Maltosídeo

Nº spot	pI	MM (kDa)
175	7,15	16
176	7,3	16
173	7,87	16
168	7,08	17
161	7,75	18
162	7,92	18
130	7,85	22
112	7,6	23
90	7,08	26

## ASB-16

Nº spot	pI	MM (kDa)
197	7,3	18
205	7,2	20
204	7,33	22
188	7,24	29
184	7,52	31
181	7,45	33
175	7,16	36
176	7,35	36
173	7,62	36
177	7,98	36
156	7,05	38
165	7,21	38
166	7,33	38
157	7,68	39
144	7,31	44
136	7,42	48
135	7,93	48
132	7,41	49
117	7,21	50
119	7,65	50
127	7,96	50
118	7,31	51
124	7,78	51
104	7,19	56
99	7,34	56
105	7,85	56

91	7,61	58
84	7,25	61
85	7,65	62
60	7,26	68
61	7,74	68
62	7,94	68
42	7,01	71
37	7,47	73
33	7,21	74
30	7,32	74
27	7,19	76
25	7,24	79
26	7,7	79
11	7,23	86
12	7,74	86
13	7,85	86
9	7,58	90
10	7,72	90
7	7,11	91
1	7,27	103
2	7,4	103

**Tabela 34** - Análise de “spots” similares (grifados) na faixa de pI 8 a 9 entre as tabelas 17 (dodecil maltosídeo + CHAPS) e 19 (ASB-16 e CHAPS).

## Dodecil Maltosídeo

Nº spot	pI	MM (kDa)
5	8,78	93
6	8,88	91
8	8,64	91
9	8,36	91
10	8,91	86
12	8,72	86
19	8,7	74
20	8,83	74
21	8,95	74
23	8,69	68
24	8,83	69
25	8,95	68
26	8,49	69
28	8,71	61
29	8,83	61
30	8,94	60

## ASB-16

Nº spot	pI	MM (kDa)
19	8,77	80
20	8,86	80
43	8,29	71
48	8,78	69
56	8,38	68
57	8,51	68
63	8,31	68
64	8,2	68
76	8,51	62
77	8,71	62
78	8,42	62
79	8,18	61
90	8,77	59
92	8,95	59
97	8,77	58
100	8,5	56

38	8,81	45
63	8,56	32
65	8,69	32
66	8,79	32
108	8,38	24
116	8,36	23
117	8,5	23
119	8,6	23
125	8,24	22
142	8,59	21
143	8,48	20
144	8,67	21
146	8,38	20
147	8,29	20
148	8,57	20
149	8,73	20
152	8,8	20
157	8,81	18
163	8,1	18
166	8,99	18

106	8,43	56
114	8,87	51
120	8,23	50
121	8,41	51
125	8,65	51
138	8,83	45
140	8,5	44
141	8,59	44
142	8,36	44
143	8,25	44
145	8,57	42
151	8,93	40
152	8,84	39
153	8,69	39
154	8,51	39
155	8,39	39
158	8,28	39
167	8,1	39
170	8,93	37
171	8,84	37
172	8,46	37

**Tabela 35** - Análise de “spots” similares (grifados) na faixa de pl 9 a 10 entre as tabelas 17 (dodecil maltosídeo + CHAPS) e 19 (ASB-16 e CHAPS).

#### Dodecil Maltosídeo

Nº spot	pl	MM (kDa)
87	9,05	27
77	9,05	29
72	9,04	30
32	9,1	59
18	9,28	76
15	9,43	78
13	9,36	81
11	9,11	86

#### ASB-16

Nº spot	pl	MM (kDa)
189	9,31	28
169	9,12	38
149	9,06	40
150	9,13	40
148	9,27	40
147	9,45	40
146	9,59	41
137	9,22	45
113	9,21	52
111	9,45	53
112	9,71	53
110	9,78	53
109	9,95	54
72	9,07	63
67	9,56	64
66	9,92	65



**Tabela 37** - Análise de “spots” similares (grifados) na faixa de pI 4 a 5 entre as tabelas 17 (dodecil maltosídeo + CHAPS) e 20 (CHAPS: 43,2 e 65mM).

## Dodecil Maltosídeo

Nº spot	pI	MM (kDa)
35	4,66	54
41	4,59	42
45	4,88	40
46	4,01	39
47	4,59	39
49	4,84	37
50	4,67	37
52	4,55	37
54	4,37	36
62	4,79	32
64	4,62	32
75	4,77	28
78	4,92	28
81	4,53	28
82	4,22	28
95	4,82	25
97	4,92	25
101	4,1	24
103	4,95	24
106	4,74	24
122	4,19	23
134	4,82	21
135	4,94	21
137	4,63	21
154	4,23	19
155	4,96	19
158	4,75	18
159	4,94	18
165	4,86	18
177	4,71	15
178	4,78	15
179	4,63	15
180	4,86	15
181	4,96	15
182	4,51	15

## CHAPS

Nº spot	pI	MM (kDa)
3	4,04	14
4	4,33	14
5	4,12	14
6	4,07	14
7	4,47	14
8	4,17	14
10	4,72	14
16	4,24	17
17	4,67	21
19	4,77	25
20	4,54	26
23	4,8	40
24	4,7	41
25	4,62	41
34	4,88	53
50	4,61	56
51	4,01	55
52	4,65	61
63	4,88	73
81	4,29	89
82	4,37	90
83	4,23	90
85	4,07	91
86	4,01	92
130	4,76	97
131	4,81	97

**Tabela 38** - Análise de "spots" similares (grifados) na faixa de pI 5 a 6 entre as tabelas 17 (dodecil maltosídeo + CHAPS) e 20 (CHAPS: 43,2 e 65mM).

Dodecil Maltosídeo		
Nº spot	pI	MM (kDa)
43	5,08	40
44	5,42	40
48	5,55	38
53	5,05	37
58	5,69	34
59	5,38	33
61	5,25	33
67	5,34	32
70	5,08	31
71	5,78	30
74	5,1	28
76	5,57	29
79	5,49	28
91	5,89	26
92	5,14	25
93	5,25	25
94	5,59	25
98	5,04	25
104	5,77	24
107	5,12	24
109	5,28	24
110	5,2	24
111	5,56	23
113	5,36	23
114	5,66	23
115	5,83	23
120	5,02	23
124	5,28	22
126	5,38	22
132	5,12	21
133	5,5	21
136	5,19	21
138	5	21
140	5,26	21
141	5,69	21
156	5,12	19
164	5,06	18
167	5,29	18
169	5,02	17
170	5,13	17

CHAPS		
Nº spot	pI	MM (kDa)
22	5,08	38
32	5,31	51
33	5,2	53
35	5,03	53
62	5,05	73
66	5,29	83

**Tabela 39** - Análise de “spots” similares (grifados) na faixa de pI 8 a 9 entre as tabelas 17 (dodecil maltosídeo + CHAPS) e 20 (CHAPS: 43,2 e 65mM).

## Dodecil Maltosídeo

Nº spot	pI	MM (kDa)
5	8,78	93
6	8,88	91
8	8,64	91
9	8,36	91
10	8,91	86
12	8,72	86
19	8,7	74
20	8,83	74
21	8,95	74
23	8,69	68
24	8,83	69
25	8,95	68
26	8,49	69
28	8,71	61
29	8,83	61
30	8,94	60
38	8,81	45
63	8,56	32
65	8,69	32
66	8,79	32
108	8,38	24
116	8,36	23
117	8,5	23
119	8,6	23
125	8,24	22
142	8,59	21
143	8,48	20
144	8,67	21
146	8,38	20
147	8,29	20
148	8,57	20
149	8,73	20
152	8,8	20
157	8,81	18
163	8,1	18
166	8,99	18

## CHAPS

Nº spot	pI	MM (kDa)
28	8,19	49
36	8,46	54
37	8,29	54
38	8,12	54
39	8,19	54
40	8,05	54
54	8,35	67
55	8,11	67
60	8,93	69
69	8,34	84
70	8,75	85
71	8,63	84
72	8,52	84
73	8,08	84
76	8,93	86

**Tabela 40** - Análise de “spots” similares (grifados) na faixa de pI 4 a 5 entre as tabelas 17 (dodecil maltosídeo + CHAPS) e 21 (Digitonina e CHAPS).

## Dodecil Maltosídeo

Nº spot	pI	MM (kDa)
35	4,66	54
41	4,59	42
45	4,88	40
46	4,01	39
47	4,59	39
49	4,84	37
50	4,67	37
52	4,55	37
54	4,37	36
62	4,79	32
64	4,62	32
75	4,77	28
78	4,92	28
81	4,53	28
82	4,22	28
95	4,82	25
97	4,92	25
101	4,1	24
103	4,95	24
106	4,74	24
122	4,19	23
134	4,82	21
135	4,94	21
137	4,63	21
154	4,23	19
155	4,96	19
158	4,75	18
159	4,94	18
165	4,86	18
177	4,71	15
178	4,78	15
179	4,63	15
180	4,86	15
181	4,96	15
182	4,51	15

## Digitonina

Nº spot	pI	MM (kDa)
10	4,69	88
12	4,9	82
13	4,97	82
39	4,56	55
43	4,55	44
46	4,51	42
48	4,61	24
50	4,61	22
51	4,89	18
52	4,64	18
53	4,97	18
54	4,92	18
55	4,97	18
57	4,64	17
59	4,08	17
60	4,86	17
61	4,79	16
62	4,78	15

**Tabela 41** - Análise de “spots” similares (grifados) na faixa de pI 8 a 9 entre as tabelas 17 (dodecil maltosídeo + CHAPS) e 21 (Digitonina e CHAPS).

## Dodecil Maltosídeo

Nº spot	pI	MM (kDa)
5	8,78	93
6	8,88	91
8	8,64	91
9	8,36	91
10	8,91	86
12	8,72	86
19	8,7	74
20	8,83	74
21	8,95	74
23	8,69	68
24	8,83	69
25	8,95	68
26	8,49	69
28	8,71	61
29	8,83	61
30	8,94	60
38	8,81	45
63	8,56	32
65	8,69	32
66	8,79	32
108	8,38	24
116	8,36	23
117	8,5	23
119	8,6	23
125	8,24	22
142	8,59	21
143	8,48	20
144	8,67	21
146	8,38	20
147	8,29	20
148	8,57	20
149	8,73	20
152	8,8	20
157	8,81	18
163	8,1	18
166	8,99	18

## Digitonina

Nº spot	pI	MM (kDa)
8	8,95	94
9	8,31	91
15	8,84	80
16	8,59	79
17	8,34	79
18	8,2	78
24	8,86	72
35	8,93	61
36	8,74	60
37	8,4	60
38	8,24	59
45	8,89	42
47	8,43	41

**Tabela 42** - Análise de "spots" similares (grifados) na faixa de pI 9 a 10 entre as tabelas 17 (dodecil maltosídeo + CHAPS) e 21 (Digitonina e CHAPS).

## Dodecil Maltosídeo

Nº spot	pI	MM (kDa)
11	9,11	86
13	9,36	81
15	9,43	78
18	9,28	76
32	9,1	59
72	9,04	30
77	9,05	29
87	9,05	27

## Digitonina

Nº spot	pI	MM (kDa)
14	9,09	81
19	9,53	76
21	9,22	74
22	9,8	73
23	9,62	72
26	9,42	71
27	9,28	71
30	9,66	65
31	9,41	63
32	9,94	63
33	9,21	62
34	9,71	62
40	9,96	50
41	9,72	48
42	9,2	46
44	9,18	43
49	9,85	23

**Tabela 43** - Análise de “spots” similares (grifados) na faixa de pI 4 a 5 entre as tabelas 17 (dodecil maltosídeo + CHAPS) e 22 (C<sub>12</sub>E<sub>8</sub> e CHAPS).

## Dodecil Maltosídeo

Nº spot	pI	MM (kDa)
35	4,66	54
41	4,59	42
45	4,88	40
46	4,01	39
47	4,59	39
49	4,84	37
50	4,67	37
52	4,55	37
54	4,37	36
62	4,79	32
64	4,62	32
75	4,77	28
78	4,92	28
81	4,53	28
82	4,22	28
95	4,82	25
97	4,92	25
101	4,1	24
103	4,95	24
106	4,74	24
122	4,19	23
134	4,82	21
135	4,94	21
137	4,63	21
154	4,23	19
155	4,96	19
158	4,75	18
159	4,94	18
165	4,86	18
177	4,71	15
178	4,78	15
179	4,63	15
180	4,86	15
181	4,96	15
182	4,51	15

C<sub>12</sub>E<sub>8</sub>

Nº spot	pI	MM (kDa)
3	4,61	95
8	4,81	61
22	4,49	44
26	4,5	21
29	4,52	16
31	4,52	15
32	4,7	15

**Tabela 44** - Análise de "spots" similares (grifados) na faixa de pI 5 a 6 entre as tabelas 17 (dodecil maltosídeo + CHAPS) e 23 (Triton X-100 e CHAPS).

Dodecil Maltosídeo			Triton X-100		
Nº spot	pI	MM (kDa)	Nº spot	pI	MM (kDa)
43	5,08	40	13	5,98	78
44	5,42	40	23	5,81	70
48	5,55	38	39	5,52	64
53	5,05	37	41	5,76	64
58	5,69	34	67	5,08	59
59	5,38	33	70	5,17	58
61	5,25	33	75	5,28	58
67	5,34	32	76	5,49	58
70	5,08	31	77	5,63	58
71	5,78	30	79	5,82	57
74	5,1	28	83	5,97	57
76	5,57	29	124	5,86	44
79	5,49	28	126	5,97	44
91	5,89	26	133	5,38	37
92	5,14	25	136	5,48	36
93	5,25	25	137	5,45	36
94	5,59	25	139	5,49	36
98	5,04	25	140	5,38	35
104	5,77	24	142	5,83	35
107	5,12	24	145	5,45	34
109	5,28	24	147	5,51	34
110	5,2	24	150	5,72	34
111	5,56	23	157	5,74	33
113	5,36	23	161	5,49	32
114	5,66	23	169	5,56	29
115	5,83	23	173	5,43	29
120	5,02	23	178	5,54	22
124	5,28	22			
126	5,38	22			
132	5,12	21			
133	5,5	21			
136	5,19	21			
138	5	21			
140	5,26	21			
141	5,69	21			
156	5,12	19			
164	5,06	18			
167	5,29	18			
169	5,02	17			
170	5,13	17			

**Tabela 45** - Análise de "spots" similares (grifados) na faixa de pl 6 a 7 entre as tabelas 17 (dodecil maltosídeo + CHAPS) e 23 (Triton X-100 e CHAPS).

## Dodecil Maltosídeo

Nº spot	pl	MM (kDa)
3	6,95	95
22	6,36	74
27	6,29	62
36	6,27	50
37	6,1	46
40	6,18	43
42	6,75	41
60	6,29	33
73	6,19	29
89	6,74	27
99	6,96	25
118	6,74	23
121	6,16	23
145	6,52	21
150	6,2	20
151	6,54	20
153	6,94	20
160	6,52	18
171	6,49	16
172	6,65	16
174	6,8	16

## Triton X-100

Nº spot	pl	MM (kDa)
4	6,95	84
9	6,56	83
11	6,5	79
12	6,31	78
25	6,65	69
26	6,78	69
27	6,46	69
29	6,83	68
30	6,89	68
37	6,29	67
40	6,83	64
44	6,02	64
45	6,08	64
46	6,9	64
55	6,89	60
56	6,82	60
57	6,65	60
58	6,96	60
78	6,47	57
80	6,75	57
81	6,82	57
84	6,02	57
85	6,15	57
86	6,23	57
87	6,58	57
90	6,95	57
110	6,35	50
111	6,12	49
120	6,16	48
121	6,44	47
122	6,86	46
125	6,78	44
127	6,25	44
130	6,99	41
132	6,32	37
134	6,15	37
135	6,21	36
138	6,43	36
141	6,37	35

143	6,12	35
144	6,5	35
148	6,14	34
151	6,02	34
155	6,25	33
158	6,12	33
167	6,78	30
185	6,48	17
188	6,25	16

**Tabela 46** - Análise de “spots” similares (grifados) na faixa de pI 9 a 10 entre as tabelas 17 (dodecil maltosídeo + CHAPS) e 23 (Triton X-100 e CHAPS).

#### Dodecil Maltosídeo

Nº spot	pI	MM (kDa)
11	9,11	86
13	9,36	81
15	9,43	78
18	9,28	76
32	9,1	59
72	9,04	30
77	9,05	29
87	9,05	27

#### Triton X-100

Nº spot	pI	MM (kDa)
1	9,69	101
2	9,63	101
3	9,23	85
10	9,06	82
14	9,86	78
16	9,63	73
17	9,7	73
18	9,56	73
19	9,46	71
20	9,3	71
21	9,71	71
22	9,16	70
31	9,35	68
32	9,44	68
33	9,5	68
34	9,27	68
35	9,17	67
69	9,02	59
118	9,79	48
146	9,45	34
149	9,29	34
180	9,25	18
182	9,79	17
183	9,97	17
184	9,61	17
186	9,29	17
187	9,35	17
189	9,63	16
190	9,65	15

**Tabela 47** - Análise de “spots” similares (grifados) na faixa de pI 4 a 5 entre as tabelas 17 (dodecil maltosídeo + CHAPS) e 24 (Colato de sódio e CHAPS).

## Dodecil Maltosídeo

Nº spot	pI	MM (kDa)
35	4,66	54
41	4,59	42
45	4,88	40
46	4,01	39
47	4,59	39
49	4,84	37
50	4,67	37
52	4,55	37
54	4,37	36
62	4,79	32
64	4,62	32
75	4,77	28
78	4,92	28
81	4,53	28
82	4,22	28
95	4,82	25
97	4,92	25
101	4,1	24
103	4,95	24
106	4,74	24
122	4,19	23
134	4,82	21
135	4,94	21
137	4,63	21
154	4,23	19
155	4,96	19
158	4,75	18
159	4,94	18
165	4,86	18
177	4,71	15
178	4,78	15
179	4,63	15
180	4,86	15
181	4,96	15
182	4,51	15

## Colato de sódio

Nº spot	pI	MM (kDa)
7	4,72	78
8	4,81	78
12	4,5	67
13	4,44	66
14	4,53	66
25	4,9	56
26	4,62	57
27	4,76	57
40	4,61	53
44	4	47
45	4,19	46
46	4,12	46
52	4,02	21
54	4,04	16
56	4,29	16

**Tabela 48** - Análise de “spots” similares (grifados) na faixa de pI 6 a 7 entre as tabelas 17 (dodecil maltosídeo + CHAPS) e 24 (Colato de sódio e CHAPS).

## Dodecil Maltosídeo

Nº spot	pI	MM (kDa)
3	6,95	95
22	6,36	74
27	6,29	62
36	6,27	50
37	6,1	46
40	6,18	43
42	6,75	41
60	6,29	33
73	6,19	29
89	6,74	27
99	6,96	25
118	6,74	23
121	6,16	23
145	6,52	21
150	6,2	20
151	6,54	20
153	6,94	20
160	6,52	18
171	6,49	16
172	6,65	16
174	6,8	16

## Colato de sódio

Nº spot	pI	MM (kDa)
6	6,71	83
15	6,93	64
21	6,7	62
33	6,97	54
35	6,71	54
43	6,72	47
48	6,45	32
49	6,35	28
50	6,5	28
51	6,55	27



Universidade Estadual de Campinas  
Instituto de Biologia



CEEA-IB-UNICAMP

Comissão de Ética na Experimentação Animal  
CEEA-IB-UNICAMP

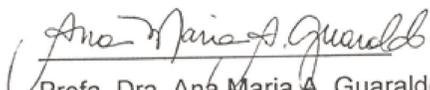
CERTIFICADO

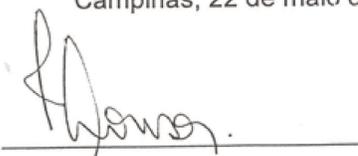
Certificamos que o Protocolo nº 1023-1, sobre "EFEITO DE SURFACTANTES E PRÉ-PROCESSAMENTO NA SOLUBILIZAÇÃO DE MEMBRANA MITOCONDRIAL INTERNA, ANALISADA POR ELETROFORESE BIDIMENSIONAL" sob a responsabilidade de Profa. Dra. Eneida de Paula / Elizabeth Souza da Cunha está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em reunião de 22 de maio de 2006.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 1023-1, entitled "EFFECT OF SURFACTANTES AND PREPROCESSING IN THE INNER MITOCHONDRIAL MEMBRANE SOLUBILIZATION, ANALYSED FOR TWO DIMENSIONAL ELECTROPHORESIS", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - UNICAMP) on May 22, 2006.

Campinas, 22 de maio de 2006.

  
Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo  
Presidente

  
Fátima Alonso  
Secretária Executiva

CEEA/IB – Unicamp  
Caixa Postal 6109  
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3788-6359  
Telefax: (19) 3788-6356  
E-mail: [ceea@cemib.unicamp.br](mailto:ceea@cemib.unicamp.br)  
<http://www.ib.unicamp.br/institucional/ceea/index.htm>