

UNICAMP

AVALIAÇÃO DA SOLUBILIZAÇÃO DE MEMBRANAS ERITROCITÁRIAS E SUAS FRAÇÕES RESISTENTES AOS DETERGENTES BRIJ 78 E BRIJ 97



Anne C. Ropelle; Bruna Casadei; Eneida de Paula; Cleyton C. Domingues

Laboratório de Biomembranas, Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia, UNICAMP, Campinas -SP

Financiamento: CNPq / SAE - UNICAMP

Palavras-chave: Eritrócitos – Detergentes – Lipid rafts

Introdução

Lipid rafts são microdomínios ricos em colesterol e esfingolípídios encontrados nas membranas celulares que se apresentam na fase líquido ordenada (*lo*), e estão associados a diversas funções celulares. Operacionalmente, as propriedades destes domínios na membrana, bem como seu papel fisiológico têm sido estudados através do preparo de DRMs (*Detergent-Resistant Membranes*). A facilidade de obtenção e isolamento da membrana do eritrócito faz com que esse tipo celular seja um ótimo modelo para o estudo de DRMs e *lipid rafts*. Este projeto desenvolveu análises da interação da membrana eritrocitária com os detergentes Brij 78 e Brij 97 e dos componentes da membrana resistentes a esses detergentes.

Detergente	MM	HLB	CMC (M)	Estrutura Molecular
Brij 97 (polioxietileno 10-oleil éter)	709	12,4	$2,2 \cdot 10^{-5}$	
Brij 78 (polioxietileno 20-estearil éter)	1152	15,3	$4,6 \cdot 10^{-5}$	

Metodologia

Hemólise:



Ht 0,15%
Ht 0,30%
Ht 0,45%
Ht 0,60%

+ Diferentes [detergente]s

37°C
15 min

$$\%H = \frac{Aa - Acn}{(Acp - Acn)} \times 100^*$$

- Cn = controle negativo
- Cp = controle positivo

DRMs:



MβCD
(depleção de colesterol)
Intacto

Isolamento do DRM em gradiente de sacarose descontinuo

Análise Quantitativas
Perfil Eletroforético SDS- PAGE
Western Blotting

Resultados

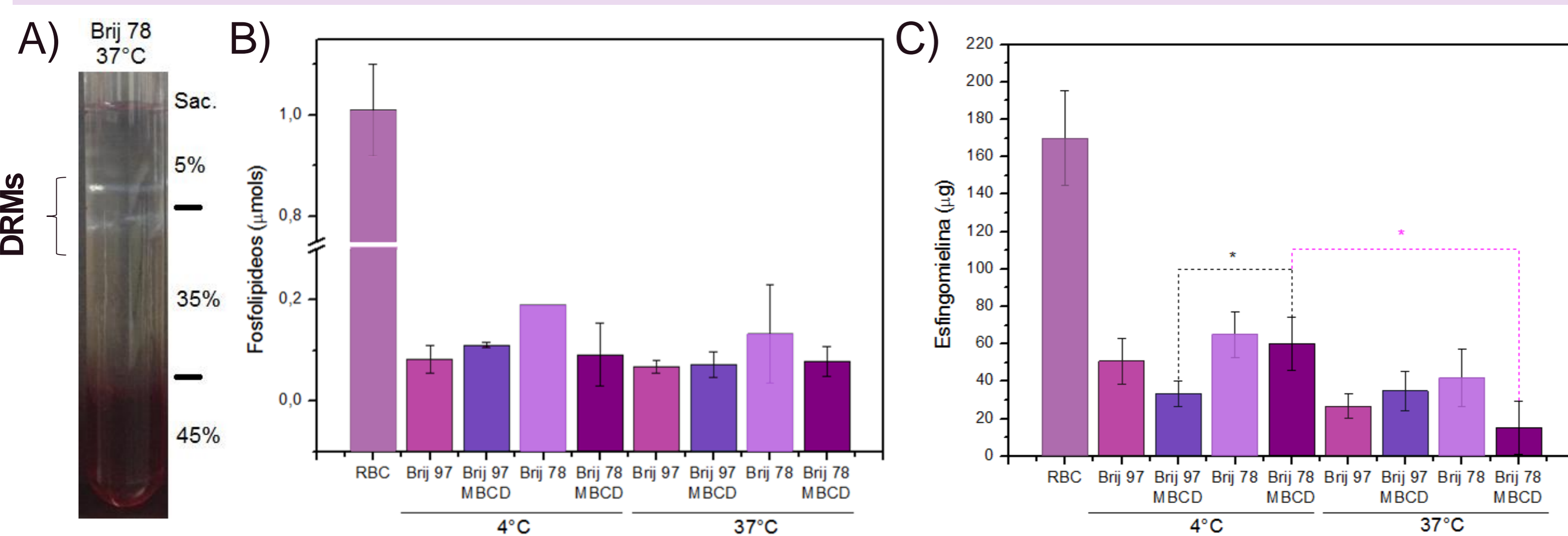


Figura 1: (A) Figura representativa do isolamento de DRMs em gradiente de sacarose descontinuo do Brij 78 a 37°C; visualmente DRMs foram obtidas para ambos os detergentes, a 4°C e 37°C. (B) Quantificação de fosfolípido e (C) esfingomielina em DRMs isoladas a partir de diferentes tratamentos. Teste T (n=3), *p<0,05. RBC = eritrócitos, MβCD = metil-beta-ciclodextrina.

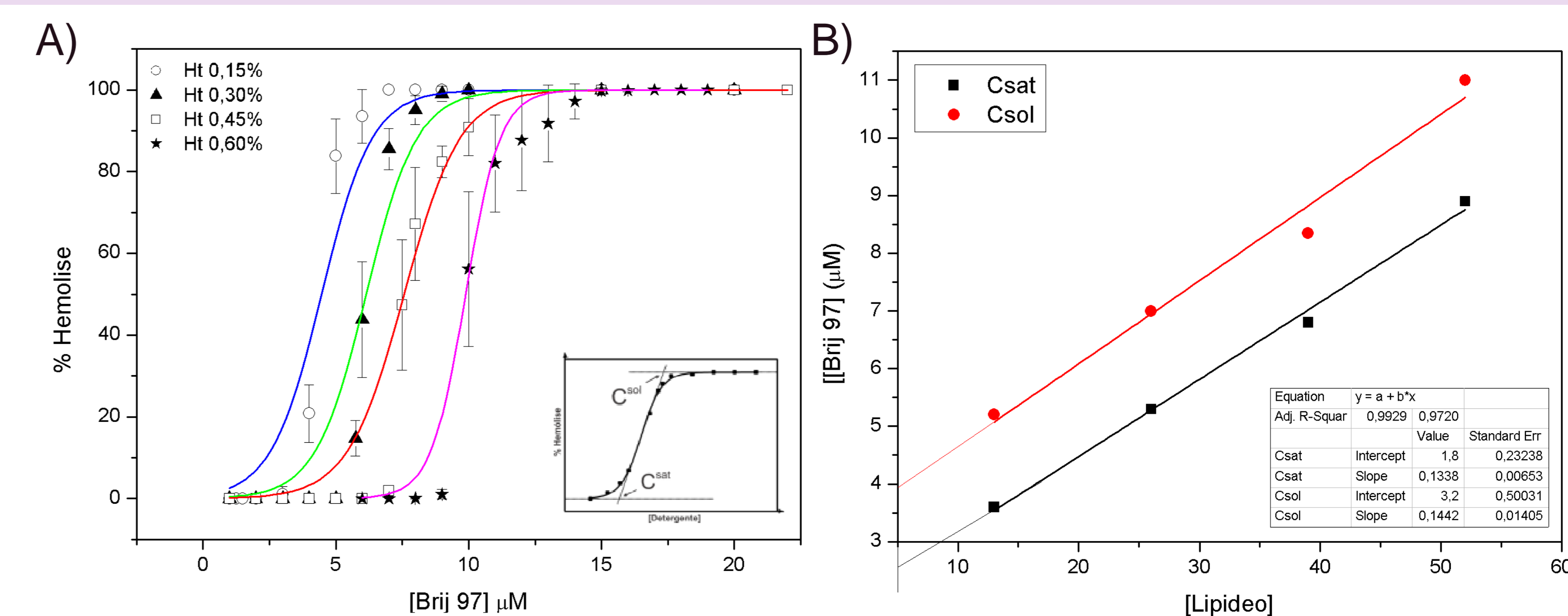


Tabela 1: Parâmetros Hemolíticos

	Brij 97	Brij 78
R_e^{sat}	0.134	0.104
R_e^{sol}	0.144	0.105
D_w^{sat}	0.18µM	- 0.7µM
$K_b (M^{-1})$	65660	-

Figura 4: (A) Curvas hemolíticas do Brij 97, determinação do Csat e Csol, concentração de detergente necessária para saturação e total solubilização da membrana, respectivamente. (B) Razões molares efetivas detergente/lípido para saturação e solubilização da membrana eritrocitária obtidas com uso do Brij 97 e a partir dos valores de Csat e Csol obtidos pelos diferentes hematócitos. A mesma análise foi realizada para o Brij 78.

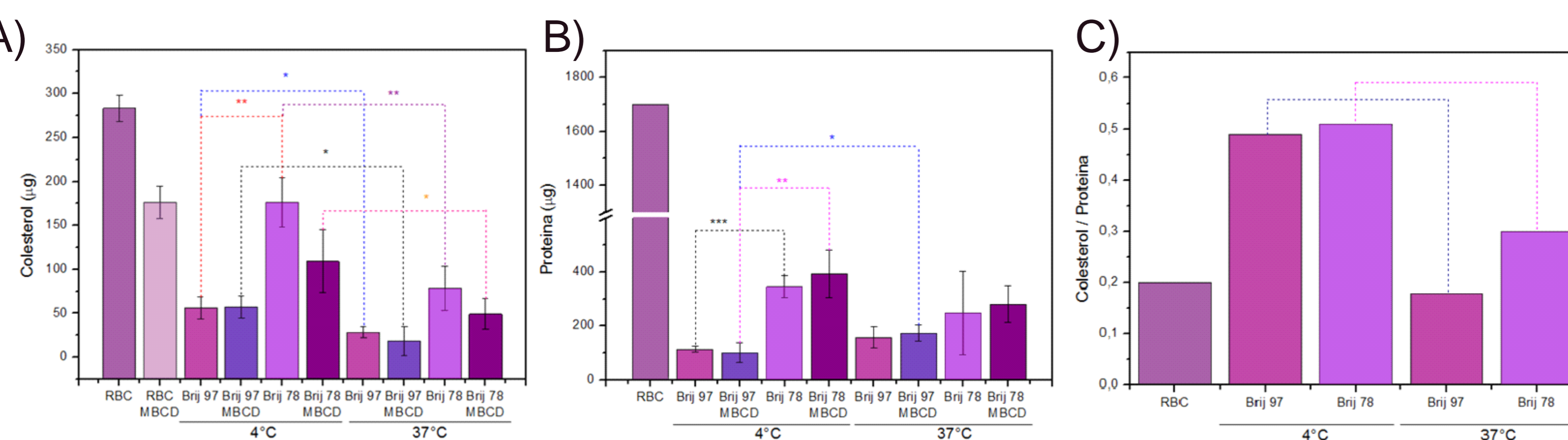


Figura 2: Caracterização de colesterol (A) e proteínas (B) de DRMs isoladas a partir de diferentes tratamentos (detergente, temperatura e conteúdo de colesterol). Razão colesterol/proteína de DRMs obtidas a 4°C e 37°C (C). Teste T (n=3-5), *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001. RBC = eritrócitos, MβCD = metil-beta-ciclodextrina.

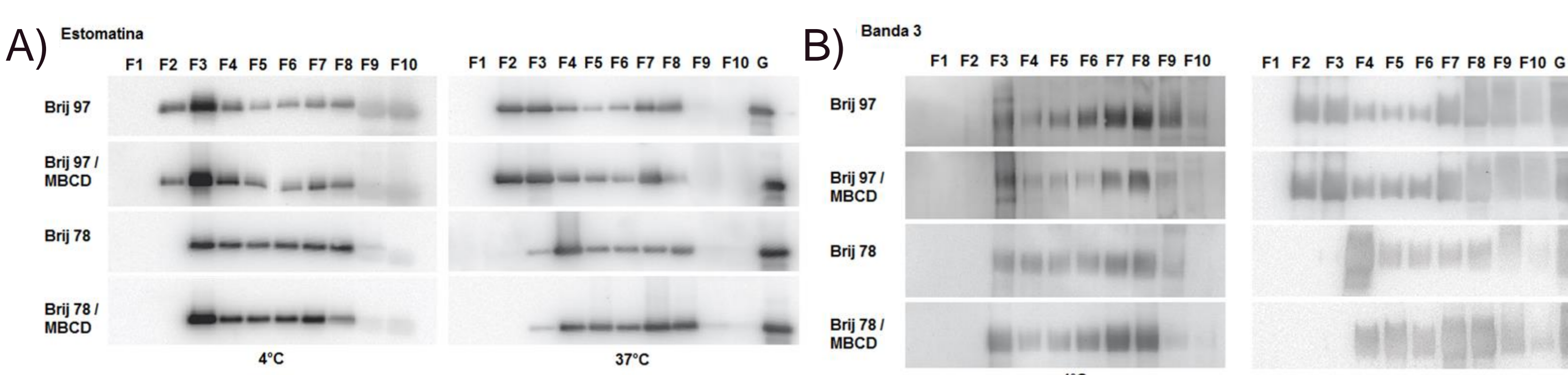


Figura 3: Distribuição de estomatina, proteína característica de *lipid rafts* (A) e banda 3, proteína integral mais abundante em eritrócitos (B) nas dez frações (F1-F10) recolhidas do gradiente de sacarose a partir da parte superior do tubo. Amostra de ghosts (membrana isolada de eritrócitos) foram usadas com controle positivo, G. F2 e F3 = DRMs de Brij 97 e F2, F3 e F4 = DRMs de Brij 78. Através do perfil eletroforético, foi possível a detecção de proteína 4.1, espectrina e actina em algumas amostras de DRMs.

Conclusões

- Os detergentes Brij 97 e Brij 78 possuem um alto poder hemolítico, com valores de R_e^{sat} muito menores que os obtidos para o Triton X-100 e outros detergentes da série Brij. A cadeia acila saturada do Brij 78 favorece seu maior efeito hemolítico.
- É possível isolar DRMs de eritrócitos através do uso de Brij 97 e Brij 78 a 4°C e a 37°C com composições lipídicas e proteicas semelhantes entre si, porém com alguns aspectos diferentes em comparação com as DRMs do TX-100.
- Lipid rafts* de eritrócitos devem estar associados ao citoesqueleto através de interações eletrostáticas assim como DRMs.
- O uso dos detergentes Brij 97 e Brij 78 preserva melhor a bicamada em DRMs de eritrócitos em comparação as DRMs de Triton X-100 promovendo maior estabilidade as proteínas Banda 3 e Estomatina.