



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Bruna Renata Casadei

“Solubilização parcial de membranas de eritrócitos e de sinaptossomas induzida por detergentes não iônicos”

CAMPINAS

2015



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Instituto de Biologia

Bruna Renata Casadei

“Solubilização parcial de membranas de eritrócitos e de sinaptossomas induzida por detergentes não iônicos”

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutora em Biologia Funcional e Molecular, área de Bioquímica.

Orientadora: Profa. Dra. Eneida de Paula

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA
TESE DEFENDIDA PELA ALUNA BRUNA RENATA CASADEI,
E ORIENTADA PELA PROFA. DRA. ENEIDA DE PAULA.

Campinas, 2015

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CAPES

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

C261s Casadei, Bruna Renata, 1986-
Solubilização parcial de membranas de eritrócitos e de sinaptossomas induzida por detergentes não iônicos / Bruna Renata Casadei. – Campinas, SP : [s.n.], 2015.

Orientador: Eneida de Paula.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Membranas. 2. Eritrócitos. 3. Sinaptossomas. 4. Detergente. 5. Microdomínios da membrana. I. Paula, Eneida de, 1963-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Partial solubilization of the erythrocyte and synaptosome membranes induced by nonionic detergents

Palavras-chave em inglês:

Membranes

Erythrocytes

Synaptosomes

Detergents

Membrane microdomains

Área de concentração: Bioquímica

Titulação: Doutora em Biologia Funcional e Molecular

Banca examinadora:

Eneida de Paula [Orientador]

Cíntia Maria Saia Cereda

Leandro Ramos Souza Barbosa

Anita Hilda Straus Takahashi

Sônia Valéria Pinheiro Malheiros Marques Fernandes

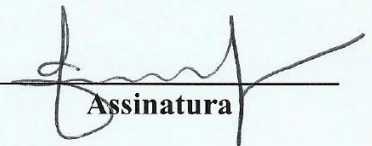
Data de defesa: 04-09-2015

Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular

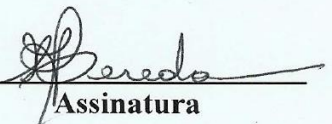
Campinas, 04 de setembro de 2015

Banca examinadora:

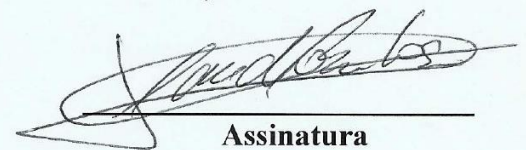
Profa. Dra. Eneida de Paula (Orientadora)


Assinatura

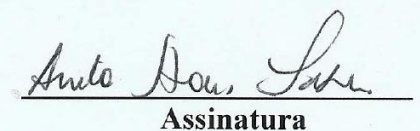
Dra. Cíntia Maria Saia Cereda


Assinatura

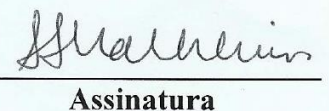
Prof. Dr. Leandro Ramos Souza Barbosa


Assinatura

Profa. Dra. Anita Hilda Straus Takahashi


Assinatura

Profa. Dra. Sônia Valéria Pinheiro Malheiros Marques Fernandes


Assinatura

Profa. Dra. Michele Franz Montan Braga Leite

Assinatura

Dr. Marcelo Bispo de Jesus

Assinatura

Profa. Dra. Daniele Ribeiro Araújo

Assinatura

Resumo

Lipids rafts são microdomínios, da ordem de 10 a 200 nm, enriquecidos em esfingolipídios, colesterol e proteínas específicas, responsáveis por diversos processos celulares e que possuem características similares à fase líquido-ordenada (L_o) encontrada em membranas modelo. Esses microdomínios têm sido estudados através do preparo de membranas resistentes à detergentes (DRMs). Neste trabalho nós investigamos a ação de detergentes não iônicos em duas membranas biológicas (de eritrócito humano e de sinaptossomas de córtex cerebral suíno) e a obtenção de DRMs com o fim de identificar os mecanismos determinantes da associação entre os componentes das membranas biológicas, que levam a separação lateral de fases. Medidas em monocamadas de Langmuir e em bicamadas (vesículas unilamelares gigantes, GUVs) com lipídios extraídos de membranas eritrocitárias possibilitaram avaliar a cinética de incorporação e o processo de solubilização induzido pelos detergentes TX-100 e Brij 98. Nessas membranas, o TX-100 foi capaz de separar domínios de fase L_o e, em concentrações acima da concentração micelar crítica (CMC), solubilizar a fração líquido-desordenada, enquanto o Brij 98 – de maior afinidade pelos lipídios que o TX-100 – em concentrações menores que a CMC, já foi capaz de fragmentar a membrana em microvesículas. Numa segunda abordagem experimental, utilizamos sinaptossomas de córtex cerebral suíno. O tratamento dessas biomembranas com TX-100 ou Brij 98, levou a obtenção de DRMs tanto à 4 quanto à 37 °C; as frações resistentes a TX-100 mostraram-se enriquecidas em colesterol e esfingomielinas, enquanto as DRMs de Brij 98 continham maior teor proteico e de fosfolipídios, e menor conteúdo de colesterol. O elevado teor de colesterol nas DRMs de TX-100 concorda com seu maior empacotamento lipídico, em relação às DRMs de Brij 98. Os resultados mostram que a composição de DRMs é totalmente dependente do detergente, indicando um processo de solubilização diferencial dos componentes da membrana eritrocitária e sinaptossomal induzido pelo TX-100 e pelo Brij-98. Desta forma, considerando a composição, o tamanho e a presença da fase L_o nos DRMs de TX-100, concluímos que este detergente não iônico é capaz de isolar mais eficientemente os microdomínios *lipid rafts* dessas duas biomembranas modelo.

Palavras-Chave: membranas, eritrócitos, sinaptossomas, detergentes, *lipid rafts*, DRMs.

Abstract

Lipid rafts are 10-200nm microdomains found in biological membranes, which are enriched in cholesterol, sphingolipids and specific proteins, being related to diverse cellular processes such as fusion, endocytosis,... Lipid rafts have properties also found in the liquid ordered (L_o) phase of model membranes. One approach to study such microdomains is offered by detergent resistant membranes (DRMs). In this thesis we have investigated the effect of non-ionic detergents in two biomembranes (human erythrocytes and pig brain cortex synaptosomes) and the preparation of their DRMs in order to identify the mechanisms that rule the association between membrane components, leading to phase separation. Studies with lipids extracted from erythrocyte membranes (Langmuir monolayers and giant unilamellar vesicles, GUV) allowed determination of the kinetics of membrane insertion and solubilization process induced by TX-100 and Brij 98. In such membranes, TX-100 was able to induce the formation of L_o phase resistant fractions and, above its critical micelle concentration (CMC), to solubilize such domains. As for Brij 98, which binds stronger to the membrane lipids, even below the CMC it disrupted the membranes in microvesicles (DRMs). We have also prepared synapsomal membranes from pig brain cortex. Treatment of such membranes with TX-100 or Brij 98 gave rise to DRMs, both at cold (4 °C) and at 37 °C; the TX-100 resistant fractions were enriched in cholesterol and sphingolipids, while the Brij 98 DRMs contained higher protein and phospholipid levels and low cholesterol content. The higher cholesterol level of the TX-100 DRMs agreed well with their improved lipid packing, detected by Electron Paramagnetic Resonance, in comparison to Brij 98 DRMs. In conclusion, the differential solubilization of erythrocyte and synaptosomal membrane components induced by TX-100 and Brij 98 show that is mainly the surfactant agent that determines DRMs composition. More specifically, considering the composition, size and presence of the L_o phase in TX-100 DRMs we conclude that this detergent is able to more efficiently isolate *lipid rafts* microdomains from the two model biomembranes studied.

Keywords: membranes, erythrocytes, synaptosomes, detergents, *lipid rafts*, DRMs

Agradecimentos

... e assim se foram 7 anos de Unicamp e 4 anos de doutorado. Foi um privilégio trabalhar no grupo de Biomembranas. E com muita tristeza e sentimentos de saudades agradeço a todos que fizeram desse lugar um ambiente tão agradável. Em especial gostaria de deixar nesta página a minha gratidão à algumas pessoas:

Primeiramente, agradeço à Deus, por todas as graças e bênçãos que recebi, por todos que conheci e por tudo o que vivi para chegar até aqui.

À minha família, pelo amor incondicional, educação e todo o apoio que sempre recebi.

À Profa. Dra. Eneida de Paula, por me aceitar em seu laboratório, pela oportunidade em realizar o PED, por incentivar e apoiar as minhas decisões e pela orientação de mestrado e doutorado.

Aos meus colaboradores, Dra. Maria Angélica Perillo, Dr. Eduardo Clop, Dra. Teresa Lamy, Dr. Evandro Duarte e Dra. Karin do Amaral Riske, por toda ajuda e empenho para a realização deste trabalho.

À minha banca de qualificação de doutorado: Dr. Daniel Martins, Dr. Marcelo Bispo e Dr. Leandro Barbosa.

À minha banca de defesa de tese: Dra Cíntia Cereda, Dra. Sônia Malheiros, Dra. Anita Takahashi e Dr. Leandro Barbosa.

Ao Dr. Cleyton Crepaldi Domingues, que está sempre disposto a me ajudar e com muita paciência me ensinou tudo o que precisava para chegar até aqui, me oferecendo sabedoria e, mais do que isso, me dando as mãos até mesmo quando eu não merecia. Não tenho palavras para expressar os meus sentimentos, mas serei eternamente agradecida!

Às amigas de laboratório: Camila, Cíntia, Juliana Matoso, Michele, Raquel, Vanne, Verônica e Vivi Guilherme, pois foram mais que amigas, me ajudaram profissionalmente, emocionalmente, espiritualmente, fisicamente e mentalmente! Cada uma me ensinou algo em especial e levarei para sempre em meu coração!

Aos “meninos” da bioquímica: Luiz, Márcio e Paulinho, por toda a ajuda profissional, pelas conversas, risadas e por compartilhar milhares de história vivida ao longo desses anos.

À aluna de IC mais fofa e confiável que tive, Anne Caroline Ropelle.

À querida Maribel, que sempre me apoiou e ajudou, deixando lembranças que guardarei para a vida toda.

Aos grandes amigos que fiz durante este período: Vivi Queiroz, Malu, Amanda Caritá e Lê (eu amo vocês!).

À Capes, CNPq e Faepex pelo suporte financeiro.

Índice de Figuras

Figura 1. Esquema demonstrando a curvatura lipídica positiva (A), negativa (B) e neutra (C) em monocamadas lipídicas, dependente da geometria lipídica: cone, cone invertido ou cilindro. Adaptado de Goñi (2014).	18
Figura 2. Representação de fases em bicamadas lipídicas: acima: vista lateral; abaixo, vista superior. A) preparadas a partir de um único lipídio na fase S_o e na fase L_d (acima da T_m do lipídio); B) formação da fase L_o , na presença de altas concentrações de colesterol. A bicamada é mais espessa na fase L_o do que na fase S_o e L_d . Adaptado de Ciana & cols. (2014).	20
Figura 3. Modelo esquemático da estrutura lipídica-proteica de <i>lipid rafts</i> , de acordo com Casadei (2011).	22
Figura 4. Representação do citoesqueleto de eritrócitos e sua interação com a bicamada lipídica. Esquema adaptado de Maier & cols. (2009).	26
Figura 5. Esquema de possíveis eventos envolvidos na interação de detergente com membranas biológicas. Os processos correspondem aos três principais estágios na solubilização: I - ligação do detergente à membrana; II - equilíbrio do detergente entre micela pura e membrana e início da solubilização. III - Após a saturação da membrana, moléculas do detergente saem da membrana carregando componentes da membrana (lipídios e proteínas).	30
Figura 6. Esquema simplificado das principais etapas metodológicas desenvolvidas na tese.	33
Figura 7. Desenho esquemático da cuba de Langmuir, com moléculas anfifílicas na superfície ar-água formando uma monocamada.	36
Figura 8. Estruturas químicas dos marcadores de spin contendo o grupo paramagnético nitróxido: 5-doxil-esteárico (5-SASL) e 16-doxil ácido esteárico (16-SASL).	42
Figura 9. Desenho esquemático da inserção de marcadores de spin (5 e 16-SASL) em bicamadas lipídicas, destacando (em vermelho) a região da bicamada monitorada por eles.	42
Figura 10. Espectro de RPE do marcador 5-SASL (A) e 16-SASL (B) em membranas eritrocitárias, evidenciando as medidas dos parâmetros especiais ($2A_{//}$ e $2A_{\perp}$ e h_{+1}/h_0).	43
Figura 11. Efeito da injeção de 1 mM de detergente na subfase abaixo das monocamadas de lipídios extraídos de <i>ghosts</i> de eritrócitos, submetidos a diferentes pressões	

iniciais de superfície lateral, na interface ar-água. A e B mostram a variação de pressão superficial em função do tempo para TX-100 e Brij 98, respectivamente. C e D se referem a mudança de pressão lateral de superfície após injeção de detergente TX-100 e Brij 98, respectivamente, em função da pressão inicial ($\Delta\pi_i = \pi_{\max} - \pi_i$). Os valores de $\pi_{\text{cut-off}}$ representam a máxima pressão superficial que permite a penetração de detergente na monocamada. (n=3).47

Figura 12. Cinética de incorporação de diferentes concentrações de TX-100 (A) e Brij 98 B) em monocamadas de lipídios extraídos de *ghosts* na interface ar-água, a 22 °C. ...48

Figura 13. Sequência de tempos registrada durante a injeção de 5 mM de TX-100 em eritro-GUVs, observadas por microscopia de fluorescência. A barra de escala indica 10 μm . Os experimentos foram realizados à temperatura ambiente.51

Figura 14. Registro de micrografias obtidas ao longo do tempo, após a adição de 0,3 mM de TX-100 em eritro-GUVs (imagens de 0 a 35 s), por microscopia de fluorescência e contraste de fase (imagem de 35 s, à direita). A barra de escala indica 10 μm . Os experimentos foram realizados à temperatura ambiente.52

Figura 15. Média da fração da área de superfície da vesícula insolúvel ($X_{\text{insolúvel}}$) após tratamento com TX-100. A) Fração insolúvel ($X_{\text{insolúvel}}$) de eritro-GUVs (preto) e de GUVs 2:1:2 (vermelho) à temperatura ambiente (23 °C, esquerda) e à 37 °C (direita). B) Variação de $X_{\text{insolúvel}}$ das GUVs de lipídios de *ghosts* (preto), GUVs 2:1:2 (vermelho), GUVs 1:1:2 (azul) e GUVs 0,8:1:2 (verde), à temperatura ambiente.54

Figura 16. Registro de micrografias obtidas ao longo do tempo após injeção de 0,1 mM de Brij 98 em GUVs de lipídios de *ghosts* à temperatura ambiente, por microscopia ótica de contraste de fase. A barra de escala indica 10 μm55

Figura 17. Microscopias eletrônicas de transmissão de sinaptossomas de córtex suíno. Aumento de 77.500 (A) e 60.000x (B).56

Figura 18. Efeito de diferentes concentrações de M β CD, HP β CD e β CD no conteúdo total de colesterol (A), fosfolipídio (B), esfingomielina (C) e proteína (D) da membrana sinaptossomal (n=3).58

Figura 19. Espectros de RPE do marcador de spin 5-SASL incorporado em membranas sinaptossomais tratadas com diferentes concentrações de M β DC (A), HP β DC (B) e β DC (C), obtidos a 22 °C. As setas indicam a componente móvel do espectro.60

Figura 20. Variação do parâmetro de ordem (S) do marcador de spins 5-SASL incorporado em membranas sinaptossomais tratadas com concentrações crescentes de M β CD, HP β CD ou β CD (n=3). Parâmetro calculado em espectros de RPE obtidos a 21 °C.61

Figura 21. Aspecto do gradiente de sacarose após ultracentrifugação das membranas sinaptossomais a 4 °C tratadas com TX-100 (A) ou Brij 98 (B) nas concentrações de 16, 8, 5, 2 mM e 0 mM (controle positivo), e sem membrana sinaptossomal (Sem Sinap, controle negativo). As DRMs foram separadas da fração 3 (seta). 62

Figura 22. Quantificação de colesterol (A e C) e proteínas totais (B e D) nas 10 frações coletadas após ultracentrifugação das membranas sinaptossomais tratadas com diferentes concentrações (2 a 16 mM) de TX-100 (A e B) e Brij 98 (C e D), a 4 °C. As DRMs foram isoladas da fração 3; (n=3). 63

Figura 23. Centrifugação em gradiente de sacarose de amostras de sinaptossomas íntegros ou depletados de colesterol, tratados com TX-100 ou Brij 98 (1%), à 4 °C. A seta indica a fração de DRMs, com densidade de 1,09 a 1,12 g/mL, encontrada entre a interface da solução de 5 e 30% de sacarose. M β CD indica a ciclodextrina utilizada para remoção de 50 % do colesterol das membranas antes do tratamento com detergente 65

Figura 24. Quantificação de colesterol (A), proteínas (B) e fosfolípidios (B), e da razão colesterol/proteínas, m:m (C): na membrana sinaptossomal (SG) e DRMs de TX-100 ou Brij 98, preparadas à 4 °C ou 37 °C, a partir de sinaptossomas íntegros (controle) ou tratados com M β CD (M β CD), n = 3. 66

Figura 25. Perfil eletroforético das 10 frações coletadas (colunas 1 a 10) em gradiente de sacarose das membranas sinaptossomais (SG) tratadas com **TX-100** à 4 (A e B) ou 37 °C (C e D) íntegras (A e C) ou com conteúdo reduzido de colesterol (B e D). PM: padrão de massa molecular (kDa). 69

Figura 26. Perfil eletroforético das 10 frações coletadas (colunas 1 a 10) em gradiente de sacarose, das membranas sinaptossomais (SG) tratadas com **Brij 98** à 4 (A e B) ou 37 °C (C e D) íntegras (A e C) ou com conteúdo reduzido de colesterol (B e D). PM: padrão de massa molecular (kDa). 70

Figura 27. Detecção por *western blot* da proteína marcadora de *lipid rafts* flotilina-2, nas 10 frações coletadas após tratamento das membranas sinaptossomais com os detergentes TX-100 e Brij 98, e separação em gradiente de sacarose. 71

Figura 28. Distribuição dos fosfolípidios (SM, PC, PE e PS) da membrana sinaptossomal e DRMs de TX-100 e Brij 98 preparadas a partir de membranas sinaptossomais íntegras (controle) ou com o conteúdo reduzido de colesterol (M β CD), obtidas à 4 ou 37 °C, detectados por HPTLC. Os valores estão expressos em μ g % e correspondem a uma média de 3 experimentos independentes. n = 3. 73

Figura 29. Fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de transmissão das amostras de DRMs de TX-100 e Brij 98, preparadas à 4 °C ou 37 °C, a partir de membrana sinaptossomal íntegra (controle) ou tratada com M β CD. As imagens foram obtidas com aumento de 77.500 e 60.000x (para as vesículas preparadas a 4 °C e 37 °C, respectivamente).

.....75

Figura 30. Espectros de RPE medidos à 4, 22 e 37 °C, do marcador de spins **5-SASL** em tampão Hepes e incorporado em membranas sinaptossomais íntegras (controle) e com conteúdo reduzido de colesterol (M β CD) e suas respectivas DRMs, obtidas com uso de TX-100 ou Brij 98, à 4 ou 37 °C.....78

Figura 31. Espectros de RPE medidos à 4, 22 e 37 °C, do marcador de spins **16-SASL** em tampão Hepes e incorporado em membranas sinaptossomais íntegras (controle) e com conteúdo reduzido de colesterol (M β CD) e suas respectivas DRMs, obtidas a partir de TX-100 ou Brij 98, à 4 ou 37 °C.....79

Figura 32. Variação dos parâmetros espectrais medidos por RPE: máximo desdobramento hiperfino ($2A_{\text{max}}$) nos espectros do marcador de spins 5-SASL (A) e razão entre os picos de campo baixo (h_{+1}) e médio (h_0), nos espectros de 16-SASL (B), medidos à 4, 22 e 37 °C em membranas sinaptossomais íntegras (controle, C) e com conteúdo reduzido de colesterol (sequestrado por M β CD, M) e suas respectivas DRMs, obtidas a partir de TX-100 ou Brij 98, à 4 ou 37 °C, n = 3.....80

Índice de Tabelas

Tabela 1. Estrutura química e algumas propriedades físico-químicas dos detergentes TX-100 e Brij 98 (MM=massa molar; CMC=concentração micelar crítica; HLB=balanço hidrofílico-lipofílico). A fração hidrofílica dos detergentes esta assinalada em cinza.....	29
Tabela 2. Parâmetros termodinâmicos (constantes de adsorção, desorção e de ligação), determinados a partir das medidas de cinética de incorporação dos detergentes TX-100 e Brij 98 em monocamadas de lipídios de <i>ghosts</i>	49
Tabela 3. Conteúdo proteico e lipídico (de fosfolipídios, PL, e colesterol, Col) das membranas sinaptossomais (SG) e de suas DRMs, obtidas a partir de membranas íntegras (Controle ou C) ou com conteúdo reduzido de colesterol (MβCD) com uso de Brij 98 e TX-100, à 4 e à 37 °C.....	68
Tabela 4. Diâmetro médio das vesículas de DRMs de TX-100 e Brij 98 preparadas a 4 °C ou 37 °C, a partir de membrana sinaptossomal íntegra (controle) ou tratada com MβCD, n=3. Medidas de espalhamento de luz dinâmico.....	75
Tabela 5. Máximo desdobramento hiperfino ($2A_{max}$) nos espectros do marcador de spins 5-SASL, medidos à 4, 22 e 37 °C em membranas sinaptossomais íntegras (control) e com conteúdo reduzido de colesterol (MβCD) e suas respectivas DRMs, obtidas a partir de TX-100 ou Brij 98, à 4 ou 37 °C. ^a membrana sinaptossomal controle <i>versus</i> membrana sinaptossomal MβCD; ^b DRMs controle <i>versus</i> DRMs MβCD; ^c membrana sinaptossomal controle <i>versus</i> DRMs controle; ^d DRMs TX-100 4 °C <i>versus</i> DRMs Brij 4 °C; ^e DRMs TX-100 37 °C <i>versus</i> DRMs Brij 37 °C; ***p < 0,001, **p < 0,01; *p < 0,05 (<i>test T de Student</i>).81	81
Tabela 6. Razão entre os picos de campo baixo (h_{+1}) e médio (h_0), nos espectros de 16-SASL, medidos à 4, 22 e 37 °C em membranas sinaptossomais íntegras (control) e com conteúdo reduzido de colesterol (MβCD) e suas respectivas DRMs, obtidas a partir de TX-100 ou Brij 98, à 4 ou 37 °C. ^a membrana sinaptossomal controle <i>versus</i> membrana sinaptossomal MβCD; ^b DRMs controle <i>versus</i> DRMs MβCD; ^c membrana sinaptossomal controle <i>versus</i> DRMs controle; ^d DRMs TX-100 4 °C <i>versus</i> DRMs Brij 4 °C; ^e DRMs TX-100 37 °C <i>versus</i> DRMs Brij 37 °C; ^f DRMs TX-100 4 °C <i>versus</i> 37 °C; **p < 0,01; *p < 0,05 (<i>test T de Student</i>)......	82

Abreviaturas e Siglas

$2A_{\max}$	Máximo desdobramento hiperfino
Brij 98	Polioxietileno 20-oleil éter
CMC	Concentração micelar crítica
Col	Colesterol
DRMs	<i>Detergent resistant membranes</i> ; membranas resistentes à detergente
Eritro-GUVs	GUVs preparadas à partir de lipídios extraídos de membranas eritrocitárias
GUVs	<i>Giant unilamellar vesicles</i> ; vesículas unilamelares gigantes
h_{+1}/h_0	Razão entre a intensidade dos picos de campo baixo (h_{+1}) e médio (h_0), em espectro de RPE
HLB	<i>Hydrophilic-lipophilic balance</i> ; balanço hidrofílico-lipofílico
HPTLC	<i>High performance thin layer chromatography</i> ; cromatografia em camada delgada de alta resolução
HP β CD	Hidroxipropil- β -ciclodextrina
K_a	Constante de adsorção
K_b	Constante de ligação
K_d	Constante de desorção
L_d	Fase líquido-desordenada
L_o	Fase líquido-ordenada
M β CD	Metil- β -ciclodextrina
PC	<i>Phosphatidylcholine</i> ; fosfatidilcolina
PE	<i>Phosphatidylethanolamine</i> ; fosfatidiletanolamina
PI	<i>Phosphatidylinositol</i> ; fosfatidilinositol
POPC	<i>1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine</i> ; 1-palmitoil-2-oleil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
PS	<i>Phosphatidylserine</i> ; fosfatidilserina
PVDF	<i>Polyvinylidene fluoride</i> ; fluoreto de polivinilideno

Rh-DPPE	<i>N-(Lissamine rhodamine B sulfonyl)-1,2-dipalmitoyl phosphatidylethanolamine</i> ; di-palmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-(lisamina rodamina B sulfonil)
RPE	Ressonância paramagnética eletrônica
SASL	<i>Stearic acid spin label</i> ; marcador de <i>spin</i> do tipo doxil-estearato
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate-poliacrylamide gel electrophoresis</i> ; eletroforese em gel de poliacrilamida - dodecil sulfato de sódio
SG	Membrana sinaptossomal preparada a partir de gradiente de sacarose
SM	<i>Sphingomyelin</i> ; esfingomielina
TX-100	Polioxietileno glicol terc-otilfenil éter
βCD	β-ciclodextrina

Sumário

Resumo	v
Abstract.....	vi
Agradecimentos	vii
Índice de Figuras	viii
Índice de Tabelas	xii
Abreviaturas e Siglas	xiii
Sumário.....	xv
1. Introdução	17
1.1. Membranas biológicas	17
1.2. <i>Lipid rafts</i>	19
1.3. Membranas resistentes a detergentes	22
1.4. Eritrócitos	24
1.5. Sinaptossomas.....	27
1.6. Detergentes e solubilização de membranas	28
2. Objetivos.....	31
2.1. Parte 1: Estudo da interação entre detergente e lipídios de membranas eritrocitárias	31
2.2. Parte 2. Caracterização de membranas sinaptossomais resistentes a detergentes	31
3. Materiais e Métodos	33
3.1. Materiais	33
3.2. Equipamentos	34
3.3. Parte 1. Interação entre detergentes e lipídios de membranas eritrocitárias	34
3.3.1. Preparo das membranas eritrocitárias e <i>ghosts</i>	35
3.3.2. Extração de lipídios	35
3.3.3. Monocamadas de Langmuir	35
3.3.4. Vesículas Unilamelares Gigantes (GUVs).....	37
3.4. Parte 2. Membranas sinaptossomais resistentes à detergentes	38
3.4.1. Preparo das membranas sinaptossomais	38
3.4.2. Remoção do colesterol das membranas sinaptossomais.....	39

3.4.3. Isolamento de DRMs de membranas sinaptossomais.....	39
3.4.4. Caracterização do conteúdo total de proteínas, colesterol, fosfolipídios e esfingolipídios.	40
3.4.5. Eletroforese e Western Blot	40
3.4.6. Microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	40
3.4.7. Determinação do tamanho das vesículas	41
3.4.8. Cromatografia líquida em camada delgada de alta eficiência (HPTLC)	41
3.4.9. Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE)	41
3.4.10. Análises estatísticas	44
4. Resultados e Discussão.....	45
4.1. Parte 1. Interação entre detergentes e lipídios de membranas eritrocitárias.....	46
4.1.1. Medidas de isotermas de pressão na interface ar-água	46
4.2.2. Ação de TX-100 e Brij 98 em GUVs de membranas eritrocitárias	50
4.3. Parte 2. Membranas sinaptossomais resistentes a detergentes	56
4.3.2. Redução do conteúdo de colesterol das membranas sinaptossomais por ação de ciclodextrinas.....	57
4.3.3. Preparo e isolamento de DRMs de sinaptossomas em gradiente de sacarose	61
4.3.4. Caracterização de DRMs sinaptossomais	64
5. Conclusões.....	85
6. Perspectivas	88
7. Referências Bibliográficas.....	89
8. Produção científica no período	99
9. Anexos	102

1. Introdução

As membranas plasmáticas são estruturas muito complexas e altamente dinâmicas: definem o limite celular, atuam na recepção/transdução de sinais, nas transformações de energia para a célula, no transporte seletivo de metabolitos, mediam a comunicação entre as células, regulam a função celular além de estarem envolvidas em processos de endo e exocitose (Rajendran et al., 2010). Elas são compostas por uma bicamada lipídica onde proteínas estão inseridas e, em menor quantidade em relação aos outros componentes, uma porção de carboidratos é encontrada na forma de glicoproteínas e glicolipídios. Apesar de conter uma grande fração, em massa, de proteínas, a bicamada lipídica é a chave da construção da membrana biológica formando uma matriz estrutural e oferecendo estabilidade mecânica e seletiva à permeação de íons e moléculas grandes (Machan & Hof, 2010). Compreender a membrana plasmática é um passo crucial para entender como se dá a interação entre as células e, conseqüentemente, os tecidos, os sistemas e, o principal, a vida.

1.1. Membranas biológicas

Em solução aquosa os lipídios anfifílicos, contendo uma porção hidrofóbica (“cauda” ou cadeia acila) e uma porção hidrofílica (“cabeça”), se auto arranjam devido ao efeito hidrofóbico a fim de diminuir a área de contato entre as moléculas de água e as cadeias acilas. Assim, eles expõem seus grupos polares ao meio aquoso, minimizando a interação do solvente polar com as cadeias acilas. A estrutura formada (por exemplo: bicamada, micela, fase hexagonal, fase cúbica) dependerá da geometria dos lipídios constituintes (Yeagle, 2012). Nas membranas, a geometria lipídica (por exemplo de cone, cone invertido ou cilíndrica) confere curvatura intrínseca positiva, negativa ou neutra (Figura 1), respectivamente, a cada monocamada (Goñi, 2014). Em mamíferos, os glicerofosfolipídios e os esfingolipídios são os principais componentes lipídicos das membranas plasmáticas, além do colesterol que é uma das moléculas mais importantes na organização das membranas, como uma barreira física. O arranjo desses lipídios em solução aquosa, forma uma bicamada lipídica com um interior hidrofóbico e uma superfície hidrofílica em ambos os lados. O comprimento e o grau de insaturação dos ácidos graxos que compõem os glicero e esfingolipídios são os principais

determinantes da fluidez e compactação da bicamada lipídica, seguidos pelo teor de colesterol, interações entre as cabeças polares de lipídios e associação com proteínas específicas (Yeagle, 2012).

Em uma membrana plasmática, a curvatura intrínseca da bicamada é influenciada pelo empacotamento lipídico e pela curvatura lipídica das monocamadas. A curvatura em uma membrana biológica requer assimetria entre as monocamadas, que pode ser conferida por proteínas ou composição lipídica diferentes (Helfrich, 1973; Marsh, 1996; Goñi, 2014). A diferença entre as composições das monocamadas sugere uma curvatura neutra para a monocamada externa e uma curvatura negativa para a monocamada interna (Evans & Skalak, 1979; Nicolson, 2013). Zimmerberg e Gawrich (2006) ainda sugerem que os lipídios da monocamada interna possuem uma cabeça polar menor do que a área da cadeia acila, justificando a curvatura negativa desta monocamada.

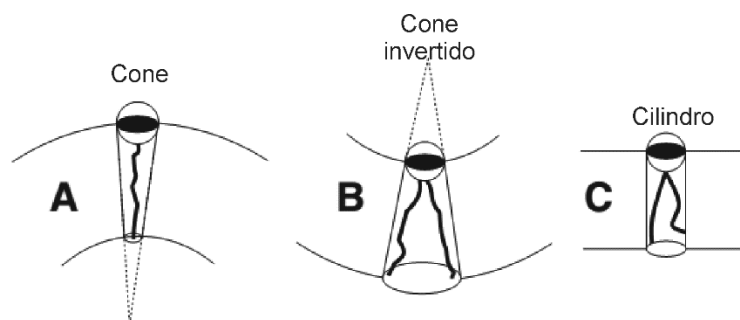


Figura 1. Esquema demonstrando a curvatura lipídica positiva (A), negativa (B) e neutra (C) em monocamadas lipídicas, dependente da geometria lipídica: cone, cone invertido ou cilindro. Adaptado de Goñi (2014).

Há mais de 4 décadas, Singer e Nicolson (1972) propuseram o “modelo do mosaico fluido” para explicar a estrutura da membrana plasmática. Neste clássico modelo os lipídios e a maioria das proteínas são livres para se difundirem lateralmente no plano da bicamada (movimento lateral), enquanto o movimento de translocação entre as monocamadas (*flip-flop*) é inexistente nas proteínas e menos frequente nos lipídios. De fato, o movimento dos lipídios entre as duas monocamadas pode ocorrer de forma ativa, através de enzimas translocases ATP-dependentes, conhecidas como flipases e flopases, ou por translocação espontânea dos lipídios de um lado para o outro da bicamada; entretanto, esse último processo é extremamente lento devido à alta barreira energética imposta pela resistência da passagem das cabeças polares através do interior hidrofóbico da bicamada e também pela resistência adicional imposta pelo aumento da tensão lateral desenvolvida quando lipídios em translação se inserem na outra monocamada (Sackmann, 1995; Devaux et al., 2008; Contreras et al., 2010).

As proteínas se associam à membrana através de diferentes tipos de interações (Nicolson, 2013). As proteínas íntegrais (proteínas transmembranares) atravessam a bicamada lipídica completamente. Em geral, essas proteínas apresentam domínios hidrofílicos (que interagem com as cabeças polares dos lipídios e o meio aquoso) e uma ou mais porções hidrofóbicas, que está associada ao core lipídico (Cortijo et al., 1982; Singer, 1990; Cramer et al., 1992). Proteínas hidrofílicas (periféricas) se associam à bicamada lipídica através de interações eletrostáticas e/ou por ligações de hidrogênio, ou através de ligações covalentes a lipídios (e.g. glicosilfosfatidilinositol) ou através de cadeias acilas (por exemplo, por palmitoilação) (Jacobson et al., 1987; Kusumi et al., 2011). Proteínas associadas à membrana pelo lado citoplasmático, juntamente com proteínas integrais, formam uma malha rígida, o citoesqueleto, que ajuda a manter a integridade, estabilidade e muitas funções da célula (Murador & Deffune, 2007; Chichili & Rodgers, 2009). No lado externo, as biomembranas contém uma matriz extracelular composta de proteínas e polissacarídeos (Nicolson, 2013).

1.2.Lipid rafts

Em sistemas modelo de membranas (lipossomas), o empacotamento lipídico diferencial tem sido caracterizado. Em membranas compostas por fosfolipídios puros, à temperaturas baixas (abaixo da temperatura de transição de fases principal, T_m), a bicamada se encontra na fase sólido-ordenada (S_o) ou fase gel, que possui um arranjo ordenado das cadeias acilas e mobilidade restrita dos lipídios. Acima da T_m a bicamada está na fase líquido-desordenada (L_d) ou fase-fluida, onde as cadeias acilas em conformação *trans-gauche* movimentam-se com alto coeficiente de difusão e alta amplitude de rotação ao redor destas ligações dentro do plano da bicamada, conferindo caráter fluido e desordenado à bicamada (Brown & London, 1998; van Meer et al., 2008) (Figura 2A). Nesta fase os termos sólido/líquido se referem ao empacotamento da cabeça lipídica e a mobilidade, enquanto os termos ordenado/desordenado se referem à ordem das cadeias acilas. A transição entre as fases é um fenômeno cooperativo, e a T_m é influenciada pelo comprimento e grau de insaturação da cadeia acila, sendo maior em bicamadas com lipídios de cadeias longas e saturadas. Quando a bicamada é formada por dois tipos de lipídios com diferentes T_m , a separação de fases pode ocorrer, e as fases S_o e L_d podem coexistir. Os lipídios com a T_m menor estarão na fase L_d , enquanto os lipídios com a T_m maior estarão na fase S_o .

O colesterol, devido a estrutura rígida de seu anel, impõe uma restrição à amplitude de movimento de cadeias hidrocarbônicas na fase L_d , diminuindo o número de configurações *trans-gauche* das ligações C-C das cadeias acilas, e aumentando as interações

van der Waals entre as cadeias acilas e a superfície planar da molécula de colesterol, o que leva a uma redução da área/lipídio e ao aumento do parâmetro de ordem molecular e espessura da bicamada (ca. 5 nm), (Chen et al., 2009). Por outro lado, a inclusão de colesterol na fase S_o prejudica o contato íntimo entre as cadeias adjacentes, levando a um aumento considerável na mobilidade lateral dos lipídios. Em porcentagens altas de colesterol, uma terceira fase pode ser formada (Figura 2B), com propriedades intermediárias entre a fase L_d e S_o . A fase líquida ordenada (L_o) é, então, caracterizada não somente pela limitada ordem das cadeias acilas, mas também pelo alto grau de difusão lateral pela bicamada, como ocorre na fase L_d (Ipsen et al., 1987; Veatch & Keller, 2005). Lipídios com cadeias longas e saturadas e esfingolipídios estão frequentemente associados ao colesterol, na fase L_o (van Meer et al., 2008).

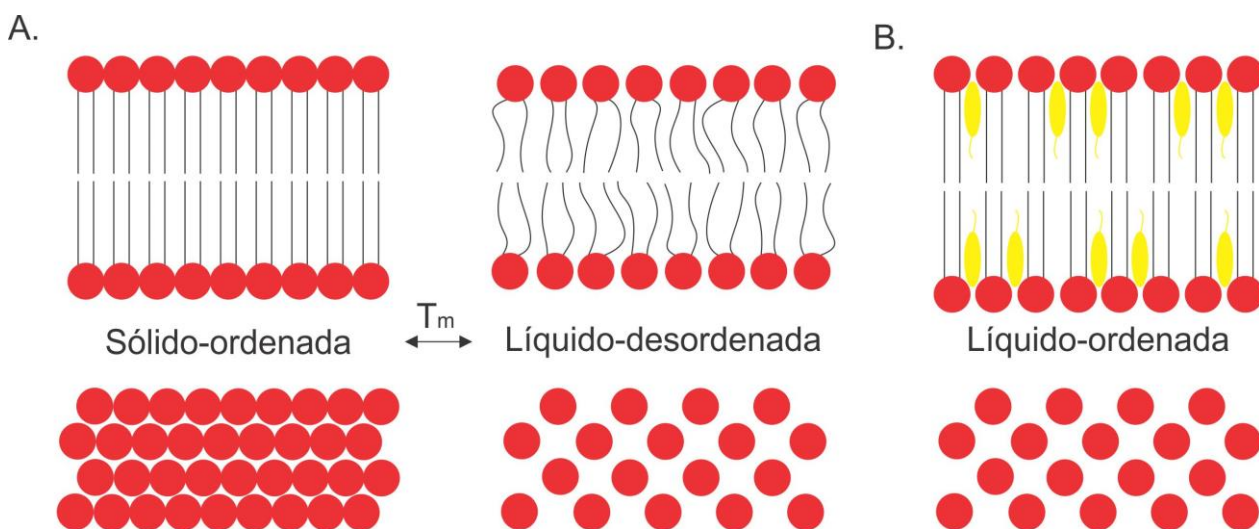


Figura 2. Representação de fases em bicamadas lipídicas: acima: vista lateral; abaixo, vista superior. A) preparadas a partir de um único lipídio na fase S_o e na fase L_d (acima da T_m do lipídio); B) formação da fase L_o , na presença de altas concentrações de colesterol. A bicamada é mais espessa na fase L_o do que na fase S_o e L_d . Adaptado de Ciana & cols. (2014).

De maneira geral, as membranas biológicas encontram-se na L_d . No entanto, pelo fato de possuírem colesterol (aproximadamente 40 mol%, em relação a concentração total de lipídios) e uma porção considerável de lipídios saturados como os esfingolipídios, acredita-se que existam domínios funcionais em membranas biológicas, denominados *lipid rafts*, que apresentam similaridades com a fase L_o (Brown, 2006b), observada em sistemas modelo.

O modelo de *lipid rafts*, descrito por Simons & Ikonen (1997), propõe que proteínas específicas, como por exemplo, proteínas ancoradas ao glicosilfosfatidilinositol (GPI) e proteínas transmembranares, tais como flotilina, caveolina, estomatina e aquaporina-1, particionem em domínios ricos em colesterol e esfingolipídios, das biomembranas. Atualmente, os *lipid rafts* são definidos como microdomínios existentes *in vivo*, altamente

dinâmicos e funcionais e que são constituídos por esfingolipídios, colesterol e proteínas específicas, que se associam e se dissociam na escala de segundos (Pike, 2009). Esses microdomínios se encontrariam em uma fase mais organizada, semelhante à fase L_o (Figura 3) (Quinn, 2010).

Apesar da dificuldade para observar os *lipid rafts in vivo* - devido a rápida dinâmica de formação e partição de proteínas específicas dentro desses domínios de membrana, e ao pequeno tamanho (10 a 200 nm) (Pike, 2006; Rajendran et al., 2010) - muitas evidências, embora indiretas, corroboram sua existência (Simons & Gerl, 2010). Nos últimos anos, diversos estudos funcionais demonstraram que o mecanismo de infecção de vários patógenos está relacionado com a formação de *lipid rafts*, tal que utilizam proteínas e lipídios constituintes dos *rafts* são utilizados para entrar na célula (Rajendran et al., 2010). Como exemplos do mecanismo de infecção estão o antígeno protetor (proteína da toxina causadora do antraz) que se liga a proteínas ancoradas ao GPI para entrar na célula e a toxina da cólera que utiliza os gangliosídeos (Gruenberg & van der Goot, 2006). Outro exemplo seriam os receptores CD4 e quimionas (envolvidos na entrada do vírus HIV na célula hospedeira) que se encontram particionados em *lipid rafts* (Popik et al., 2002). Os *rafts* também estão presentes em membranas de fungos como exemplo *Histoplasma capsulatum* e *Paracoccidioides brasiliensis* (Maza et al., 2008; Ywazaki et al., 2011; Tagliari et al., 2012) e em protozoários como os da espécie *Leishmania* (Tanaka et al., 2007) e *Trypanosoma cruzi* (Takahashi et al., 2009). Dessa forma, as propriedades funcionais dos domínios de membranas envolvidos na viabilidade celular e nas patologias, justificam a importância de compreender a estrutura detalhada das membranas e os mecanismos de formação dos domínios.

Uma forma de estudar a existência e função desses microdomínios é através de métodos bioquímicos e técnicas indiretas, tais como a extração de frações de membranas resistentes a detergente (*detergent resistant membranes*; DRMs) à baixa temperatura (Schuck et al., 2003; Pike et al., 2005; Ingelmo-Torres et al., 2009). Essa estratégia é comumente combinada com o uso de metil- β -ciclodextrina (M β CD), capaz de extrair parcialmente o colesterol das membranas celulares. O fato de proteínas encontradas nas DRMs serem solubilizadas após tratamento com M β CD, indica sua associação com *lipid rafts* e sugere que a funcionalidade dessas proteínas *in vivo* dependeria da presença desses domínios enriquecidos de colesterol (Simons & Gerl, 2010).

1.3. Membranas resistentes a detergentes

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

Diferentes tipos de detergentes não iônicos tem sido utilizados para preparação de DRMs, no entanto o conteúdo lipídico e proteico dessas frações é bastante heterogêneo,

sugerindo uma solubilização diferencial entre os agentes tensoativos. Triton X-100 ou TX-100 é um clássico detergente utilizado para estudos de DRMs preparadas a 4 °C (Delaunay et al., 2008b; Kamata et al., 2008; Crepaldi Domingues et al., 2009; Domingues et al., 2010). O detergente Brij 98 é frequentemente usado em preparações de DRMs à 37 °C, à partir de diferentes tipos celulares (Drevot et al., 2002; Schuck et al., 2003; Gil et al., 2006; Lenne et al., 2006; Casadei et al., 2014a).

Existem várias críticas quanto ao uso de DRMs como modelo de estudo de *lipid rafts*, sendo que a principal está relacionada ao emprego de detergentes para induzir a separação de fases, pois o tensoativo *per se*, ao se inserir na membrana, poderia provocar a reorganização dos componentes podendo induzir aglomerados de lipídios específicos. Segundo Heerklotz (2002), o detergente usado para obtenção de DRMs poderia criar domínios e causar a mistura e retenção de proteínas e lipídios, independentemente da sua afinidade por ambientes ordenados. No entanto, estudos com membranas modelo demonstraram que a detecção de domínios na fase L_o após tratamento de determinadas misturas de lipídios ricas em colesterol com TX-100 somente é possível quando essas misturas já apresentavam domínios na fase L_o , antes da ação do detergente (Ahmed et al., 1997). Além disso, o tratamento de bicamadas lipídicas compostas de fosfolipídios, colesterol e esfingomielina, contendo domínios nas fases L_d e L_o , com TX-100 resultou na solubilização seletiva dos domínios na fase L_d e relativa preservação dos domínios na fase L_o (Dietrich et al., 2001; Ahyayauch et al., 2009).

Outra crítica apontada é em relação as temperaturas de obtenção das DRMs. A temperatura é conhecida por ser o maior fator na dinâmica de lipídios e temperaturas baixas são conhecidas por provocar associações lipídio-lipídio e lipídio-proteína, que não ocorreriam *in vivo*, em temperaturas maiores. Diversos exemplos na literatura descrevem que as frações obtidas à 4 °C seriam solubilizadas a 37 °C (Sot et al., 2006). Outros estudos revelaram ainda que a separação das fases L_d e L_o pode ocorrer à 37°C, em misturas lipídicas biomiméticas de colesterol, fosfolipídios insaturados e esfingolipídios, de modo que a separação de fases seria plausível de ocorrer também em membranas biológicas (Silvius, 2003). Juntamente, esses resultados sugerem que DRMs isoladas de membranas biológicas poderiam, também, ser formadas a partir de domínios (*rafts*) pré-existentes (Brown, 2006a). Além disso, a presença de proteínas em DRMs sugere que as mesmas encontram-se concentradas em microdomínios naturais nas membranas biológicas, conferindo um importante papel funcional aos *rafts* (Brown, 2006a).

Considerando-se, então, as definições para *lipid rafts* e as limitações existentes nas metodologias empregadas para seu isolamento e identificação, é evidente a dificuldade de estabelecer uma correlação entre os microdomínios isolados por DRMs e *lipid rafts*, explicando assim o motivo pelo qual aspectos bioquímicos e biofísicos destes microdomínios tem sido alvo de tantos debates na literatura. Mikhalyov e Samsonoy (2011), utilizando fluorimetria e microscopia de fluorescência, detectaram *lipid rafts* em membranas de eritrócitos, em temperatura fisiológica. Eles demonstraram que domínios da membrana eritrocitária íntegra ocorrem tanto a 4 °C quanto à 23 °C e 37 °C, embora os microdomínios sejam menos evidentes nas temperaturas maiores. Raghupathy & cols. (2015) demonstraram que lipídios com cadeias longas saturadas inseridos na fase L_o são necessários, ou na monocamada externa ou interna, para estabilizar os microdomínios, e ainda que aglomerados de filamentos de actina juntamente com a fosfatidilserina (PS) da monocamada interna, podem estabilizar esses domínios. Por outro lado, Sevcsik & cols. (2015), demonstraram *in vivo*, em células de câncer de bexiga T24 e através de *single-molecule microscopy*, que proteínas ancoradas ao GPI não estariam associadas à fase L_o.

1.4. Eritrócitos

O eritrócito é um bom modelo para o estudo de membrana celular porque ele é uma célula de fácil obtenção, em grande quantidade, que não contém núcleo nem organelas internas e na qual a desestabilização da estrutura da membrana é facilmente monitorada pela liberação da hemoglobina intracelular (Malheiros et al., 2000; Malheiros et al., 2004; Domingues et al., 2008; Preté et al., 2011). Por todas essas características, o eritrócito tem sido extensivamente estudado e é uma das células mais bem conhecidas em termos de estrutura, função e genética.

Eritrócitos humanos são células bicôncavas discóides com diâmetro de aproximadamente 8 µm, área de superfície de cerca de 140 µm² e um volume de 100 µm³. O excesso da área de superfície do eritrócito, juntamente com a elasticidade de sua membrana, conferem a flexibilidade necessária para essas células sanguíneas passarem pelos capilares sinusóides, de dimensões inferiores a delas (Chasis & Shohet, 1987; Maier et al., 2009), com um tempo de vida médio de 120 dias na circulação sanguínea. Essas propriedades dinâmicas da membrana do eritrócito se devem à existência de sua rede proteica submembranar, o citoesqueleto (Maier et al., 2009).

A membrana eritrocitária é constituída de uma bicamada lipídica que contém várias proteínas íntegrais, uma rede proteica (citoesqueleto) e uma pequena porção de

carboidratos ligados às proteínas e aos lipídios. Os fosfolipídios compõem a principal classe de lipídios da membrana eritrocitária (Storch & Kleinfeld, 1985) e se arranjam assimetricamente pela bicamada lipídica. PS e fosfatidiletanolamina (PE) se situam preferencialmente na monocamada interna, enquanto fosfatidilcolina (PC) e esfingomieline (SM) localizam-se, preferencialmente, na monocamada externa (Connor et al., 1990; Daleke, 2008); o colesterol está presente nas duas monocamadas. A manutenção da assimetria lipídica é um processo importante para uma variedade de processos celulares (An et al., 2004; Pomorski & Menon, 2006); por exemplo, a exposição de PS na superfície celular é observada em células expostas a estresse oxidativo, processos infecciosos e apoptose celular (Alaarg et al., 2013).

As proteínas da membrana eritrocitária também são bastante abundantes, sendo a relação em massa, colesterol:proteína, de cerca de 0,3 (Cooper, 1997; Casadei et al., 2014a). As proteínas integrais interagem com os lipídios da membrana através de suas porções hidrofóbicas, que atravessam a bicamada lipídica. Entre as proteínas integrais do eritrócito se destacam: a banda 3 (proteína transportadora de ânions) e as glicoforinas, que são receptores de membrana e antígenos e que participam do reconhecimento célula-célula, na face externa da membrana. Já as proteínas periféricas (principalmente espectrina, actina, proteína 4.1 e 4.9) formam o citoesqueleto eritrocitário, um extenso retículo submembranar (que contém cerca de 60% da massa proteica desta) e é responsável pela forma bicôncava do eritrócito e pela organização dos componentes da membrana, (Murador & Deffune, 2007), pela durabilidade e pela deformabilidade da célula, sem fragmentação (Maier et al., 2009). As proteínas que compõem o citoesqueleto interagem entre si e com certas proteínas integrais da membrana do eritrócito (Figura 4).

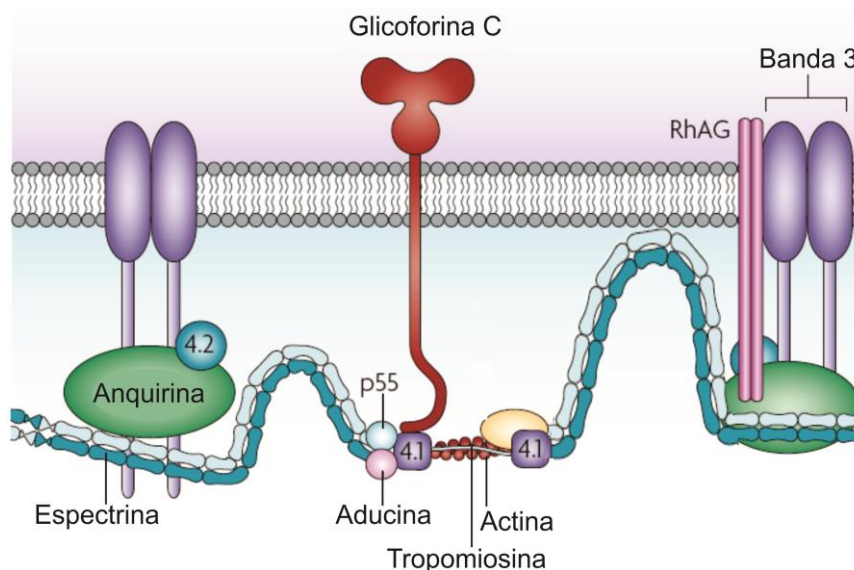


Figura 4. Representação do citoesqueleto de eritrócitos e sua interação com a bicamada lipídica. Esquema adaptado de Maier & cols. (2009).

DRMs de eritrócitos

Nas últimas duas décadas, DRMs de eritrócitos foram isoladas e caracterizadas (Salzer & Prohaska, 2001; Samuel et al., 2001; Murphy et al., 2004; Ciana et al., 2005; Rodi et al., 2006; Kamata et al., 2008; Crepaldi Domingues et al., 2009; Domingues et al., 2010; Mrówczyńska et al., 2010; Casadei et al., 2014a). As DRMs de membrana eritrocitária isoladas a partir de TX-100, C₁₂E₈, Brij 58 e Brij 98, tanto à 4 quanto à 37 °C apresentam densidade entre 1,14-1,2 g/cm³ e as proteínas flotilina-1, flotilina-2, estomatina, GSα, proteínas ligadas a proteína G inibitória, além do gangliosídeo GM1 têm sido usados como marcadores proteicos em DRMs de eritrócitos (Salzer & Prohaska, 2001; Ciana et al., 2005; Kamata et al., 2008; Ciana et al., 2011).

Recentemente, nós demonstramos que DRMs obtidas a partir de TX-100, Brij 58 e Brij 98 são enriquecidas em colesterol e fosfolipídios com ácidos graxos de cadeia saturada (em especial ácido lignocérico das esfingomielinas), características consistentes com *lipid rafts* (Casadei et al., 2014a). No entanto, DRMs de TX-100 apresentam maior proporção de SM/glicerofosfolipídios que as frações obtidas com os Brij, além de menor proporção de PE, um lipídio preferencial da monocamada interna da membrana de eritrócitos. Em relação à solubilização proteica, a membrana do eritrócito é mais resistente ao tratamento com Brij 98 do que aos outros dois detergentes (Brij 58 e TX-100). Resultados de ressonância paramagnética eletrônica (RPE), com uso de marcadores de spin do tipo doxil-estearato não acusaram variação significativa no grau de empacotamento dos lipídios nas bicamadas de DRMs de Brij 98 e Brij 58, em relação à membrana eritrocitária, diferentemente do observado

em DRMs de TX-100 e do que seria esperado para domínios lipídicos na fase L_o (Casadei et al., 2014a).

Considerando a associação de processos patológicos e *lipid rafts*, estudos têm demonstrado que os *lipid rafts* da membrana eritrocitária podem estar envolvidos com o processo de invasão celular pelo parasita causador da malária, *Plasmodium falciparum* (Samuel et al., 2001; Murphy et al., 2004; Murphy et al., 2007). Samuel & cols. (2001) demonstraram que o tratamento das membranas dos eritrócitos com M β CD inibe a infecção pelo parasita enquanto a ausência de proteínas ancoradas por GPI não afeta a mesma, concluindo que a infecção pelo plasmodium é mais dependente da fase lipídica do que de proteínas específicas do *lipid rafts*.

1.5. Sinaptossomas

O termo sinaptossoma foi primeiramente mencionado por Hebb e Whittaker (1958). Sinaptossomas são membranas pré-sinápticas resseladas, geradas por fracionamento sub-celular do tecido nervoso. Eles são formados, principalmente, pelos terminais neurônicos e seu conteúdo, incluindo mitocôndria, citoesqueleto, vesículas sinápticas (exceto material genético) e todas as proteínas e enzimas funcionais normalmente presentes nesses terminais. Desta forma os sinaptossomas mimetizam as funções que ocorrem *in vivo*: eles podem produzir ATP; sua membrana contém canais iônicos, receptores e transportadores funcionais que permitem a manutenção do potencial de membrana e a homeostase iônica; são capazes de liberar neurotransmissores e a membrana pode ser reciclada, por endocitose (Dunkley et al., 2008). Além disso, os sinaptossomas são utilizados para estudar doenças neurodegenerativas tais como Alzheimer (Sokolow et al., 2015), Parkinson (Harish et al., 2013) e Huntington (Valencia et al., 2013). Apesar destas aplicações, ainda faltam estudos que avaliem a composição, a separação de fases e a estrutura da bicamada lipídica dos sinaptossomas.

O colesterol é um importante componente dos terminais sinápticos, estando envolvido na formação e manutenção das sinapses e atuando em eventos específicos tais como processos de fusão entre as vesículas sinápticas e a membrana pré-sináptica. O colesterol estimula a atividade da bomba de Na⁺ e Ca⁺² (Vemuri & Philipson, 1989), o transporte de glutamato (Shouffani & Kanner, 1990), modula o transporte de serotonina (Saito & Silbert, 1979) e é requerido para a atividade do receptor de acetilcolina (Criado et al., 1982). A diminuição da quantidade de colesterol em sinaptossomas altera as funções dos *lipid rafts*, o que por sua vez, altera o transporte de íons de cálcio dos canais de Ca⁺⁺ voltagem-

dependente, processo envolvido na liberação de neurotransmissores químicos (Gil et al., 2005).

Diversos estudos demonstraram que os domínios de membranas estão envolvidos com o processo de sinapse: regulação, aglomeração dos receptores e liberação de neurotransmissores nos terminais sinápticos (Núñez et al., 2008; Cole et al., 2010). Membranas sinaptossomais resistentes à detergentes ou à sonicação têm sido descritas na última década (Eckert et al., 2003; Gil et al., 2005; Gil et al., 2006; Núñez et al., 2008; Cole et al., 2010; Head et al., 2010; Gil et al., 2011; Rodríguez-Asiain et al., 2011), a partir de cérebro de rato, porém esses trabalhos não levam em consideração a composição lipídica da membrana sinaptossomal e/ou de suas frações (DRMs ou frações resistentes à sonicação).

Assim, devido à relevância dos terminais sinápticos no entendimento de fenômenos de membrana, neste estudo propusemo-nos preparar e caracterizar, pela primeira vez, membranas sinaptossomais isoladas do córtex cerebral de suínos e isolar suas frações resistentes (DRMs) aos detergentes TX-100 e Brij 98.

1.6. Detergentes e solubilização de membranas

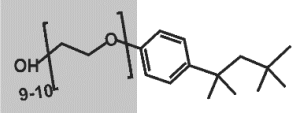
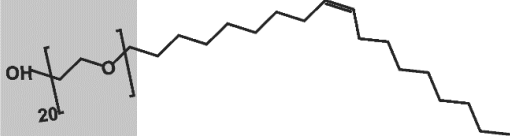
Detergentes ou surfatantes são moléculas anfifílicas, com uma porção hidrofóbica e uma porção hidrofílica. Assim como os lipídios, na presença de água os detergentes possuem a capacidade de se agregar, mostrando sua porção hidrofóbica para a fase apolar, enquanto expõem sua porção polar para o meio aquoso (Heerklotz, 2008). Moléculas com propriedades tensoativas incluem os detergentes sintéticos e compostos fisiológicos tais como sais biliares, lisofosfolipídios, alguns peptídeos e outros compostos anfifílicos (Heerklotz, 2008).

De acordo com a natureza do grupamento hidrofílico dos detergentes, eles podem ser classificados como não-iônicos e iônicos (catiônicos, aniônicos ou zwitteriônicos). Os detergentes não-iônicos TX-100 e Brij 98, apresentam uma cauda hidrofóbica, consistindo de uma cadeia hidrocarbonada, e uma cabeça hidrofílica consistindo de várias unidades de grupos polioxietileno (Tabela 1). No caso do TX-100, um anel benzênico une as porções hidrofóbica e hidrofílica da molécula.

Os grupos polares dos detergentes não iônicos, em solução aquosa, formam pontes de hidrogênio com moléculas de água, enquanto sua fração apolar se agrega devido a interações hidrofóbicas. Essa propriedade permite que o detergente seja solúvel em água formando agregados esféricos organizados, cilíndricos ou discóides, chamados de micelas. A natureza anfifílica dos detergentes não-iônicos pode ser expressa em termos do balanço entre

as frações hidrofílica e hidrofóbica da molécula (HLB). De acordo com a escala empírica proposta por Griffin (1949), quanto menor o valor de HLB mais lipofílico é o composto e quanto maior o número, mais hidrofílico. O valor de HLB é calculado a partir da razão molar entre a porção hidrofílica e lipofílica da molécula x 20 (levando a uma escala de valores de 0 a 20).

Tabela 1. Estrutura química e algumas propriedades físico-químicas dos detergentes TX-100 e Brij 98 (MM=massa molar; CMC=concentração micelar crítica; HLB=balanço hidrofílico-lipofílico). A fração hidrofílica dos detergentes esta assinalada em cinza.

DETERGENTE	MM	CMC (mM)	HLB ^b	ESTRUTURA QUÍMICA
TX-100 (polioxietileno glicol terc-otilfenil éter)	625	0,27^a	13.5	
Brij 98 (polioxietileno 20-oleil éter)	1150	0,025^b	15.3	

^aSudbrack & cols. (2011); ^bHait e Moulik (2001).

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

Devido a essas propriedades, os detergentes são capazes de interagir com membranas, modificar suas propriedades e solubilizá-las. O processo de solubilização pode ser descrito em três estágios, conforme a razão molar detergente/lipídio aumenta (Lichtenberg, 1985). No estágio I, as moléculas de detergente se inserem na bicamada, porém não alteram a integridade da membrana. No estágio II, é alcançado o limite de saturação e o processo de solubilização se inicia. Nessa fase, micelas coexistem com a bicamada. Aumentando a concentração do detergente, todos os lipídios e proteínas encontram-se solubilizados em micelas mistas (estágio III). As propriedades dos lipídios e dos detergentes envolvidos, bem como a fase e a composição da membrana, influenciam o processo de solubilização (Silvius, 2013).

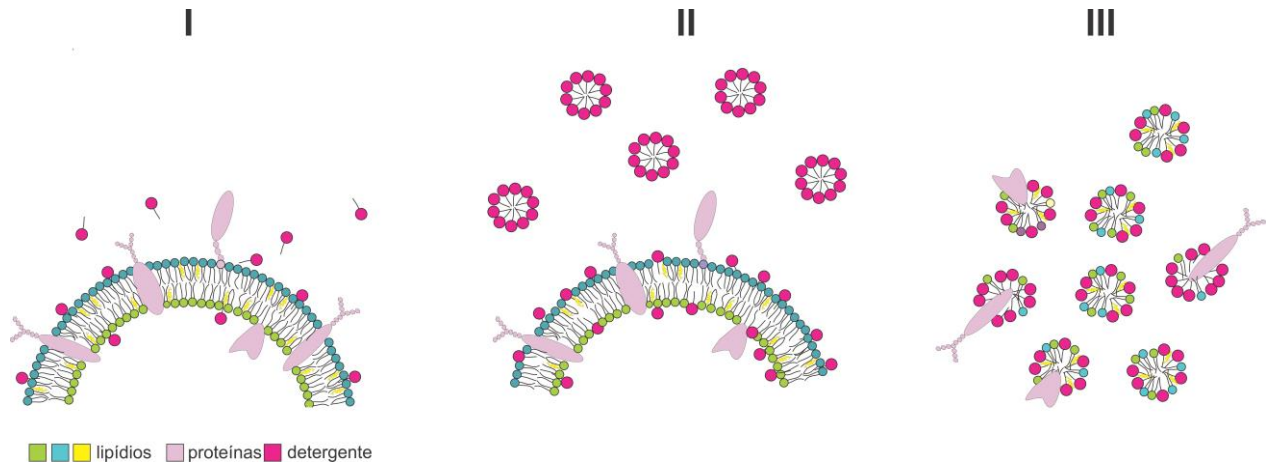


Figura 5. Esquema de possíveis eventos envolvidos na interação de detergente com membranas biológicas. Os processos correspondem aos três principais estágios na solubilização: I - ligação do detergente à membrana; II - equilíbrio do detergente entre micela pura e membrana e início da solubilização. III - Após a saturação da membrana, moléculas do detergente saem da membrana carregando componentes da membrana (lipídios e proteínas).

2. Objetivos

Neste trabalho estudamos o mecanismo de solubilização de membranas biológicas por ação de detergentes não iônicos e a obtenção de DRMs (frações de membrana resistentes à detergente), a fim de avançar os estudos sobre os mecanismos determinantes da associação entre os componentes das membranas biológicas, que levam a separação lateral de fases. Pretendemos assim, elucidar detalhes da interação entre detergentes e componentes de membranas biológicas, de forma a contribuir com os avanços nas pesquisas sobre *lipid rafts* e DRMs.

2.1. Parte 1: Estudo da interação entre detergente e lipídios de membranas eritrocitárias

O objetivo desta etapa foi avaliar o mecanismo de ação dos detergentes TX-100 e Brij 98, na solubilização de membranas eritrocitárias de humanos.

Objetivos específicos:

- Testar a incorporação (medidas da constante de associação e cinética) dos detergentes TX-100 e Brij 98 em monocamadas de lipídios de membranas eritrocitárias;
- Testar o processo de solubilização dos detergentes TX-100 e Brij 98 sobre vesículas gigantes, GUVs preparadas com lipídios extraídos de eritrócitos, avaliando a solubilização parcial e a separação lateral de fases dos lipídios.

2.2. Parte 2. Caracterização de membranas sinaptossomais resistentes a detergentes

Nesta etapa o objetivo foi caracterizar frações de membranas sinaptossomais resistentes aos detergentes TX-100 e Brij 98, e avaliar o efeito do detergente e sua relação com os *lipids rafts* em sinaptossomas de córtex cerebral suíno.

Objetivos específicos:

- Comparar a capacidade de diferentes ciclodextrinas, na extração de colesterol das membranas sinaptossomais de córtex cerebral suíno;
- Preparar DRMs das membranas sinaptossomais de cérebro suíno, por ação do TX-100 e Brij 98;

- Determinar a composição lipídica (glicerofosfolipídios, esfingolipídios e colesterol) e proteica (proteínas totais e SDS-page) das frações de membranas (DRMs) sinaptossomais isoladas após tratamento com TX-100 e Brij 98;
- Determinar a morfologia e tamanho das frações (DRMs) dos sinaptossomas de cérebro porcino preparadas;
- Verificar a presença do citoesqueleto e do marcador de *lipid rafts* flotilina, nos DRMs dos sinaptossomas preparados;
- Determinar a fluidez da membrana de sinaptossoma e suas DRMs, através de ressonância paramagnética eletrônica.

3. Materiais e Métodos

Para alcançar o objetivo, o trabalho foi dividido em duas etapas (Figura 6). Na primeira parte, referente à interação entre detergentes e membrana eritrocitária, as metodologias utilizadas foram a construção de isothermas em monocamadas de Langmuir e medidas de microscopia com vesículas unilamelares gigantes (GUVs). Na segunda parte, referente aos estudos com membranas sinaptossomais de cérebro de porco resistentes a detergentes (DRMs), as metodologias utilizadas foram: quantificação de colesterol, fosfato, proteínas totais e esfingomielina, eletroforese SDS-page, *western blot* (W. blot), cromatografia em camada delgada de alta eficiência (HPTLC), microscopia eletrônica de transmissão (MET), *dynamic light scattering* (DLS) e ressonância paramagnética eletrônica (RPE). Os detergentes utilizados foram o TX-100 e Brij 98. Alguns experimentos foram realizados com a membrana biológica intacta ou com a membrana com conteúdo reduzido de colesterol, retirado com uso de metil- β -ciclodextrina (M β CD) ou outra ciclodextrina, especificada.

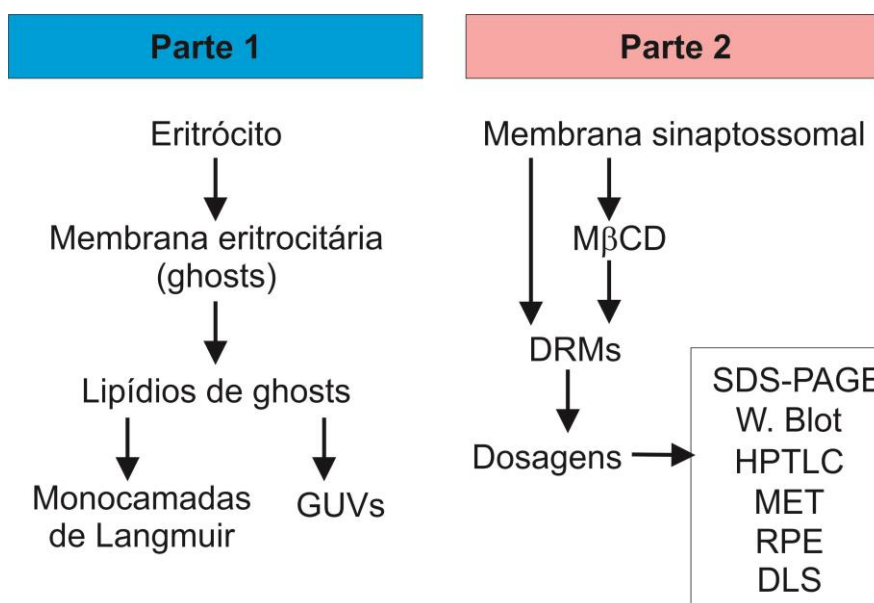


Figura 6. Esquema simplificado das principais etapas metodológicas desenvolvidas na tese.

3.1. Materiais

- 5- e 16- doxil ácido esteárico (Sigma Aldrich[®])
- Anticorpo anti-mouse (Rheabiotech)
- Anticorpo monoclonal anti-flotilina e anti-SNAP 25 (BD Biosciences[®])
- Brij 98 (Sigma Aldrich[®])
- Ciclodextrinas (Sigma Aldrich[®])

- Clorofórmio, metanol, ácido acético e sais para preparo de tampão (grau espectroscópico analítico)
- Glicose e sacarose (Sigma Aldrich[®])
- Lipídios: fosfolipídios de ovo (esfingomielina, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol e fosfatidilserina), palmitoil-oleil-fosfatidilcolina e colesterol (Avanti Polar Lipids)
- Placas de cromatografia em camada delgada de alta resolução, HPTLC (J.T. Baker[®])
- Rh-DPPE (di-palmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-(lisamina rodamina B sulfonil cloreto), (Avanti Polar Lipids)
- TX-100 (Sigma Aldrich[®])

3.2. Equipamentos

- Agitador de tubos (Phoenix[®] AP56)
- Banho – aquecimento e resfriamento (Quimis[®])
- Banho de ultrassom (Thornton T14[®])
- Centrífuga (MC 12 V, Thermo Scientific Sorval[®])
- Centrifuga tubos falcon (Quimis[®])
- Equipamento de monocamada (Minitrough[®], KSV)
- Espectrofotômetro (Varian[®], Modelo Cary 5)
- Espectrômetro de RPE (Bruker[®] BVT-2000)
- Medidor de pH/Ions, modelo 300M (Analyser[®] Instrumentação Analítica)
- Mini-Protean[®] Tetra Cell (Biorad[®])
- Microscópio eletrônico de transmissão (Zeiss[®], LEO 906)
- Microscópio ótico (Zeiss[®], Axiovert 200)
- Ultracentrífuga (Optima L series, Beckman Coulter[®])
- Ultra-Turrax (Ultra-turrax[®] T18)
- Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments[®])

3.3. Parte 1. Interação entre detergentes e lipídios de membranas eritrocitárias

3.3.1. Preparo das membranas eritrocitárias e *ghosts*

Neste trabalho utilizamos eritrócitos obtidos de sangue humano provenientes do Hemocentro da UNICAMP a partir de bolsas de concentrado de hemácias com até 7 dias de coleta e testes de sorologia negativa para chagas, sífilis, HIV, HBV e HCV.

Os eritrócitos foram ressuspensos em tampão fosfato (4 mM Na₂HPO₄, 1 mM NaH₂PO₄, 154 mM NaCl, 4,5 mM KCl, pH 7,4) e centrifugados por 5 min a 1000 x g. Em seguida, a suspensão foi filtrada em α -celulose/celulose microcristalina para isolar os eritrócitos das plaquetas e leucócitos (Beutler et al., 1976). A suspensão de eritrócitos purificada foi lavada por 3 vezes com tampão Tris-NaCl (25 mM de Tris e 150 mM de NaCl, pH 7,4).

Para obtenção de *ghosts* (membrana plasmática isolada do conteúdo intracelular), os eritrócitos purificados foram diluídos 1:10 v:v em tampão fosfato hipotônico (4 mM Na₂HPO₄, 1 mM NaH₂PO₄, 0,5 mM EDTA, contendo 1 mM de inibidor de protease fenilmetilsulfonilflúor, pH 8,0) à 4 °C, e centrifugados por 20 min a 26000 x g. O sobrenadante foi aspirado e a lavagem foi repetida por, pelo menos, mais 4 vezes com o mesmo procedimento, de acordo com Dodge & cols. (1963), resultando em amostras de membranas livres de hemoglobina. Após o isolamento das membranas, a amostra foi lavada com tampão fosfato por 2 ou 3 vezes e o conteúdo de proteínas foi determinado (item 3.4.4). As amostras de *ghosts* foram utilizadas imediatamente ou congeladas a -80 °C, para uso futuro.

3.3.2. Extração de lipídios

A extração dos lipídios das membranas foi realizada através do método de Folch & cols. (1957)(1957)(1957)(1957)(1957)(1957)(1957). As membranas foram homogeneizadas com uma mistura 8:4:3 de clorofórmio:metanol: amostra (v/v/v) por 1 hora, e depois centrifugadas à 2000 g /5min à temperatura ambiente (aproximadamente 23 °C). As fases foram separadas e o mesmo procedimento foi repetido por mais duas vezes com as duas fases. Ao final, a fase inferior, enriquecida com a maioria dos lipídios (mais de 98%), foi coletada e o clorofórmio evaporado, sob vácuo. Os lipídios mais polares, gangliosídeos e fosfoinositídeos, presentes na fase superior, não aparecem na fase inferior purificada.

3.3.3. Monocamadas de Langmuir

Monocamadas lipídicas são preparadas em um aparato conhecido como cuba de Langmuir (Figura 6**Error! Reference source not found.**). Este equipamento consiste em uma

cuba, que contém uma solução aquosa (subfase) sobre a qual se organiza a monocamada, e um par de barreiras móveis que, ao se movimentarem sobre a cuba, modificam a área em que a monocamada está confinada. Um papel de filtro é o sensor que transmite a força que exerce a tensão de superfície sobre seu contorno à uma balança. A diferença entre a tensão superficial da água (γ_w) e a de qualquer interface (γ) é equivalente à pressão de superfície (π).

A ausência de impurezas na subfase e no solvente foi checada rotineiramente, para que não houvesse aumento de pressão superficial, ao comprimir. As monocamadas foram preparadas espalhando-se os lipídios extraídos de *ghosts* em solução de clorofórmio e se esperou por 5-15 minutos para assegurar a completa evaporação do solvente, antes de iniciar a compressão. Procuramos partir de monocamadas em estado expandido ou, eventualmente, com pressões nunca superiores a $0,6 \text{ mN m}^{-1}$. A subfase foi preparada com água milli-Q. A pressão superficial (π) e a área molecular ($\text{\AA}^2$) foram monitoradas constantemente com o Minitrout, KSV à temperatura ambiente (23°C). Estes resultados foram conduzidos na Universidade de Córdoba, Argentina, em colaboração com a Dra. Maria Angélica Perillo.

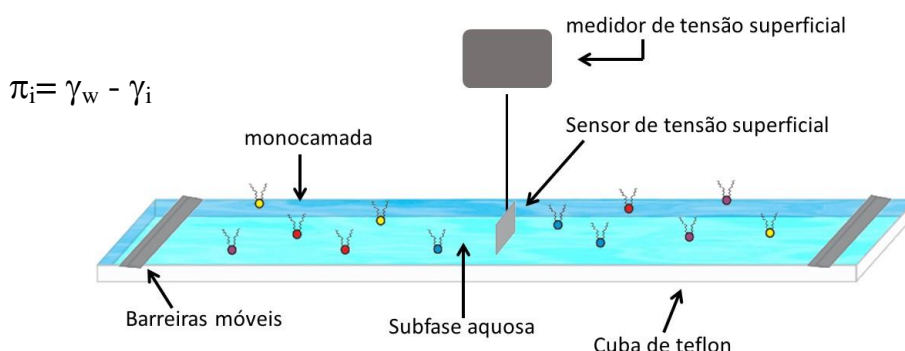


Figura 7. Desenho esquemático da cuba de Langmuir, com moléculas anfífilas na superfície ar-água formando uma monocamada.

Experimentos de penetração do TX-100 e Brij 98 em monocamadas de lipídios de *ghosts* foram realizados com área de superfície constante e à diferentes pressões iniciais (π_i). TX-100 e Brij 98 foram injetados na subfase. Os valores de π foram registradas em função do tempo até atingir um plateau ($\pi_{\max}$). Os valores de $\Delta\pi$ ($\Delta\pi = \pi_{\max} - \pi_i$), foram graficados contra os π_i . A intersecção da linha, no eixo das abscissas, possibilitou determinar o máximo valor de π para penetração do detergente ($\pi_{\text{cut-off}}$).

A cinética de incorporação dos detergentes nas monocamadas de lipídios de *ghosts* foi analisada pela mudança de pressão (π) versus o tempo. Esse experimento foi realizado com uma pressão inicial de aproximadamente 35 mN/m (selecionado pela sua proximidade com a pressão de equilíbrio das bicamadas lipídicas), variando-se a concentração

de detergente (TX-100 ou Brij 98), próximo à CMC. As constantes de velocidade de adsorção (K_a), desorção (K_d) e ligação (K_b) foram determinadas (de Matos Alves Pinto et al., 2006). Para isso, as variações de preeção, considerando $\Delta\pi_t$ ($\pi_t - 35$ mN/m) *versus* o t (tempo após injeção do detergente), foram analisadas de acordo com a seguinte equação (1):

$$\Delta\pi_t \cong [1 - \exp(-t/\tau)] \quad (1)$$

onde $\Delta\pi_t$ pode ser determinado para cada concentração de detergente na subfase aquosa. Desta forma, k_a e k_d foram calculadas a partir da equação (2):

$$1/\tau = 1/k_d + k_a [\text{detergente}] \quad (2)$$

E, finalmente, o K_b foi obtido de equação (3):

$$K_b = k_a/k_b \quad (3)$$

3.3.4. Vesículas Unilamelares Gigantes (GUVs)

Preparo das vesículas unilamelares gigantes (GUVs)

As GUVs de lipídios de *ghosts*, POPC ou POPC:SM:Col, foram preparadas por eletroformação (Angelova & Dimitrov, 1986). Uma alíquota de amostra de lipídios (16 μ L de uma solução a 2,5 mM de lipídios) diluídos em clorofórmio foi depositada em duas placas de vidro condutor (recobertos por uma camada de FTO – óxido de estanho dopado com flúor). As placas de vidro foram seladas com um espaçador de teflon entre elas; foi adicionada uma solução de 0,2 M de sacarose e aplicado um campo elétrico de amplitude de 1 V e frequência de 10 Hz por cerca de 1 hora. As vesículas de lipídios de *ghosts* e as de POPC:SM:Col foram crescidas a 50 °C, as vesículas de POPC foram crescidas à temperatura ambiente (23 °C). Finalmente, as GUVs foram diluídas 10 vezes em uma solução isosmótica de glicose, a fim de aumentar o contraste ótico das vesículas, durante a microscopia. Para visualizar o comportamento de fases foi adicionado 1 mol% de marcador Rh-DPPE, juntamente com os lipídios em clorofórmio.

Microscopia ótica das GUVs

A observação das GUVs foi feita no microscópio Zeiss Axiovert 200, do Laboratório de Biomembranas – Unifesp em colaboração com a Dra. Karin do Amaral Riske), com objetivas de 10x, 20x, 40x e 63x. As GUVs foram observadas por contraste de fase ou por microscopia de fluorescência. Para medidas por microscopia de fluorescência a iluminação foi feita com uma lâmpada de mercúrio HBO 103W e um conjunto de filtros excitação em 540-552 nm e emissão em 575-640 nm. As imagens foram captadas por uma câmera digital Zeiss AxioCam HSm controlada pelo software Zeiss AxioVision. As vesículas foram visualizadas por contraste de fase ou fluorescência, à temperatura ambiente (23 °C) ou a 37 °C.

A adição de detergentes nas GUVs, observada por microscopia ótica, foi feita por injeção de TX-100 e Brij 98 através de micropipetas de vidro com pontas de diâmetro da ordem de 10µm. As micropipetas foram manipuladas e o fluxo foi controlado para visualização das modificações membranares. Para controle do efeito de concentração do detergente nas GUVs, foi realizado experimento de diluição (adição de GUVs em uma solução de detergente com concentração conhecida) (Sudbrack et al., 2011).

3.4. Parte 2. Membranas sinaptossomais resistentes à detergentes

3.4.1. Preparo das membranas sinaptossomais

Os cérebros suínos (*Sus scrofa*) frescos foram obtidos do Frigar Abatedouro Ind. e Com. de Conservas LTDA-ME, CNPJ nº 02.522.030/0001-93, registrado no Serviço de Inspeção de Produtos de Origem Animal do Estado de São Paulo (SISP) sob o nº 1015. A utilização de suínos oferece muitas vantagens em comparação com outros animais, como ratos e camundongos, pois partilham semelhanças elevadas com os seres humanos, tanto genética, anatômica, quanto fisiologicamente (Chen et al., 2007).

Para obtenção dos sinaptossomas a partir de córtex cerebral de suínos, todo o processo foi realizado a 4° C. Os cérebros foram limpos, removendo-se as meninges, o cerebelo e o encéfalo médio. O córtex cerebral foi fragmentado em pequenas porções, contendo aproximadamente 2 grs, homogeneizado (em ultra turrax, 8000 rpm, 10 vezes por 10 segundos) em 5 mLs tampão Hepes (20 mM Hepes, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, pH 7,4) contendo 0,32 M sacarose (de forma a se obter um homogeneizado a 10% - w/v) e centrifugado a 1000 x g por 10 min, para remoção de *debris*. O sobrenadante foi transferido, cuidadosamente, para um tubo de ultracentrífuga contendo tampão Hepes com 1,2 M de

sacarose, formando assim um gradiente descontínuo. Estes tubos foram centrifugados a 160,000 x g, por 15 min em rotor SW 41 (Beckman®). Após esta centrifugação, os sinaptossomas localizados na interface entre a solução de sacarose de 0,32 M e 1,2 M foram diluídos em 4 mLs de tampão Hepes contendo 0,32 M de sacarose e transferido, cuidadosamente, para um tubo de ultracentrífuga contendo tampão Hepes com 0,8 M de sacarose, formando assim um gradiente descontínuo e centrifugados novamente à 160,000 x g por 15 min em rotor SW 41 (Beckman®) (Head et al., 2010). O pellet foi lisado em tampão tris 3 mM, pH 8 contendo 1 mM de inibidor de protease (PMSF) e centrifugado a 31000 x g por 15 min. O pellet, contendo as membranas sinaptossomais, foi homogeneizado em tampão Hepes, centrifugado a 31000 x g por 15 min. Este pellet, contendo as membranas sinaptossomais, foi ressuspensão em tampão Hepes e utilizado imediatamente ou armazenado a 80 °C (Jiang et al., 2010).

3.4.2. Remoção do colesterol das membranas sinaptossomais

Primeiramente foi realizado um teste para verificar a melhor ciclodextrina a ser utilizada para reduzir o conteúdo de colesterol das membranas sinaptossomais. Para este teste, as membranas (1 mg de proteínas) foram ressuspensas em diferentes concentrações de M β CD, hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP β CD) e β -ciclodextrina (β CD) e incubadas por 30 min à 37°C. Posteriormente, as células foram lavadas 3 vezes em tampão Hepes e centrifugadas para remoção de complexos de M β CD-colesterol, HP β CD-colesterol e β CD-colesterol.

3.4.3. Isolamento de DRMs de membranas sinaptossomais

As DRMs foram isoladas a partir de membranas sinaptossomais íntegras ou com conteúdo diminuído de colesterol (tratadas com 20 mM de M β CD). As membranas sinaptossomais, contendo 1 mg de proteínas, foram incubadas com 16 mM de TX-100 ou 8 mM de Brij 98, por 30 min a 4 °C ou 37 °C. Essa concentração equivale a 1 % de detergente. Foi adicionado às amostras um volume igual de solução de sacarose 80 % (volume final de 40 % ou 1,2 M) em tampão Hepes. Após transferência das amostras para tubos de ultracentrífuga, foram adicionadas, cuidadosamente, soluções de 30% (0,87 M) e 5% (0,15 M) de sacarose de forma a se obter um gradiente descontínuo do dissacarídeo. As amostras foram então submetidas à ultracentrifugação a 22,500 x g, por 4 h a 4 °C. Ao fim do processo de centrifugação as amostras foram recolhidas em dez frações (de 1 mL), a contar do início do tubo (sacarose 5%).

3.4.4. Caracterização do conteúdo total de proteínas, colesterol, fosfolipídios e esfingolipídios.

O colesterol total das amostras foi quantificado por método enzimático/colorimétrico (kit #743051, Laborclin, Pinhais, Brazil) e as proteínas pelo método colorimétrico baseado no ácido bicinconínico, BCA (Kit Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA), seguindo as instruções dos fabricantes. O fosfato foi dosado fotometricamente, pela formação de fosfomolibdato de amônio (Chen et al., 1956).

3.4.5. Eletroforese e Western Blot

As 10 frações recolhidas após ultracentrifugação foram aplicadas em gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio (SDS-page) segundo método de Laemmli (1970). A coloração dos géis foi feita com azul de Comassie. A identificação da massa molecular das proteínas foi realizada por densitometria, através do programa *GelScan V6.0 Analysis Software* (Bioscitech, Alemanha).

Para uma análise específica, as proteínas dos géis obtidos foram transferidas para membranas de PVDF através do sistema de blot. Após transferência das proteínas, a membrana de PVDF foi incubada com tampão contendo albumina de soro bovino e deixada *overnight*, à 4°C, com os anticorpos primários: anti flotilina-2 e anti SNAP-25. Em seguida a membrana foi incubada com o respectivo anticorpo secundário por 1 h, seguida de diversas lavagens. Ao final, para proceder a reação de quimioluminescência, foi utilizado o kit Super Signal West Dura Chemiluminescent Substrate com revelação em filmes de raio X.

3.4.6. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

O diâmetro médio e a morfologia das membranas sinaptossomais e DRMs foram determinados por microscopia eletrônica de transmissão (MET). A metodologia utilizada foi uma adaptação de trabalho anterior (Zanchetta, 2009), e foram utilizadas grades de cobre 100 *mesh* cobertas com *formvar*/carbono (Electron Microscopy Sciences). Uma gota de amostra foi aplicada sobre a tela, por 1 min. (para fixação das vesículas sobre a grade). O material foi contrastado com uma gota de acetato de uranila 1% (p/v) durante 5 seg., lavado com água destilada e seco com papel de filtro para obtenção das imagens. A microscopia foi realizada em colaboração com a Dra. Camila Moraes Gonçalves da Silva do laboratório de Biomembranas, Departamento de Bioquímica e Biologia Tecidual, Unicamp-SP.

3.4.7. Determinação do tamanho das vesículas

O tamanho das vesículas sinaptossomais e suas DRMs foi determinado através de espalhamento de luz dinâmico (*dynamic light scattering*, DLS) utilizando o instrumento Zetasizer Nano-ZS, à temperatura de 20 °C e em cubetas de poliestireno (10 mm de caminho óptico). A viscosidade atribuída às DRMs foi de 1,54 mPa.s (Casadei, 2011). As medidas foram realizadas em colaboração com as alunas de doutorado Verônica Muniz Couto e Viviane Aparecida Guilherme.

3.4.8. Cromatografia líquida em camada delgada de alta eficiência (HPTLC)

Inicialmente, os lipídios foram extraídos das membranas sinaptossomais e suas DRMs conforme item 3.3.2. As amostras de lipídios extraídos foram, então, secas e ressuspensas em 50 µL de clorofórmio para análise dos fosfolipídios. Os componentes fosfolipídicos foram separados na placa de HPTLC usando a mistura clorofórmio:etanol:água:triethylamina (35:35:7:35, v/v/v) (Fuchs et al., 2008). Após borrifar as placas com o reagente azul de molibdênio, os diferentes fosfolipídios foram visualizados como bandas azuis (Toledo et al., 1995).

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

3.4.9. Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE)

A ressonância paramagnética eletrônica (RPE) é uma técnica espectroscópica que detecta espécies paramagnéticas. Para estudo de RPE em membranas é necessário a incorporação de sondas (marcadores de spin) que possuem um elétron desemparelhado, ausente nos lipídios e proteínas de membrana, e que orientam-se segundo seus momentos magnéticos de spin na bicamada. Quando se aplica uma onda eletromagnética ressonante com a precessão do spin eletrônico, ocorre absorção de energia e transição do estado de spin; a energia absorvida (ΔE) é monitorada e convertida num espectro de RPE (Hemminga & Lawrence, 2007).

Usando marcadores de spin como o radical nitróxido (Figura 8) covalentemente ligado a ácidos graxos ou fosfolipídios é possível monitorar diferentes profundidades na bicamada lipídica bem como os componentes da membrana (fosfolipídios, colesterol ou proteínas) e assim, obter informações, ao nível molecular, da organização e dinâmica dessas moléculas.

Pode-se também determinar algumas propriedades físicas das membranas, como a presença de fase L_d ou L_o (Gennaro et al., 1996; Koter et al., 2004; Swamy et al., 2006; Subczynski et al., 2009; Mainali et al., 2012).

As amostras de membranas foram adicionadas a tubos contendo um filme de marcadores de spin do tipo nitróxido-ácido esteárico (5- ou 16-SASL, Figura 8), capazes de monitorar diferentes profundidades da bicamada lipídica (Figura 9). A concentração final de marcador de spin foi de aproximadamente 1 mol% (em relação à concentração lipídica); as amostras foram incubadas por 30 min, a 37 °C.

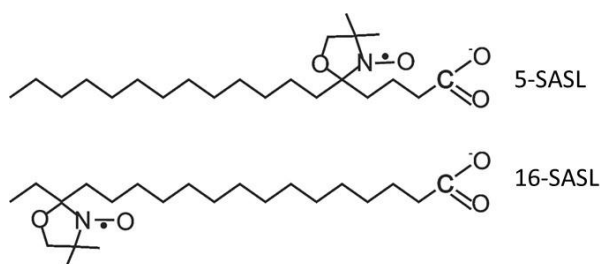


Figura 8. Estruturas químicas dos marcadores de spin contendo o grupo paramagnético nitróxido: 5-doxil-esteárico (5-SASL) e 16-doxil ácido esteárico (16-SASL).

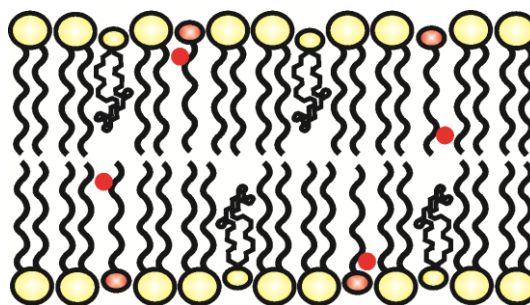


Figura 9. Desenho esquemático da inserção de marcadores de spin (5 e 16-SASL) em bicamadas lipídicas, destacando (em vermelho) a região da bicamada monitorada por eles.

Através dos espectros dos marcadores 5-SASL intercalados nas bicamadas foi determinado o parâmetro de ordem, S , que reflete a amplitude angular do movimento anisotrópico da molécula marcada e a orientação (do marcador SASL e, indiretamente, dos lipídios da membrana em relação ao plano da bicamada), de acordo com (Hubbell & McConnell, 1971):

$$S = \frac{A_{//} - A_{\perp}}{A_{zz} - (1/2)(A_{xx} + A_{yy})} \quad (4)$$

onde, $A_{//}$ e $A_{\perp}$ referem-se aos desdobramentos hiperfinos máximo e mínimo, respectivamente, correspondentes aos marcadores orientados com seus eixos longos moleculares de forma paralela e perpendicular, respectivamente, em relação ao campo

magnético externo (Figura 10A). Já os valores de A_{zz} , A_{xx} e A_{yy} (32, 6 e 6 gauss, respectivamente) correspondem aos principais componentes do tensor hiperfino do radical nitróxido, determinados em baixíssima temperatura estando o radical nitróxido totalmente imobilizado, isto é, perfeitamente orientado em relação ao campo magnético.

Os valores de S variam de 0 (sistemas isotrópicos) e 1 (sistemas perfeitamente orientados, como determinado em ultra baixas temperaturas). Para amostras com grande anisotropia, ou quando não foi possível determinar o desdobramento mínimo, o parâmetro de análise utilizado foi o máximo desdobramento hiperfino ($2A_{\max}$). Este parâmetro empírico aumenta de acordo com a viscosidade e empacotamento lipídico da amostra (Duarte et al., 2008).

Os espectros dos marcadores 16-SASL, por apresentarem baixa resolução dos extremos externos e internos nas medidas realizadas à alta temperatura (37 °C), foram analisados pelo parâmetro empírico h_{+1}/h_0 , refletindo a razão das alturas dos picos de campo baixo e médio (Figura 10B). Quanto mais anisotrópico o movimento do marcador incorporado na membrana, mais alargadas as linhas espectrais e consequentemente, maior é a diferença entre as alturas dos picos de campo baixo (h_{+1}) e médio (h_0); igualmente, quanto menor a organização no ambiente ao redor da sonda, maiores as razões h_{+1}/h_0 (Duarte et al., 2008).

As medidas de RPE foram conduzidas no Instituto de Física da USP, Laboratório de Biofísica, em colaboração com a Dra. Maria Teresa Lamy e apoio técnico-científico do Dr. Evandro Luis Duarte, em espectrômetro Bruker EMX em banda-X operando em frequência de 10 GHz.

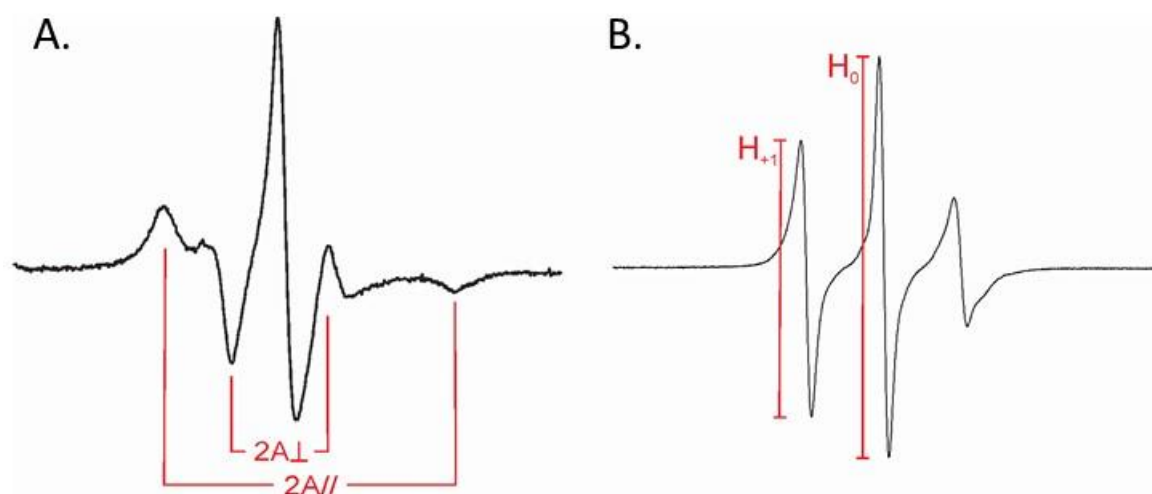


Figura 10. Espectro de RPE do marcador 5-SASL (A) e 16-SASL (B) em membranas eritrocitárias, evidenciando as medidas dos parâmetros especiais ($2A_{\parallel}$ e $2A_{\perp}$ e h_{+1}/h_0).

3.4.10. Análises estatísticas

As análises estatísticas realizadas compreenderam o teste *T de Student* que visa comparar diferenças entre duas amostras avaliadas. Em todas as análises realizadas considerou-se $p < 0,001$, $p < 0,01$, $p < 0,05$ e $p > 0,05$. O nível de significância com distribuição normal foi de 5%. O software utilizado foi o Origin 6.0 (Microcal TM Software Inc., EUA).

4. Resultados e Discussão

Na parte 1 descrevemos os resultados obtidos sobre a interação dos detergentes TX-100 e Brij 98 com a membrana eritrocitária, através de testes em monocamadas e com vesículas unilamelares gigantes (GUVs). As monocamadas e as GUVs, formadas com lipídios extraídos de *ghosts* eritrocitários forneceram informações sobre o processo de solubilização induzido por detergentes e, apesar de serem um modelo simplificado da membrana eritrocitária, pois as proteínas estão ausentes e há perda da assimetria lipídica, elas mantêm a complexa composição lipídica da membrana eritrocitária.

Na parte 2 isolamos e caracterizamos membranas sinaptossomais de córtex cerebral suíno, testamos a eficiência de diferentes ciclodextrinas em reduzir o conteúdo de colesterol das mesmas e caracterizamos as membranas sinaptossomais, íntegras ou com conteúdo reduzido de colesterol, quanto a resistência à solubilização por TX-100 e Brij 98, em duas temperaturas, 4 e 37 °C.

4.1. Parte 1. Interação entre detergentes e lipídios de membranas eritrocitárias

4.1.1. Medidas de isotermas de pressão na interface ar-água

Nas bicamadas, o grau de empacotamento e a mobilidade de seus componentes moleculares, assim como a topologia de sua superfície definem, de maneira conjunta, a organização do sistema. No caso de sistemas tridimensionais, como, por exemplo, os lipossomas (modelo clássico de biomembranas) estas propriedades se afetam mutuamente. Em consequência, efeitos sobre o grau de empacotamento ou sobre a curvatura das membranas induzidos, por exemplo, pela associação de moléculas, não podem ser separados. De maneira diversa, o uso de moléculas anfifílicas em monocamadas auto-organizadas na superfície ar-água (filmes de Langmuir) permite manter uma topologia plana constante e um grau de empacotamento molecular controlado (Gaines, 1966) e constitui um excelente modelo para o estudo da interação detergente-membrana. No entanto, a maioria desses estudos é realizada a partir de membranas modelo compostas de fosfatidilcolina (PC), esfingomielina (SM) e colesterol (Col) e não leva em conta a presença de outros lipídios (Li et al., 2001; Fontaine et al., 2007; Abi-Rizk & Besson, 2008). Assim, nesta etapa analisamos o efeito de detergentes nas propriedades mecânicas de monocamadas de lipídios extraídos de *ghosts* de eritrócitos, através dos estudos de penetração (adsorção, desorção e constante de ligação) e da cinética de incorporação dos detergentes TX-100 e Brij 98, por isotermas de pressão na interface ar-água.

Penetração de TX-100 e Brij 98 em monocamadas de lipídios extraídos de *ghosts*

Inicialmente, preparamos monocamadas de lipídios extraídos de *ghosts* em balança de Langmuir, na interface ar-água. A pressão superficial inicial (π_i) foi variada entre 0 (sem lipídio) e 40 mN/m, à temperatura ambiente (23 °C). Os detergentes foram adicionados cuidadosamente à subfase aquosa e a diferença na pressão ($\Delta\pi$) superficial foi determinada em relação à pressão máxima conseguida com cada π_i e uma concentração fixa de detergente na subfase (Figura 11). O valor da máxima π_i que permite a penetração ($\pi_{\text{cut-off}}$) reflete a habilidade do detergente em superar a resistência imposta pela monocamada, bem como a estabilidade da monocamada lipídio-detergente formada. A pressão máxima foi atingida instantaneamente, logo após a inserção dos detergentes (tempo 0 s), e foi mantida constante

durante os 30 min (1800 s) de experimento. Isso é um comportamento comumente observado na partição de moléculas anfifílicas (Lichtenberg et al., 2013).

A penetração de ambos detergentes nas monocamadas diminuiu com o aumento da pressão superficial inicial da monocamada (Figura 11A e B), indicando uma resistência da monocamada à incorporação do detergente, pelo maior empacotamento das moléculas lipídicas, com o aumento da pressão superficial. O $\pi_{\text{cut-off}}$ foi de 45 e 51 mN/m ($p < 0,01$, *test T de Student*) para TX-100 e Brij 98, respectivamente, em monocamadas de lipídios de *ghosts* (Figura 11C e D).

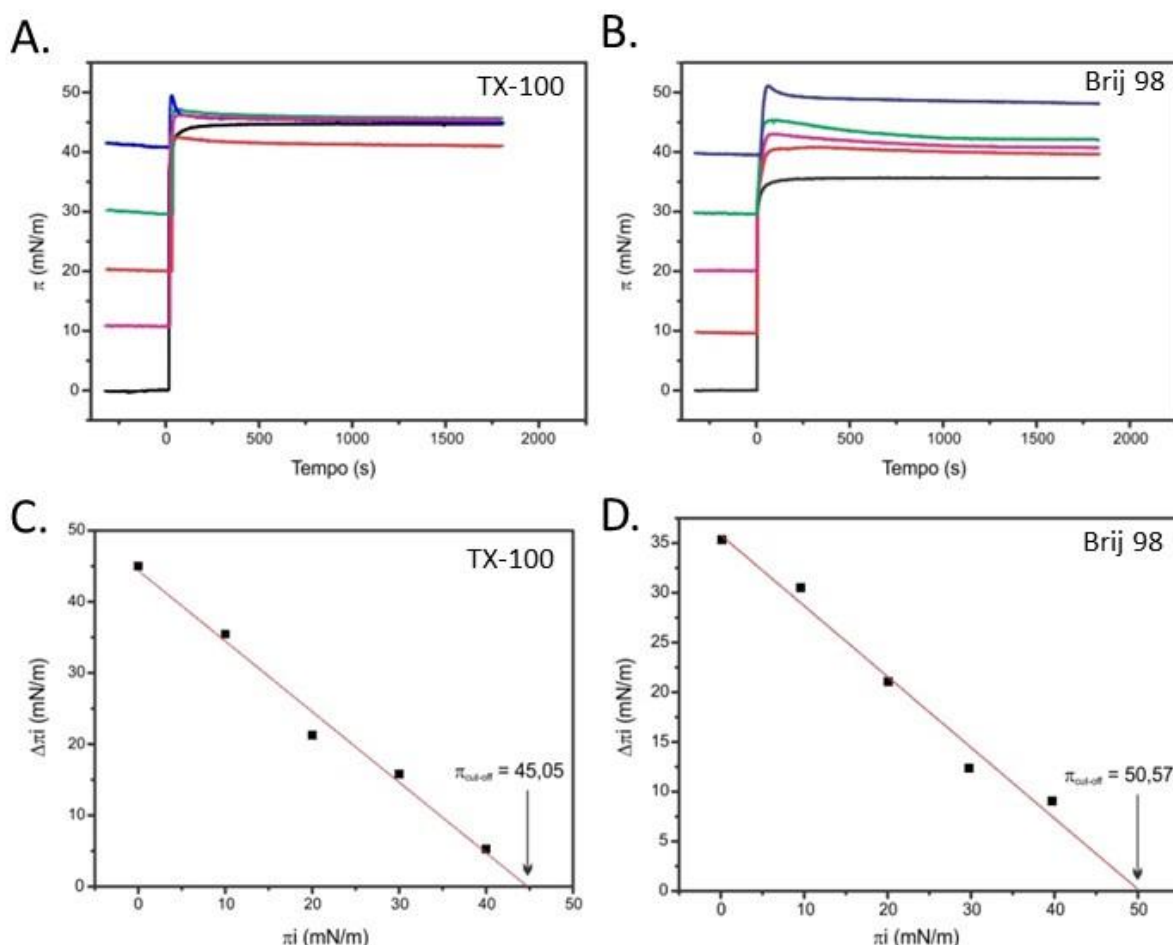


Figura 11. Efeito da injeção de 1 mM de detergente na subfase abaixo das monocamadas de lipídios extraídos de *ghosts* de eritrócitos, submetidos a diferentes pressões iniciais de superfície lateral, na interface ar-água. A e B mostram a variação de pressão superficial em função do tempo para TX-100 e Brij 98, respectivamente. C e D se referem a mudança de pressão lateral de superfície após injeção de detergente TX-100 e Brij 98, respectivamente, em função da pressão inicial ($\Delta\pi_i = \pi_{\text{max}} - \pi_i$). Os valores de $\pi_{\text{cut-off}}$ representam a máxima pressão superficial que permite a penetração de detergente na monocamada. ($n=3$).

O efeito do TX-100 na pressão superficial foi maior do que a do Brij 98, como indicado pelo valor da pressão lateral atingido em $\pi_i = 0$ (Figura 11C e D). Visto que o Brij 98

é mais hidrofílico (sua porção polar tem o dobro de unidades de polioxietileno que o TX-100, Tabela 1), esperávamos que sua inserção na interface plana fosse menos favorecida que a do TX-100. Pelo contrário, em $\pi_i > 0$, observamos uma inserção mais favorável do Brij 98 sobre o TX-100, como mostrado pelos valores de $\pi_{\text{cut-off}}$, o que pode indicar um possível impedimento estérico à inserção do TX-100 entre os lipídios, conferido pelo seu anel benzênico na interface polar-apolar da molécula (Tabela 1). Isso poderia explicar o maior potencial lítico do Brij 98 sobre o TX-100, revelado em ensaios de hemólise quantitativa (Casadei, 2011), em que o Brij 98 causou hemólise em razão molar detergente:lipídio (0,18) inferior à do TX-100 (1,58).

Cinética de incorporação

A cinética de incorporação dos detergentes TX-100 e Brij 98 em monocamadas de lipídios de *ghosts* foi estudada também pela variação da pressão (π) *versus* o tempo (s) (Figura 12). As concentrações de detergentes utilizadas estão próximas a CMC dos detergentes estudados (Tabela 1). A pressão inicial (π_i) da monocamada (camada adsorvente) foi de aproximadamente 35 mN/m, que corresponde ao valor médio da pressão superficial encontrada em membranas biológicas (Marsh, 1996).

Na presença de detergente, a π_i aumenta para pressões superiores à 42 mN/m e 46 mN/m para TX-100 e Brij 98, respectivamente, valores próximos ao $\pi_{\text{cut-off}}$ (Figura 11). As constantes de velocidade dos processos de adsorção (K_a) e desorção (K_d) e a constante de ligação (K_b) dos detergentes nas monocamadas de *ghosts* foram determinadas (Tabela 2).

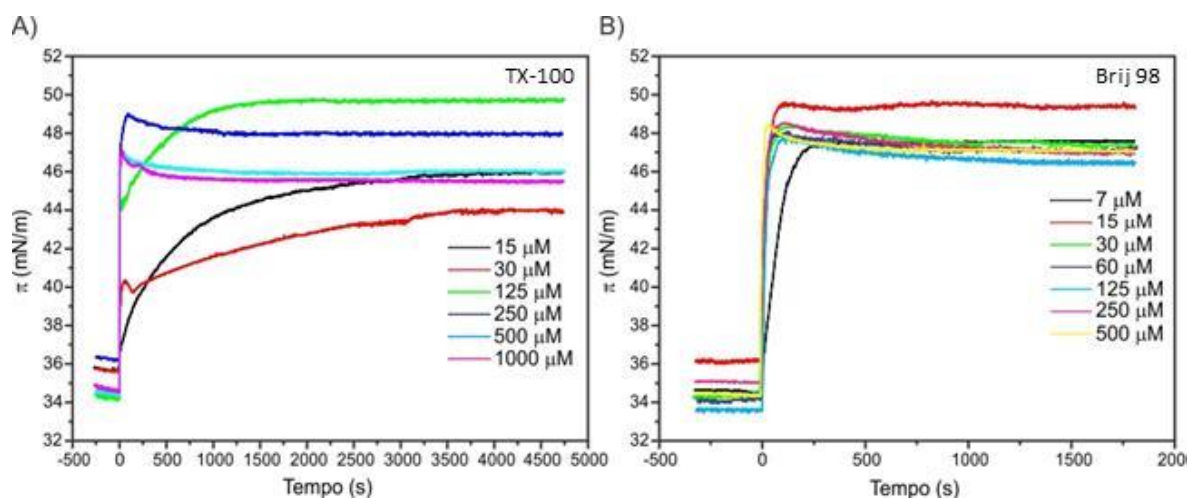


Figura 12. Cinética de incorporação de diferentes concentrações de TX-100 (A) e Brij 98 B) em monocamadas de lipídios extraídos de *ghosts* na interface ar-água, a 22 °C.

Tabela 2. Parâmetros termodinâmicos (constantes de adsorção, desorção e de ligação), determinados a partir das medidas de cinética de incorporação dos detergentes TX-100 e Brij 98 em monocamadas de lipídios de *ghosts*.

	TX-100	Brij 98
K_a ($M^{-1}.s^{-1}$)	452,03	253,59
K_d (s^{-1})	0,06	0,02
K_b ($.10^4 M^{-1}$)	0,75	1,25

O TX-100 apresentou valores maiores de K_a e K_d e valores menores de K_b em relação ao Brij 98. TX-100 mostra uma associação aparente mais rápida (possivelmente por seu maior volume na região hidrofóbica que induz uma maior deformação na monocamada) e dissociação também mais rápida, possivelmente devido a uma menor superfície, capaz de estabilizá-lo na interface através de forças de Van der Waals.

Os valores de K_b determinados (Tabela 2) para o Brij 98 evidenciam a alta afinidade desse detergente pela monocamada lipídica, sendo que pequenas quantidades de Brij 98 já são suficientes para atingir a pressão máxima, explicando o seu grande potencial lítico (Casadei, 2011).

Além disso, os valores de K_b em monocamadas, determinados na Tabela 2 ($K_b=7500$ e $12500 M^{-1}$ para TX-100 e Brij 98, respectivamente) guardam boa correlação com os valores de constante de ligação determinados em eritrócitos íntegros ($5900 M^{-1}$ e 22300 , respectivamente, Casadei, 2011), isto é, na presença de proteínas.

As propriedades agregativas dos detergentes têm sido consideradas um fator extremamente relevante na solubilização de membranas (Lichtenberg, 1985; Heerklotz & Seelig, 2000; Lichtenberg et al., 2000; Schreier et al., 2000; Domingues et al., 2008). No modelo proposto por Lichtenberg & cols. (2000), a solubilização envolve um número de estágios intermediários, iniciando-se pela desestabilização dos componentes lipídicos da membrana, em concentrações do detergente abaixo da CMC e culminando na ruptura total dessa, em concentrações próximas a CMC (como representado na Figura 5), de forma que quanto menor a CMC maior o potencial de solubilização. A CMC do Brij 98 é 10 vezes menor que a do TX-100. Além disso, Sowmiya & cols (2010) verificaram que a micelização do Brij 98 é precedida pela formação de pequenos agregados, conhecidos como agregados pré-micelares. A existência desses agregados pré-micelares poderia também favorecer a interação detergente-membrana, mesmo em concentrações baixas, o que explica o fato de Brij 98 atingir a máxima pressão, mesmo em concentrações abaixo da CMC.

4.2.2. Ação de TX-100 e Brij 98 em GUVs de membranas eritrocitárias

Como relatado acima, em estudos anteriores de nosso grupo avaliamos o efeito dos detergentes TX-100 e Brij 98 na membrana eritrocitária através de testes hemolíticos quantitativos (Casadei, 2011) e de caracterização de DRMs em diferentes temperaturas e conteúdo de colesterol na membrana (Domingues et al., 2009; 2010 Casadei et al., 2014a). Esses trabalhos demonstraram que DRMs preparadas a partir de TX-100 apresentaram alto conteúdo de colesterol e esfingomielinas e, também, medidas de RPE evidenciaram aumento do parâmetro de ordem nos DRMs obtidos por ação do TX-100, indicando a formação de fase L_o , característica dos *lipid rafts*. Já as DRMs de Brij 98, apesar de ricas em colesterol, apresentaram baixo conteúdo de esfingomielina e maior conteúdo de fosfatidiletanolamina (presente na monocamada interna da membrana eritrocitária), não evidenciando alteração significativa no parâmetro de ordem, em relação a membrana íntegra.

Decidimos, então, investigar o efeito dos detergentes em membranas por microscopia ótica a fim de elucidar o mecanismo de solubilização e separação de fases. Medidas com vesículas unilamelares gigantes (GUV) associadas à microscopia de fluorescência em lipossomas permitem observar modificações na distribuição de lipídios em fase L_d e L_o , evidenciando a separação de fases nessas membranas modelo (Tamba et al., 2004; Staneva et al., 2005; Sudbrack et al., 2011). As GUVs preparadas por eletroformação foram descritas pela primeira vez em 1986, por Angelova & Dimitrov. Dada as dimensões das GUVs é possível observar, através de microscopia ótica, mudanças em sua forma provocadas pela solubilização por detergentes e, com sondas fluorescentes, determinar a separação lateral de fases.

Preparamos, inicialmente, GUVs de lipídios extraídos de eritrócitos (eritro-GUVs) e observamos o efeito da adição de TX-100 e Brij 98 nessas vesículas, através de microscopia de contraste de fases (Casadei, 2014a). Numa segunda abordagem, mais quantitativa, comparamos o efeito do TX-100 em eritro-GUVs e GUVs preparadas com os lipídios palmitoil-oleil-fosfatidilcolina:esfingomielina:colesterol (POPC:SM:Col) que mimetizam a composição lipídica das eritro-GUVs (Casadei et al., 2014b).

Interação específica do TX-100 com eritro-GUVs

Inicialmente, uma solução de 5 mM de TX-100 foi injetada, com uma micropipeta, diretamente nas eritro-GUVs marcadas com a sonda fluorescente Rh-DPPE, e as modificações foram observadas através de microscopia ótica de fluorescência (Figura 13). O

marcador Rh-DPPE é conhecido por particionar preferencialmente na fase L_d (Bagatolli, 2003; Baumgart et al., 2003).

Antes do contato com TX-100, todas as GUVs apresentaram uma fluorescência homogênea, confirmando a não existência de separação de fases, evidenciada nas medidas de microscopia ótica. Depois disso, iniciamos a injeção de TX-100. Inicialmente, após a injeção de TX-100, observamos a formação de domínios circulares, enriquecidos em Rh-DPPE e, logo após, os domínios coalesceram e as duas fases foram completamente separadas (Figura 13). Esse resultado mostrou que o TX-100 foi capaz de separar e coalescer domínios e, posteriormente, solubilizar a fase L_d . Após todo esse processo, restou uma GUV com menor contraste de fase, menor diâmetro, sem fluorescência e completamente insolúvel ao TX-100.

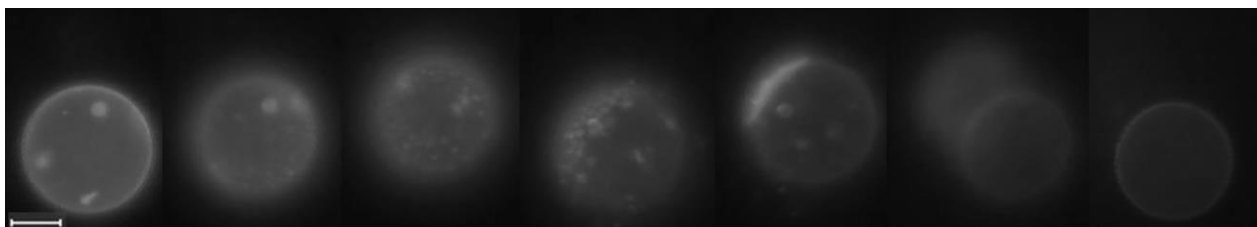


Figura 13. Sequência de tempos registrada durante a injeção de 5 mM de TX-100 em eritro-GUVs, observadas por microscopia de fluorescência. A barra de escala indica 10 μm . Os experimentos foram realizados à temperatura ambiente.

A partir desse resultado inicial, investigamos qual a concentração de TX-100 causaria este efeito, visto que a concentração de TX-100 poderia variar com fluxo da micropipeta (Sudbrack et al., 2011), no experimento acima. Para isso, adicionamos uma suspensão de eritro-GUVs em uma solução de TX-100 de concentração conhecida e próxima à sua CMC (Tabela 1).

Quando as eritro-GUVs foram expostas à 0,2 mM de TX-100 (abaixo da CMC), observamos apenas a formação e coalescência de domínios, sem solubilização das vesículas. Quando adicionamos GUVs à uma solução de 0,3 mM de TX-100 (próximo à CMC), os domínios se formaram e coalesceram, seguindo-se a separação e solubilização da fase fluida, (Figura 14). Em soluções à 0,4 mM, o TX-100 causou imediata formação, coalescência, separação e solubilização da fase fluida. Após poucos segundos, apenas a fase L_o pode ser observada. Em concentrações maiores que 0,4 mM de TX-100, o mesmo efeito foi observado, porém em velocidades maiores. Em concentrações menores que 0,2 mM, somente a separação de fase foi promovida (Casadei et al., 2014).

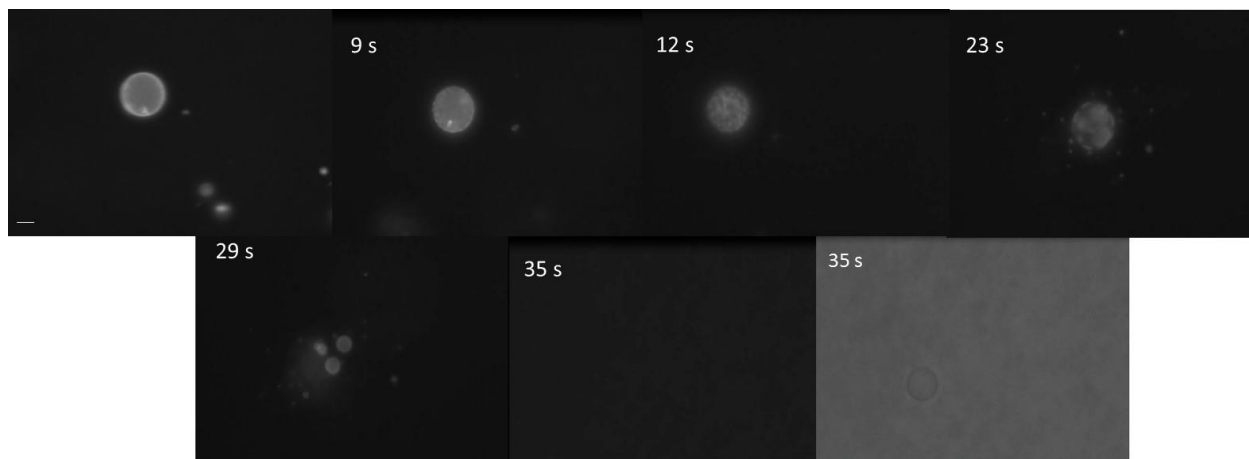


Figura 14. Registro de micrografias obtidas ao longo do tempo, após a adição de 0,3 mM de TX-100 em eritro-GUVs (imagens de 0 a 35 s), por microscopia de fluorescência e contraste de fase (imagem de 35 s, à direita). A barra de escala indica 10 μ m. Os experimentos foram realizados à temperatura ambiente.

Em GUVs de POPC, demonstrou-se que a inserção de TX-100 em concentrações acima de 0,18 mM, promove o aumento do diâmetro, flutuação, abertura de poros e solubilização total da vesícula (Sudbrack et al., 2011). Nas eritro-GUVs, apenas concentrações próximas e acima à CMC, 0,27 mM, foram capazes de solubilizar parcialmente a membrana; e em nenhuma concentração acima da CMC foi observada solubilização completa das eritro-GUVs. Assim, nossos resultados indicam que a inserção de TX-100 em eritro-GUVs é menos favorecida do que em GUVs de POPC. Ahyayauch & cols. (2009) demonstraram, em vesículas miméticas, que a associação de SM e Col produz uma resistência à solubilização por TX-100. A membrana eritrocitária, em relação aos lipídios totais, é composta por cerca de 45 mol% de colesterol, 19 mol% de PC, 17 mol% de SM, 17 mol% de PE, 11 mol% de PS e 1 mol% de PI (Leidl et al., 2008), sendo assim, a associação entre o Col e a SM justificaria a solubilização parcial de TX-100. Então, para verificar a solubilização parcial, preparamos GUVs compostas de POPC:SM:Col na razão molar de 2:1:2, como modelo biomimético da membrana eritrocitária. Para chegar nessa razão de POPC, somamos o conteúdo dos principais glicerofosfolipídios (PC, PE e PS) e aproximamos os valores.

O processo de solubilização através da injeção de 5 mM TX-100 nas GUVs miméticas, a 23 °C, seguiu sequência de eventos semelhante ao descrito para as eritro-GUVs. Inicialmente as GUVs eram homogêneas, sem separação de fase. Após o contato com TX-100, ocorreu a formação e coalescência de domínios até a separação e completa solubilização da fase L_d , permanecendo uma fração insolúvel (L_o), não fluorescente. No entanto, a temperatura poderia afetar a solubilização parcial, visto que a composição de DRMs é

sensível à temperatura, como comprovam diversos estudos com DRMs preparados a 4 °C (protocolo clássico) e 37 °C, temperatura fisiológica (Schuck et al., 2003; Delaunay et al., 2008b; Domingues et al., 2010; Casadei et al., 2014a). Assim, decidimos explorar o efeito do aumento da temperatura (37 °C) na solubilização das GUV. Experimentos a 4 °C não puderam ser realizados devido à condensação da água no porta amostra do microscópio. Nos experimentos a 37 °C, basicamente, a mesma sequência de eventos foi observada nas eritro-GUVs e nas GUVs miméticas: inicialmente as GUVs eram homogêneas, porém após contato com TX-100 ocorreu a formação, coalescência, separação até a completa solubilização da fase L_d ; no entanto a fração solubilizada foi maior do que a observada na temperatura ambiente (23 °C). Este resultado pode refletir a maior solubilização de esfingomielinas, cuja a temperatura de transição de fase é cerca de 40 °C (Wolf et al., 2001).

Além de Ahyayauch & cols. (2009), diversos trabalhos na literatura (Heerklotz, 2002; Garner et al., 2008) mostram que o TX-100 solubiliza seletivamente a fase L_d , deixando a fase L_o intacta, sugerindo uma solubilização preferencial de PC. Na Figura 15 mostramos que, para as GUVs solubilizadas à temperatura ambiente, cerca de 1/3 da vesícula foi solubilizada enquanto 2/3 permaneceu insolúvel (razão calculada por $X_{\text{insolúvel}} = (D_{\text{depois}}/D_{\text{antes}})^2$, onde D_{depois} e D_{antes} referem-se aos diâmetros das vesículas antes e depois da solubilização, respectivamente). As frações de eritro-GUVs e GUVs miméticas insolúveis ao TX-100 à temperatura ambiente e à 37 °C foram bastante semelhantes: 0,65-0,68 na temperatura ambiente e 0,56-0,53 em 37 °C (Figura 15A).

Assumindo valores para a área ocupada pelo lipídio (Maulik et al., 1991; Hofsäss et al., 2003; Bezlyepkina et al., 2013) de: 63 Å² para POPC na presença de 40 mol% de colesterol (antes do contato com TX-100) ou 70 Å² quando na fase L_d (após contato com TX-100) e de 55 Å² para SM (antes do contato) ou 51 Å² após contato com TX-100 e de 27 Å² para o colesterol, a área mínima proposta para a vesícula 2:1:2 seria de 126:51:54 Å² (POPC:SM:Col) e a área mínima total seria de 231 Å². Se 1/3 da vesícula foi solubilizada (correspondendo a uma diminuição de 77 Å²) e considerando que apenas o POPC foi solubilizado, a composição proposta para a fração insolúvel à temperatura ambiente seria de 0,8:1:2 POPC:SM:Col.

Para testar essa hipótese, 5 mM de TX-100 foram injetados em GUVs de 0,8:1:2, POPC:SM:Col. De fato, nenhum efeito foi observado (como formação de domínios, solubilização parcial ou perda de contraste) nestas vesículas. Uma outra composição foi ainda testada, a 1:1:2 POPC:SM:Col. A fração insolúvel medida com vesículas com esta composição lipídica foi de 0,91, um valor intermediário entre as GUVs 2:1:2 e 0,8:1:2. Neste

caso, considerando a área dos lipídios (utilizando o mesmo raciocínio descrito acima) o resultado da fração insolúvel seria 0,8:1:2, validando a hipótese de que essa composição é insolúvel e representa as DRMs a 23 °C. A dependência da $X_{\text{insolúvel}}$ com a composição da membrana a 23 °C é mostrada na Figura 15B.

Apesar de essas GUVs constituírem um modelo bastante simplificado de membrana biológica, devido à ausência de proteínas, elas permitiram visualizar, pela primeira vez, a ação de TX-100 em membranas biológicas e miméticas. O TX-100 perturbou e promoveu a separação de domínios nas membranas, afetando a distribuição lateral dos lipídios. Além disso, mais uma vez pudemos demonstrar a resistência da associação de SM e Col à ação do TX-100.

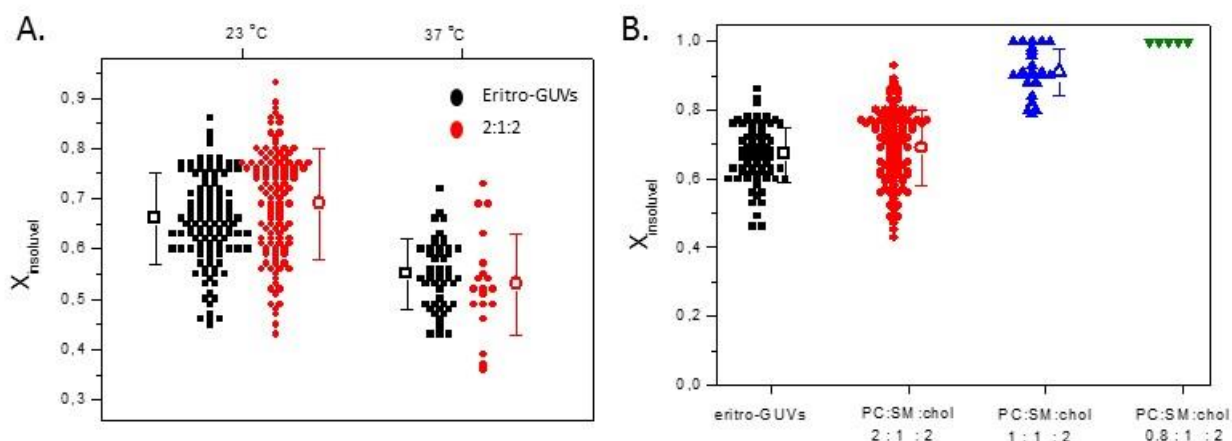


Figura 15. Média da fração da área de superfície da vesícula insolúvel ($X_{\text{insolúvel}}$) após tratamento com TX-100. A) Fração insolúvel ($X_{\text{insolúvel}}$) de eritro-GUVs (preto) e de GUVs 2:1:2 (vermelho) à temperatura ambiente (23 °C, esquerda) e à 37 °C (direita). B) Variação de $X_{\text{insolúvel}}$ das GUVs de lipídios de *ghosts* (preto), GUVs 2:1:2 (vermelho), GUVs 1:1:2 (azul) e GUVs 0,8:1:2 (verde), à temperatura ambiente.

Interação do detergente Brij 98 com GUVs de eritrócito

A ação do detergente Brij 98 em eritro-GUVs também foi visualizada através de microscopia ótica. Inicialmente, as eritro-GUVs foram adicionadas à uma solução de 0,1 mM de Brij 98 (acima da CMC deste - Tabela 1) e visualizadas por microscopia ótica de contraste de fases. Após o contato, diferentemente do encontrado por TX-100, todas as GUVs observadas foram desestabilizadas e reestruturadas em pequenas vesículas (Figura 16). Não fica claro, pelas imagens, se houve uma solubilização parcial das vesículas. O mesmo efeito foi observado em concentrações menores (0,25 mM, próximas à CMC) e maiores (até 5 mM) do Brij 98. Neste caso, não foi possível seguir o processo completo de solubilização causado pelo Brij 98, devido à ruptura abrupta das GUVs.

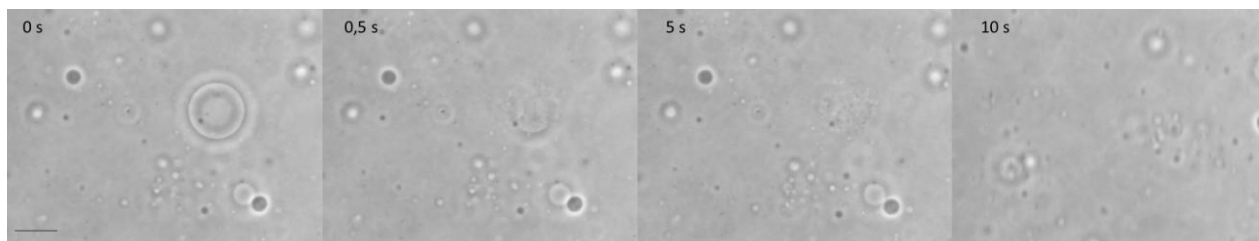


Figura 16. Registro de micrografias obtidas ao longo do tempo após injeção de 0,1 mM de Brij 98 em GUVs de lipídios de *ghosts* à temperatura ambiente, por microscopia ótica de contraste de fase. A barra de escala indica 10 μm .

Em trabalho anterior (Casadei et al, 2014a), observamos que DRMs de eritrócitos preparadas a partir de Brij 98 apresentaram uma composição lipídica muito parecida com a composição da membrana intacta, diferentemente das DRMs de TX-100, que possuíam altas concentrações de colesterol, SM e PC. Certamente o Brij 98 se insere diferentemente na bicamada lipídica, em relação ao TX-100. É possível que, pelo tamanho da sua cabeça polar, o Brij 98 se insira apenas na monocamada externa, desestabilizando e rearranjando a vesícula em pequenas partículas. No entanto, mais estudos precisam ser realizados para que se possa estabelecer, inequivocamente, o mecanismo de solubilização induzido pelo Brij 98 em vesículas contendo PC, PE, PS, SM e col.

4.3. Parte 2. Membranas sinaptossomais resistentes a detergentes

De uma maneira similar aos métodos utilizados para obtenção de organelas subcelulares, as frações enriquecidas em sinaptossomais de cérebro de porco foram isoladas por centrifugação diferencial em gradiente de sacarose, de acordo com o método de Head & cols. (2010). Com essas frações, as membranas sinaptossomais foram obtidas através de uma lise hipósmotica, como descrito por Jiang & cols. (2010). As membranas sinaptossomais foram inspecionadas morfologicamente, por meio de microscopia eletrônica de transmissão para verificar seu resselamento, assim como morfologia (Figura 17). Os resultados obtidos mostram que os sinaptossomas são estruturas esféricas e, aparentemente, sem nenhum conteúdo intracelular. Medidas de espalhamento de luz dinâmico mostraram que o diâmetro médio das vesículas sinaptossomais é de $461,1 \pm 47,8$ nm.

Esse tamanho está em acordo com o encontrado por Kolomiytseva & cols. (2008), para membranas sinaptossomais isoladas a partir do córtex cerebral de esquilo, e Dunkley & cols. (2008), para sinaptossomas isolados a partir do córtex cerebral de ratos (~ 400 nm).

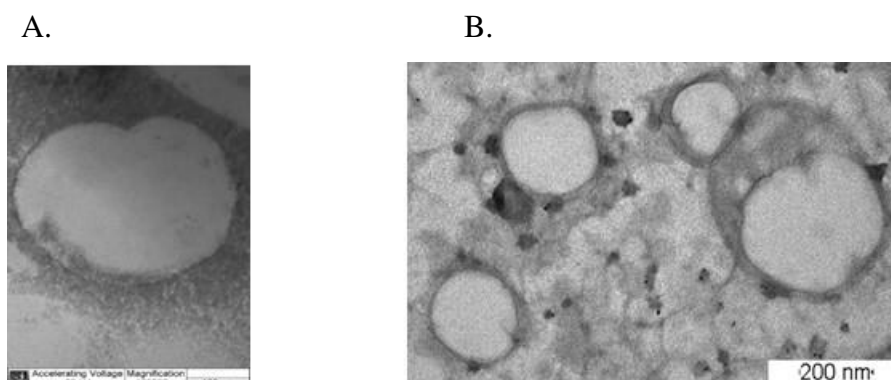


Figura 17. Microscopias eletrônicas de transmissão de sinaptossomas de córtex suíno. Aumento de 77.500 (A) e 60.000x (B).

As membranas sinaptossomais têm uma alta razão colesterol/proteínas ($0,78 \mu\text{g}/\mu\text{g}$), o que indica uma membrana altamente especializada, como demonstrado por Cubí & cols. (2010) e Teixeira & cols. (2012). Além disso, em relação aos lipídios totais, a proporção de de colesterol é de 42 mol%, similar à encontrada para outras membranas biológicas (Yeagle, 2012).

Medidas de eletroforese em SDS-page foram realizadas para identificar as proteínas presentes na membrana sinaptossomal isolada de cérebro de porco. Através do perfil eletroforético, observamos bandas de proteínas do citoesqueleto similares à espectrina, proteína 4.1, tubulina e actina. Através de análise específica de proteínas (western blot),

identificamos as proteínas SNAP 25 (proteínas pré-sinápticas) e flotilina. Estes resultados estão descritos no item 4.3.4.

4.3.2. Redução do conteúdo de colesterol das membranas sinaptossomais por ação de ciclodextrinas

β -ciclodextrinas são oligossacarídeos cíclicos, compostos por 7 unidade de D-(+)-glicopirranose unidas através de ligações α -1,4 e que assumem forma assemelhada a um cone, com uma cavidade de $\sim 7,9$ Å de profundidade (Zidovetzki & Levitan, 2007). As β -ciclodextrinas são frequentemente utilizadas para remover o colesterol de membranas biológicas (Somogyi et al., 2006; Domingues et al., 2010; Teixeira et al., 2012; Turina et al., 2012; Casadei et al., 2014a), porém elas também podem remover proteínas e outros componentes lipídicos das membranas (Zidovetzki & Levitan, 2007; Huang & London, 2013). Comparamos o efeito da β -ciclodextrinas (β CD) e suas derivadas: metil- β -ciclodextrina (M β CD) e hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP β CD), quanto a sua capacidade de remover os componentes da membrana (colesterol, fosfolipídio, esfingomielina e proteína), bem como medimos a fluidez da bicamada lipídica resultante, através de medidas de RPE. A concentração máxima de ciclodextrina utilizada foi de 50 mM (limite de insolubilidade da β CD, em pH 7,4).

O perfil da capacidade de remoção do colesterol da membrana sinaptossomal encontrado foi M β CD > β CD $\geq$ HP β CD, sendo que, com 50 mM de ciclodextrina a remoção foi de 86, 46 e 36 %, respectivamente, do colesterol total da membrana (Figura 18A). A β CD apresentou uma alta capacidade em remover proteínas (removeu 53 %, com 50 mM, Figura 18D), enquanto a HP β CD não foi muito eficiente em remover nenhum dos componentes de membrana testados (colesterol, fosfolipídio, esfingomielina e proteína). A M β CD se apresentou mais eficiente em remover o colesterol; no entanto, em concentrações acima de 20 mM ela também induziu remoção de proteínas, fosfolipídios e esfingomielina (Figura 18).

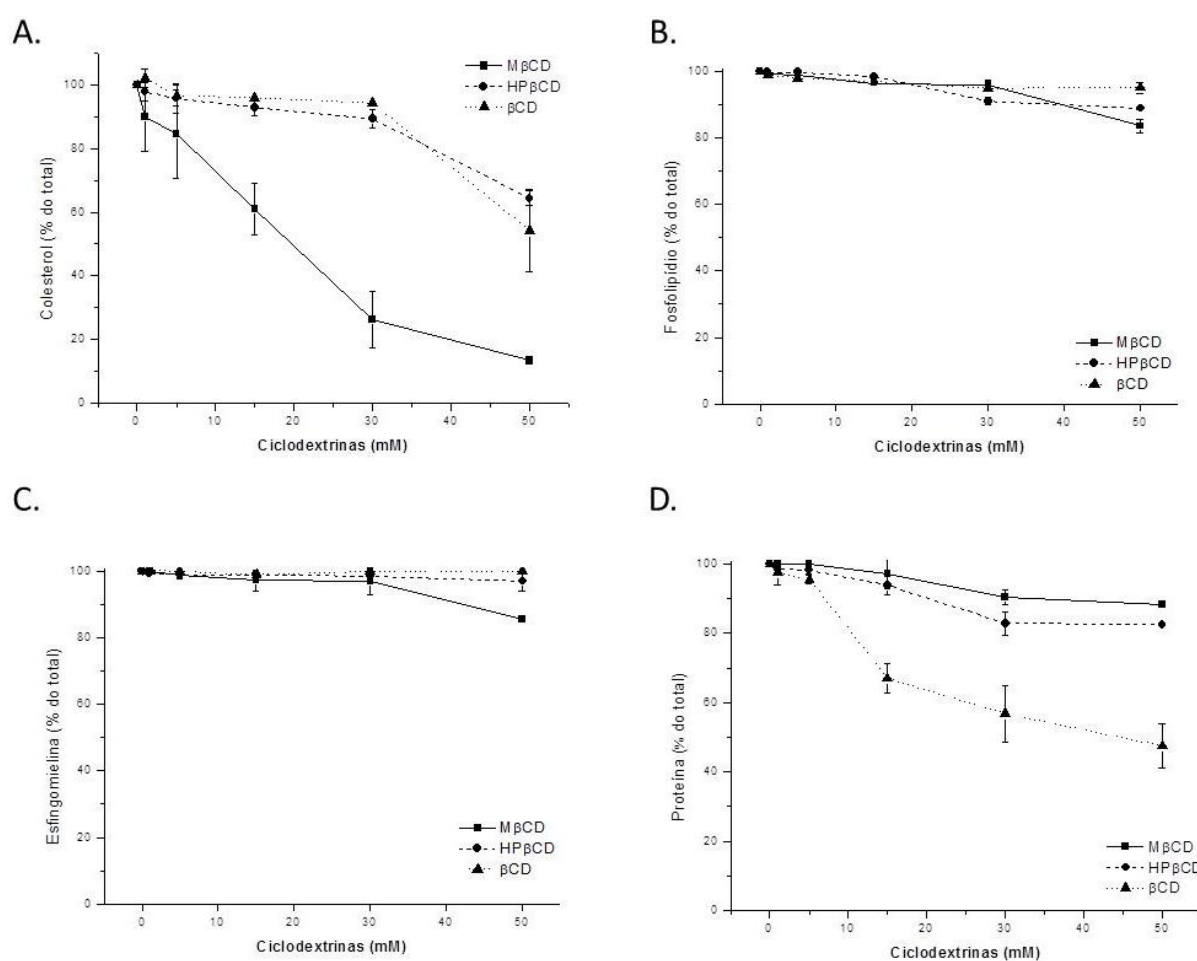


Figura 18. Efeito de diferentes concentrações de MβCD, HPβCD e βCD no conteúdo total de colesterol (A), fosfolipídio (B), esfingomielina (C) e proteína (D) da membrana sinaptossomal (n=3).

Estes dados foram observados pela primeira vez para membranas sinaptossomais. Alguns autores já descreveram a capacidade da MβCD em remover colesterol de sinaptossomas de rato, no entanto, a maioria dos trabalhos publicados utiliza concentrações maiores que 35 mM de MβCD (Besshoh et al., 2005; Gil et al., 2006; Cubí et al., 2013) nas quais, segundo os resultados da Figura 18, há também remoção de quantidade de proteínas e fosfolipídios, incluindo esfingomielinas.

A extração de colesterol pelas ciclodextrinas ainda não está completamente elucidada (Kan et al., 1992; Lopez et al., 2011; Milles et al., 2013). A formação de complexos de inclusão, MβCD-Colesterol, foi estudada por Lopez & cols. (2011), através de dinâmica molecular; tais autores mostraram que seriam necessárias duas ciclodextrinas para encapsular uma molécula de colesterol (~ 18 Å), mas esse efeito ainda não foi demonstrado, experimentalmente. Além disso, o efeito causado pelas diferentes ciclodextrinas pode ser

diferente, dependendo da membrana celular utilizada. Lange & cols. (1999) mostraram que a exposição de fibroblastos a 20 mM de hidroxipropil- β -ciclodextrina resultou num esgotamento de ~ 25 % de colesterol total da membrana, ao mesmo tempo causando uma depleção de 80 % do nível de colesterol no retículo endoplasmático. Em contraste, o tratamento da linha celular epitelial BHK com 10 mM de M β CD resultou em forte diminuição no conteúdo de colesterol na membrana plasmática (~ 90 %) (Keller & Simons, 1998). Em membranas eritrocitárias, 5 mM de M β CD foi capaz de diminuir em 40 % o colesterol total da membrana (Domingos et al., 2010). Assim, é essencial ter em conta que a exposição de células à β CDs pode alterar a distribuição relativa de colesterol na membrana plasmática e entre os diferentes compartimentos celulares e a quantidade de colesterol retirado da membrana pelas β CDs pode variar entre os diferentes tipos celulares.

Através dos espectros do marcador 5-SASL (Figura 19), o parâmetro de ordem (S, Figura 20) da bicamada lipídica sinaptossomal, antes e após o tratamento com diferentes concentrações de ciclodextrinas foi medido. Em membranas biológicas, este parâmetro descreve o grau de organização da bicamada, monitorado pelo radical nitróxido, como descrito no item 3.4.9 de Materias e Métodos.

Os espectros de RPE do marcador 5-SASL em sinaptossomas de cérebro de porco (Figura 19) apresentam duas componentes, uma móvel (indicada pela seta) e outra mais imobilizada, responsável pelo alargamento diferencial das linhas. A componente mais rígida corresponde ao sinal do marcador incorporado entre os lipídios da bicamada (sinais alargados) e a componente livre corresponde ao sinal do marcador em solução (com movimento isotrópico, dando origem a picos estreitos, apontados pelas setas); este último sinal é pequeno e não impede a medida do sinal anisotrópico, que corresponde ao marcador inserido nas membranas sinaptossomais.

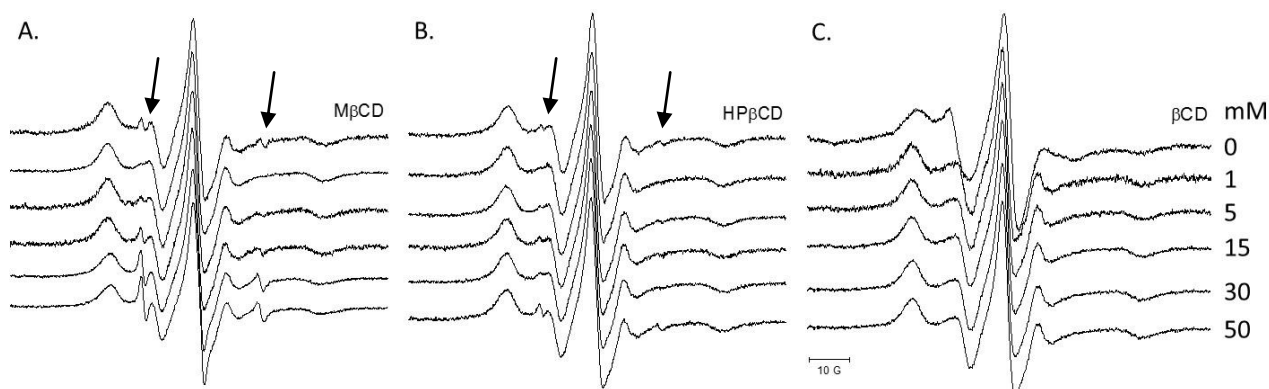


Figura 19. Espectros de RPE do marcador de spin 5-SASL incorporado em membranas sinaptossomais tratadas com diferentes concentrações de M β CD (A), HP β CD (B) e β CD (C), obtidos a 22 °C. As setas indicam a componente móvel do espectro.

O parâmetro de ordem medido pelo 5-SASL nas membranas íntegras de sinaptossomas foi de $0,78 \pm 0,02$, compatível com o alto teor de colesterol das mesmas (Yeagle, 2012) e próximo ao encontrado anteriormente por Turina e cols. (2012) para membranas sinaptossomais isoladas a partir do córtex cerebral bovino ($0,77 \pm 0,01$). Esse valor é também semelhante ao determinado nas membranas eritrocitárias, com o 5-SASL nas mesmas condições experimentais ($0,75 \pm 0,01$) (Casadei et al., 2014a).

Nenhum efeito significativo foi observado nas membranas tratadas com HP β CD. Para as membranas tratadas com β CD, foi observada uma diminuição na organização da bicamada lipídica nas amostras tratadas com concentrações superiores a 5 mM ($p < 0,01$, test T de student), o que corrobora os dados observados na Figura 18, que mostraram nenhuma ou pequena capacidade dessas ciclodextrinas, em remover colesterol das membranas sinaptossomais.

Como esperado, houve uma diminuição significativa do parâmetro de ordem das membranas sinaptossomais tratadas com concentrações superiores à 15 mM de M β CD, evidenciando que a diminuição do conteúdo de colesterol da membrana (redução de 40 % do conteúdo de colesterol - Figura 18) é acompanhada de uma menor organização da membrana (Figura 20). Este resultado está de acordo com o efeito do colesterol, um agente modulador do empacotamento lipídico, e que aumenta o grau de empacotamento lipídico em bicamadas na fase L_d (Mainali et al., 2012).

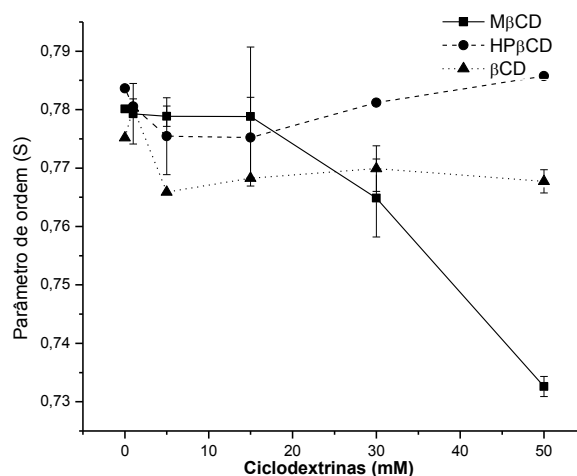


Figura 20. Variação do parâmetro de ordem (S) do marcador de spins 5-SASL incorporado em membranas sinaptossomais tratadas com concentrações crescentes de MβCD, HPβCD ou βCD (n=3). Parâmetro calculado em espectros de RPE obtidos a 21 °C.

4.3.3. Preparo e isolamento de DRMs de sinaptossomas em gradiente de sacarose

Outros trabalhos na literatura indicam que DRMs sinaptossomais de cérebro de ratos, preparadas em gradiente de sacarose, são encontradas na interface de 30 a 5 % (Arapulisamy et al., 2013; Cuddy et al., 2014), 35 e 5 % (Head et al., 2010; Gil et al., 2011; Cubí et al., 2013) ou 35 e 10 % (Cole et al., 2010). Assim, optamos por separar as DRMs em gradiente 30 e 5 % de sacarose, i.e., os mesmos utilizados por nós para isolar DRMs de membranas eritrocitárias (Crepaldi Domingues et al., 2009; Domingues et al., 2010; Casadei et al., 2014a).

Inicialmente, as DRMs sinaptossomais foram obtidas a partir de diferentes concentrações do detergente TX-100 (Figura 21A) e Brij 98 (Figura 21B), todas acima da CMC e a 4 °C, de acordo com a metodologia descrita em materiais e métodos (item 3.4.3). Após ultracentrifugação das membranas sinaptossomais tratadas com detergentes, dez frações de 1 mL foram coletadas, iniciando-se pela parte superior dos tubos (5% sacarose). As DRMs foram separadas na região do gradiente entre a interface 5 e 30% de sacarose, correspondendo a fração 3 do gradiente, com densidade de 1,09 a 1,12 g/cm³, como descrito anteriormente para preparo de DRMs de membrana eritrocitária (Domingues et al., 2010; Casadei et al., 2014a).

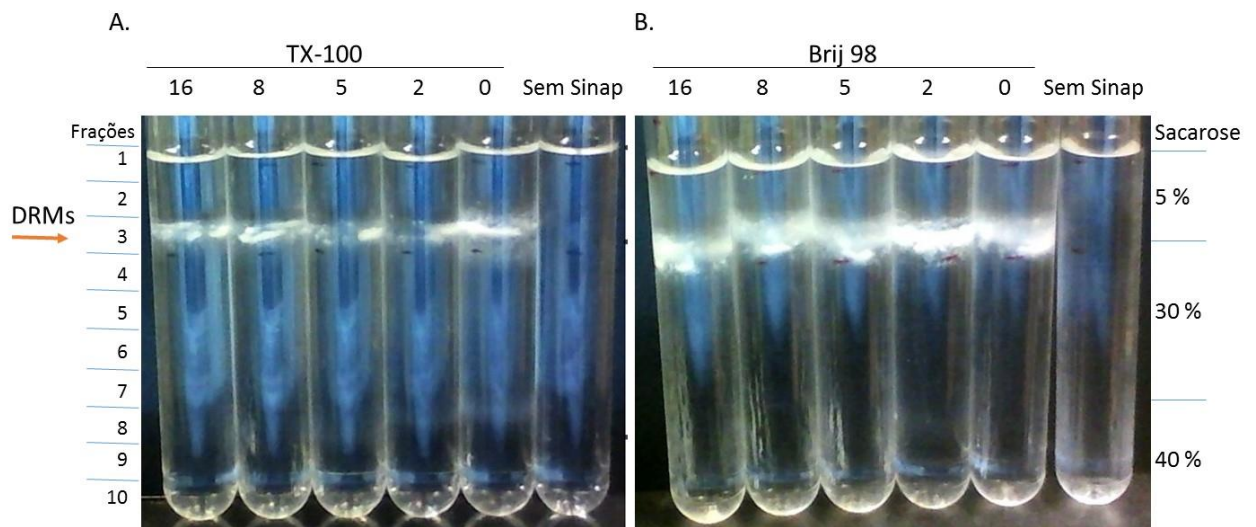


Figura 21. Aspecto do gradiente de sacarose após ultracentrifugação das membranas sinaptossomais a 4 °C tratadas com TX-100 (A) ou Brij 98 (B) nas concentrações de 16, 8, 5, 2 mM e 0 mM (controle positivo), e sem membrana sinaptossomal (Sem Sinap, controle negativo). As DRMs foram separadas da fração 3 (seta).

O efeito da concentração dos detergentes sobre a quantidade de colesterol e proteína dos DRMs de células íntegras foi analisado. Os resultados da Figura 22 expressam os valores médios de 3 experimentos independentes, com a quantidade de colesterol e proteínas totais das membranas tratadas com TX-100 (Figura 22A e B) e com Brij 98 (Figura 22C e D), nas 10 frações coletadas após a ultracentrifugação das amostras em gradiente de sacarose (Figura 21).

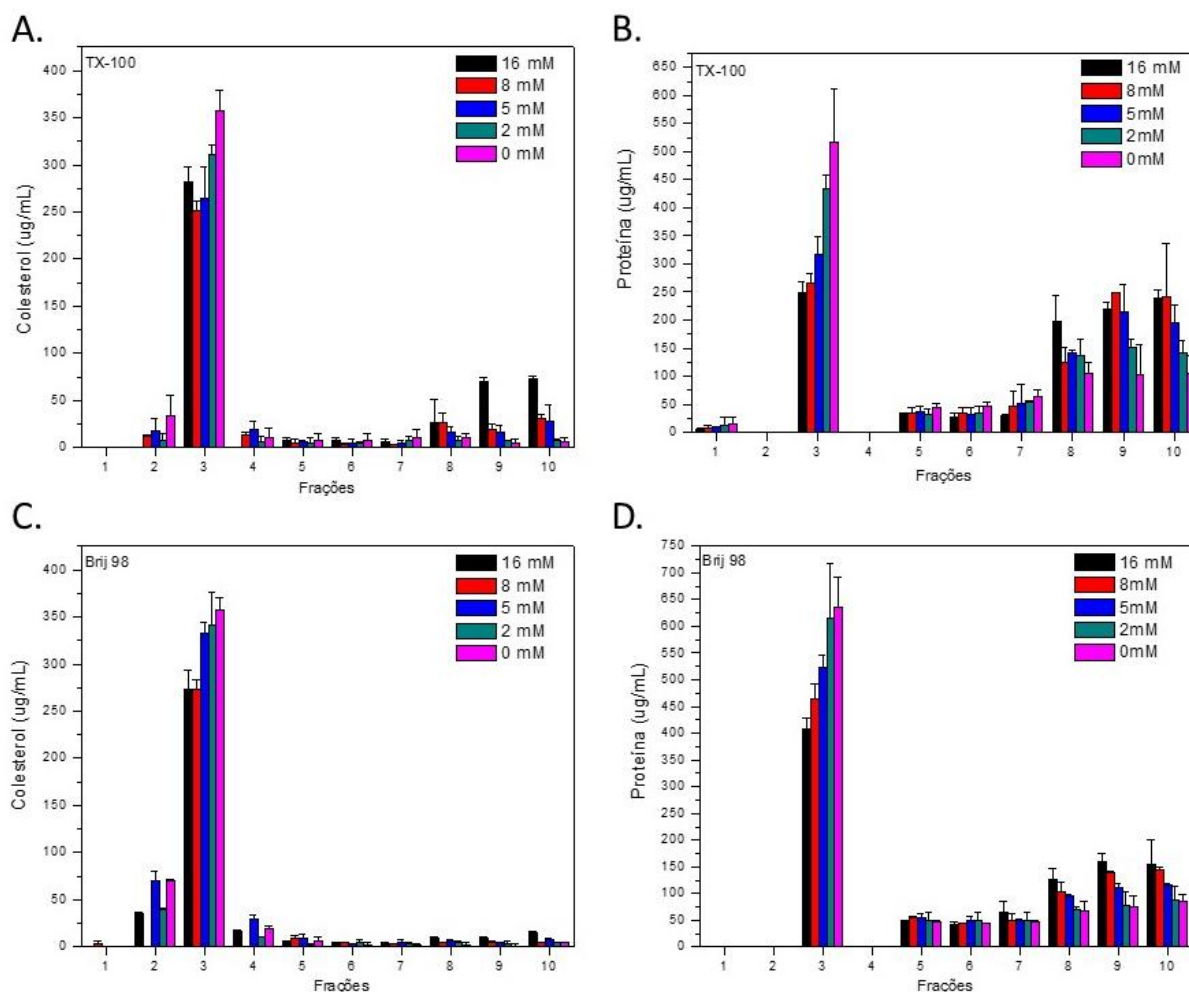


Figura 22. Quantificação de colesterol (A e C) e proteínas totais (B e D) nas 10 frações coletadas após ultracentrifugação das membranas sinaptossomais tratadas com diferentes concentrações (2 a 16 mM) de TX-100 (A e B) e Brij 98 (C e D), a 4 °C. As DRMs foram isoladas da fração 3; (n=3).

De acordo com as dosagens de colesterol e proteína (Figura 22), nota-se que quanto menor a quantidade de detergente, maior a quantidade de material encontrado na fração 3 (DRMs). Nas concentrações maiores de detergente, nota-se também um aumento da quantidade, principalmente de proteínas, encontradas nas últimas frações, indicando uma solubilização parcial dos componentes da membrana, decorrente a um aumento da concentração de detergente. Então, optamos por continuar os estudos usando 16 mM de TX-100 e 8 mM de Brij 98 que, em ambos os casos equivalem a 1% de detergente, a mesma concentração adotada para o preparo de DRMs de sinaptossomas de cérebro de rato (Gil et al., 2006; Cubí et al., 2013).

4.3.4. Caracterização de DRMs sinaptossomais

Após a escolha da melhor concentração de M β CD e de detergente para isolamento das frações resistentes, as membranas sinaptossomais, íntegras ou com conteúdo reduzido de colesterol (redução de 50 % do colesterol inicial), foram tratadas com 16 mM de TX-100 ou 8 mM de Brij 98, por 30 minutos a 4 ou a 37 °C; após isso, as amostras foram submetidas à ultracentrifugação em gradiente de sacarose, por 4 horas a 4 °C.

Além do efeito modulador do colesterol e de sua importância na estabilidade da fase L_o, a temperatura é outro fator importante na solubilização membranar. Recentemente, demonstramos que em GUVs de lipídios extraídos de membranas eritrocitárias, o aumento da temperatura favorecia a solubilização por TX-100 (Casadei et al., 2014b), enquanto as DRMs, de eritrócitos íntegros, preparadas a partir de TX-100 a 4 e 37 °C não apresentaram diferença estatística significativa em sua composição lipídica (Casadei et al., 2014a). Essa diferença entre o efeito encontrado em GUVs de lipídios extraídos de membrana eritrocitária e DRMs de membranas eritrocitárias íntegras tratadas com TX-100 pode ser explicada pela presença de proteínas, nas últimas. Já para o detergente Brij 98, o aumento da temperatura induziu a uma maior solubilização do colesterol na membrana eritrocitária íntegra (Casadei et al., 2014a). Assim, nesta etapa, determinamos e comparamos a composição das DRMs de membranas sinaptossomais (íntegras ou com conteúdo reduzido de colesterol), preparadas a 4 °C e 37 °C.

O efeito dos detergentes em isolar DRMs a partir de membranas íntegras (DRMs controle) ou com conteúdo diminuído de colesterol (tratadas com 20 mM M β CD, correspondente a 50 % diminuição do conteúdo de colesterol) a 4 °C pode ser observado na Figura 23. Resultados semelhantes foram obtidos com as amostras preparadas a 37 °C, indicando que a temperatura não é um fator crítico para obtenção das DRMs de membranas sinaptossomais, assim como não foi empecilho para a obtenção de DRMs de membranas eritrocitárias (Domingues et al., 2010; Casadei et al., 2014a).

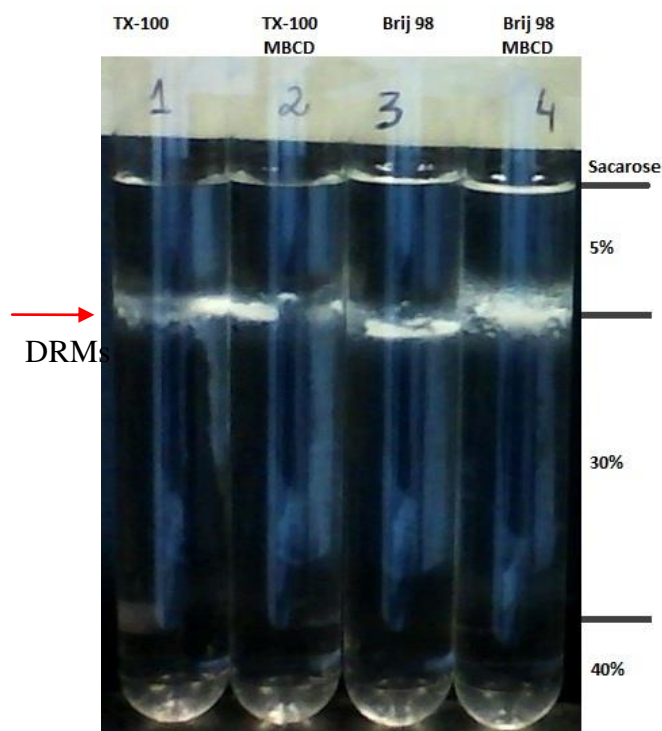


Figura 23. Centrifugação em gradiente de sacarose de amostras de sinaptossomas íntegros ou depletados de colesterol, tratados com TX-100 ou Brij 98 (1%), à 4 °C. A seta indica a fração de DRMs, com densidade de 1,09 a 1,12 g/mL, encontrada entre a interface da solução de 5 e 30% de sacarose. MβCD indica a ciclodextrina utilizada para remoção de 50 % do colesterol das membranas antes do tratamento com detergente

A quantificação de proteínas, colesterol e fosfolípidios foi realizada nas frações contendo as DRMs, assim como a visualização das vesículas por microscopia eletrônica de transmissão (MET), perfil eletroforético (SDS-PAGE), Western Blot, cromatografia em camada delgada de alta definição (HPTLC) e ressonância paramagnética eletrônica (RPE), que serão descritas, a seguir.

A quantidade de colesterol, proteínas e fosfolípidios da membrana sinaptossomal íntegra e com conteúdo reduzido de colesterol, e das DRMs obtidas delas foi avaliada. Os resultados da Figura 24 expressam os valores médios, obtidos de 3 experimentos independentes.

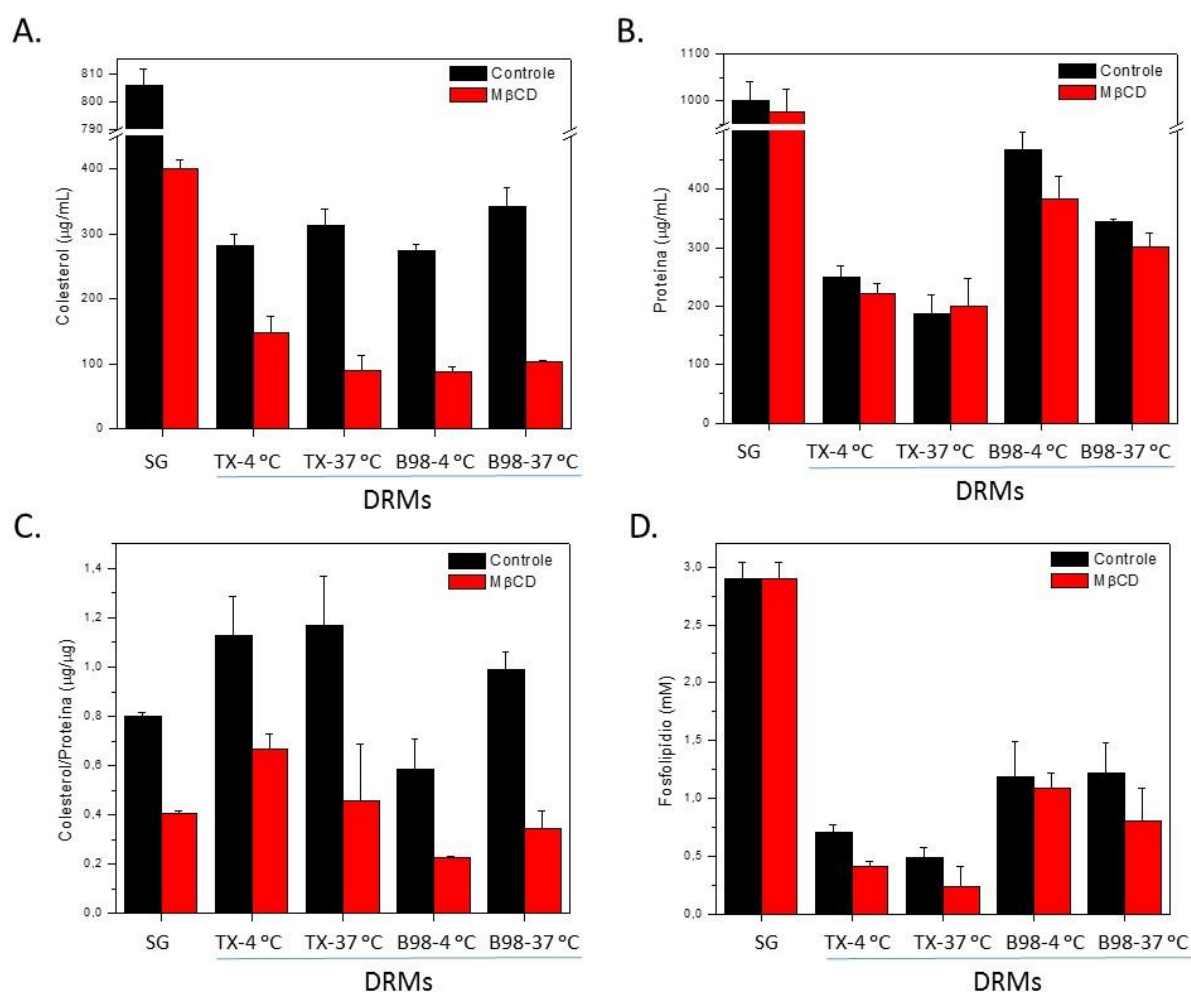


Figura 24. Quantificação de colesterol (A), proteínas (B) e fosfolípidios (B), e da razão colesterol/proteínas, m:m (C): na membrana sinaptossomal (SG) e DRMs de TX-100 ou Brij 98, preparadas à 4 °C ou 37 °C, a partir de sinaptossomas íntegros (controle) ou tratados com MβCD (MβCD), n = 3.

Aproximadamente 35 % do conteúdo de colesterol das membranas sinaptossomais foi encontrado nas DRMs controle de TX-100 preparadas a 4 e 37 °C e nas DRMs controle de Brij 98 preparadas a 4 °C; o restante do colesterol foi detectado nas últimas frações do gradiente (fração de membrana solubilizada), como mostrado na Figura 24A. Já para as DRMs controle de Brij 98 preparadas à 37 °C, foi encontrado cerca de 42 % do colesterol. De fato, a temperatura afeta a solubilização do colesterol pelo Brij 98, como também observado com DRMs de membrana eritrocitária (Casadei et al., 2014a).

Comparando as diferentes temperaturas testadas (4 e 37 °C), a 37 °C, além do aumento da concentração de colesterol ($p < 0,01$, *test T de student*), houve uma redução do conteúdo de proteínas nas DRMs de Brij 98 ($p < 0,001$, *test T de student*) evidenciando uma solubilização preferencial de proteínas e resistência do colesterol pelo Brij 98 à 37 °C. Já para

o TX-100, o aumento da temperatura induziu uma maior solubilização de proteínas ($p < 0,05$, *test T de student*) e fosfolipídios ($p < 0,01$, *test T de student*), enquanto para o colesterol, esse efeito não foi observado ($p > 0,05$, *test T de student*), indicando uma solubilização preferencial de proteínas e fosfolipídios, dependente de temperatura, pelo TX-100.

Quando a ação dos detergentes foi comparada, as DRMs de Brij apresentaram 1,8 vezes mais proteínas, nas DRMs preparadas a 4 e 37 °C, (Figura 24B) e 1,7 (nas DRMs preparadas a 4°C) e 2,4 (nas DRMs preparadas a 37 °C) vezes mais fosfolipídios (Figura 24D), em comparação com as DRMs de TX-100 ($p < 0,001$, *test T de student*).

A remoção do conteúdo de colesterol por M β CD reduziu o conteúdo de colesterol nas DRMs de TX-100 preparadas a 4 °C (43 %), e 37 °C (75 %) e na DRMs de Brij 98 preparadas a 4 °C (72 %) e 37 °C (67 %) em relação ao conteúdo total contido nas membranas sinaptossomais. A remoção do colesterol afetou, principalmente, a quantidade de fosfolipídios encontrados nas DRMs de TX-100 e de proteínas nas DRMs de Brij 98, tanto à 4 quanto à 37 °C, indicando que a redução do conteúdo de colesterol facilita a solubilização de fosfolipídios e proteínas nas membranas sinaptossomais, por TX-100 e Brij 98, respectivamente.

Uma das principais características de DRMs é o aumento da razão colesterol/proteínas em relação a membrana original. O enriquecimento de colesterol em DRMs tem sido encontrado tanto em membranas modelo, quanto em membranas biológicas. Recentemente, foi proposto por Ahyayauch e col. (2009) que a resistência de membranas à detergentes é devida, principalmente, à formação de complexos colesterol-esfingolipídio que possuem uma curvatura espontânea negativa, ao contrário de outros lipídios que, assim, sofreriam solubilização. Naquele estudo, com membranas modelo compostas de PC, SM e colesterol, foi demonstrado que a solubilização de esfingomielina por detergente é diminuída na presença de colesterol.

As DRMs de TX-100 apresentaram um aumento de 1,5 vezes na razão colesterol/proteínas em relação às membranas sinaptossomais íntegras (Figura 24C). No entanto, em DRMs de Brij 98 preparadas a 4 °C essa razão foi um pouco menor (0,75 vezes) que a obtida para membranas sinaptossomais íntegras. Isso se justifica por haver mais proteínas nas DRMs de Brij 98 (Figura 24B). Portanto, as proteínas de membrana, de um modo geral, parecem oferecer uma resistência relativamente menor a solubilização por TX-100 do que a Brij 98.

A Tabela 3 mostra os dados absolutos, do conteúdo proteico e lipídico e razão colesterol/lipídio medido nos sinaptossomas e suas frações. O rendimento lipídico das DRMs

de TX-100 (~ 25 %) e DRMs de Brij 98 (~ 40 %) foi muito semelhante ao encontrado pelas DRMs de membranas eritrocitárias preparadas a partir de ambos detergentes (Casadei, 2011).

Tabela 3. Conteúdo proteico e lipídico (de fosfolipídios, PL, e colesterol, Col) das membranas sinaptossomais (SG) e de suas DRMs, obtidas a partir de membranas íntegras (Controle ou C) ou com conteúdo reduzido de colesterol (M β CD) com uso de Brij 98 e TX-100, à 4 e à 37 °C.

				Proteínas (μ g/mL)	PL (mM)	Col (mM)	Lipídios totais (mM)	Razão Col/lipídios totais
SG	Controle			1000 $\pm$ 40,3	2,8 $\pm$ 0,2	2,1 $\pm$ 0,0	5,0	0,42
	M β CD			978 $\pm$ 46,4	2,8 $\pm$ 0,1	1,0 $\pm$ 0,0	3,8	0,26
DRMs	TX-100	4°C	C	249,3 $\pm$ 20,1	0,7 $\pm$ 0,1	0,7 $\pm$ 0,0	1,4	0,50
			M β CD	221,5 $\pm$ 18,1	0,4 $\pm$ 0,0	0,4 $\pm$ 0,0	0,8	0,50
		37°C	C	186,5 $\pm$ 32,1	0,5 $\pm$ 0,1	0,8 $\pm$ 0,1	1,3	0,61
			M β CD	200,3 $\pm$ 46,3	0,2 $\pm$ 0,1	0,2 $\pm$ 0,1	0,4	0,50
	Brij 98	4°C	C	467,2 $\pm$ 30,1	1,2 $\pm$ 0,2	0,7 $\pm$ 0,0	1,9	0,37
			M β CD	384,1 $\pm$ 37,2	1,1 $\pm$ 0,1	0,2 $\pm$ 0,0	1,3	0,15
		37°C	C	344,6 $\pm$ 5,3	1,2 $\pm$ 0,2	0,9 $\pm$ 0,1	2,1	0,43
			M β CD	302,2 $\pm$ 22,6	0,8 $\pm$ 0,3	0,3 $\pm$ 0,0	1,1	0,27

Perfil eletroforético e *western blot* das DRMs sinaptossomais

O uso de diferentes detergentes e temperaturas no preparo das DRMs pode levar a inclusão/exclusão de proteínas destas (Pike et al., 2005; Domingues et al., 2010), incluindo-se as proteínas marcadoras de *lipid rafts* (Domingues et al., 2010). Medidas de eletroforese monodimensional (SDS-PAGE) foram feitas na tentativa de caracterizar, qualitativamente, o conteúdo proteico das DRMs. O perfil das 10 frações coletadas após ultracentrifugação de membranas sinaptossomais, íntegras ou com conteúdo reduzido de colesterol e tratadas à 4 ou 37 °C, encontram-se nas Figura 25 (TX-100) e 26 (Brij 98)Figura 25, sendo que a fração 3 corresponde àquela com as DRMs.

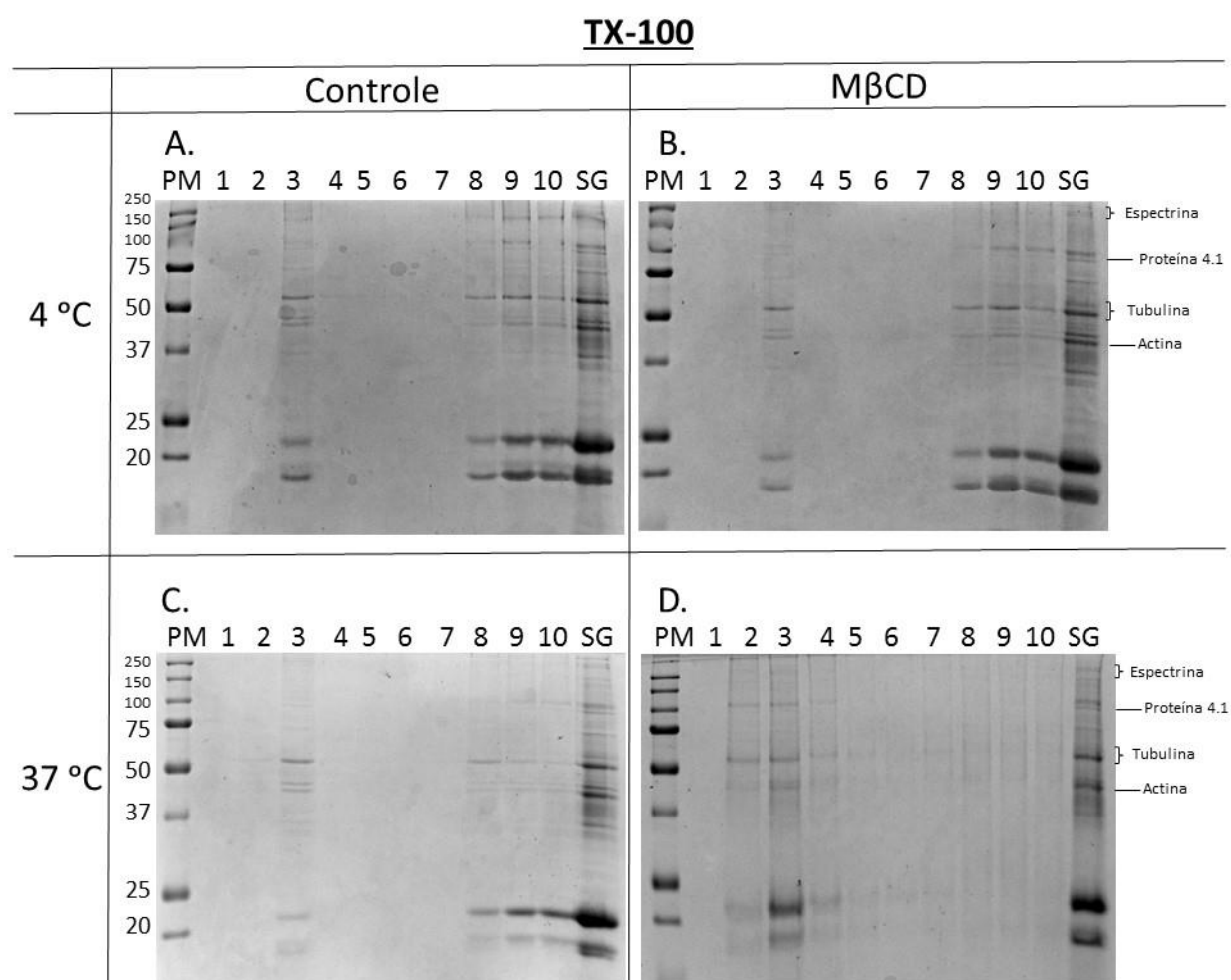


Figura 25. Perfil eletroforético das 10 frações coletadas (colunas 1 a 10) em gradiente de sacarose das membranas sinaptossomais (SG) tratadas com **TX-100** à 4 (A e B) ou 37 °C (C e D) íntegras (A e C) ou com conteúdo reduzido de colesterol (B e D). PM: padrão de massa molecular (kDa).

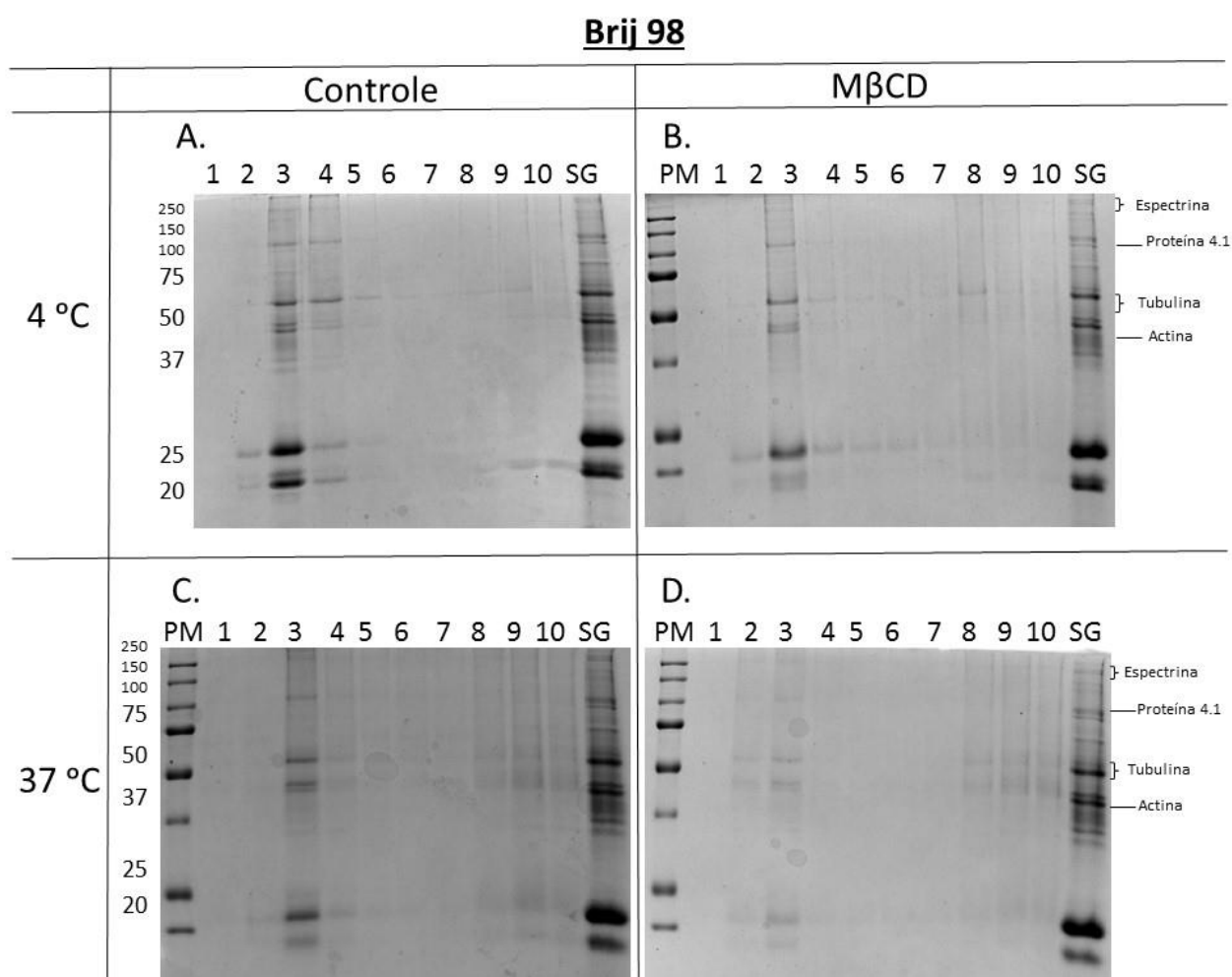


Figura 26. Perfil eletroforético das 10 frações coletadas (colunas 1 a 10) em gradiente de sacarose, das membranas sinaptossomais (SG) tratadas com **Brij 98** à 4 (A e B) ou 37 °C (C e D) íntegras (A e C) ou com conteúdo reduzido de colesterol (B e D). PM: padrão de massa molecular (kDa).

As principais bandas identificadas na eletroforese monodimensional das membranas sinaptossomais foram aquelas em 250, 230, 101, 59, 55 e 45 kDa. Essas bandas apresentam peso similar aos das proteínas que compõem o citoesqueleto da membrana sinaptossomal: espectrina (subunidades α = 250 kDa e β = 230 kDa), proteína 4.1 (101 kDa), tubulina (subunidades α = 59 kDa e β = 55 kDa) e actina (45 kDa). A tubulina é uma proteína essencial na zona pré-sináptica, além de ser a mais abundante nos sinaptossomas; suas subunidades α e β se associam e formam os microtúbulos que possuem função estrutural e agem como sítio de ligação para outras proteínas. A proteína 4.1 interage com a actina e espectrina e é responsável pela organização dos componentes da bicamada lipídica, pela durabilidade e deformação da membrana plasmática (Weingarten et al., 2014). Em trabalhos anteriores (Ciana et al., 2005; Crepaldi Domingues et al., 2009; Domingues et al., 2010;

Casadei et al., 2014) demonstramos a associação de proteínas do citoesqueleto aos *rafts*, através de interação eletrostática.

A proteína 4.1 e a espectrina, foram encontradas em todas as DRMs. A actina foi solubilizada diferentemente pelos detergentes utilizados: ela foi encontrada exclusivamente na fração 3 quando as células foram lisadas com Brij 98; o TX-100 a solubilizou parcialmente, sendo encontrada nas frações 3, 8, 9 e 10. A interação entre *rafts* e citoesqueleto também foi proposta para eritrócitos anteriormente (Ciana et al., 2005; Crepaldi Domingues et al., 2009, Casadei et al., 2014).

Para completar a análise qualitativa das proteínas presentes nas diferentes DRMs estudadas, medidas de *Western blot* foram conduzidas, na tentativa de identificar a proteína flotilina-2, uma proteína marcadora de *lipid rafts*. Para comparação, foram aplicadas 25 µL das 10 frações coletadas após ultracentrifugação. Como mostra a Figura 27 detectou-se flotilina-2 em todas as preparações de DRMs testadas; no entanto, visualmente há diferenças no conteúdo dessa proteína entre as DRMs, que particionam entre a fração 3 (DRMs) e 10 (fração solubilizada pelos detergentes). Nas DRMs controle, preparadas à 4 °C, a flotilina-2 aparece exclusivamente na fração 3. A redução do conteúdo de colesterol e o aumento da temperatura afetaram a solubilização da flotilina-2, que foi detectada na fração 3 e na fração 10. Este resultado indica que a estabilidade da flotilina-2 é dependente de colesterol e da temperatura. O efeito da remoção do colesterol sobre a estabilidade da flotilina-2 também foi encontrado em DRMs de membranas eritrocitárias, preparadas a partir de TX-100 e Brij 98 (Domingues et al., 2010; Casadei et al., 2014a).

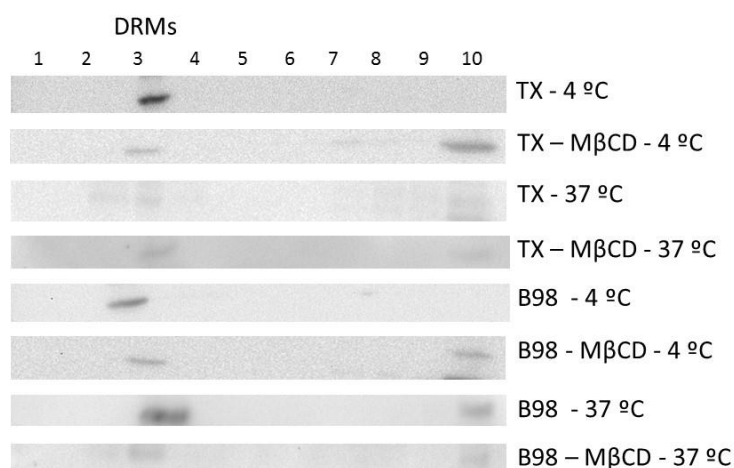


Figura 27. Detecção por *western blot* da proteína marcadora de *lipid rafts* flotilina-2, nas 10 frações coletadas após tratamento das membranas sinaptossomais com os detergentes TX-100 e Brij 98, e separação em gradiente de sacarose.

Cromatografia em camada delgada de alta eficiência (HTLC)

Embora o comportamento de fases de diversos lipídios em membranas modelo venha sendo explorado (Almeida, 2009; Wydro, 2011a; Wydro, 2011b), é particularmente interessante analisar o comportamento dos esfingolipídios (esfingomielina, SM) e do colesterol, que são os principais responsáveis pela fase líquido ordenada dos *lipid rafts*, além dos principais glicerofosfolipídios: PC, PE e PS.

Alguns trabalhos na literatura evidenciaram menor tendência do Brij 98 em solubilizar fosfolipídios localizados na monocamada interna das membranas e conservar a assimetria da membrana (Schuck et al., 2003; Quinn, 2010). Como poucos estudos tem explorado as características das DRMs de membranas sinaptossomais, pouco se sabe sobre sua composição lipídica diferencial. Dessa forma, para identificação dos principais tipos de fosfolipídios conduzimos medidas de HPTLC nos lipídios extraídos com solvente.

Nas placas de HPTLC foram aplicadas amostras com cerca de 10^{-4} M de lipídios (concentração determinada pela dosagem de fosfolipídios). As principais bandas encontradas em DRMs de Brij foram: SM, PC, PE e PS. A distribuição dos fosfolipídios está expressa em $\mu\text{g } \%$, devido a diversidade de cadeias acilas presentes nesses fosfolipídios (Figura 28).

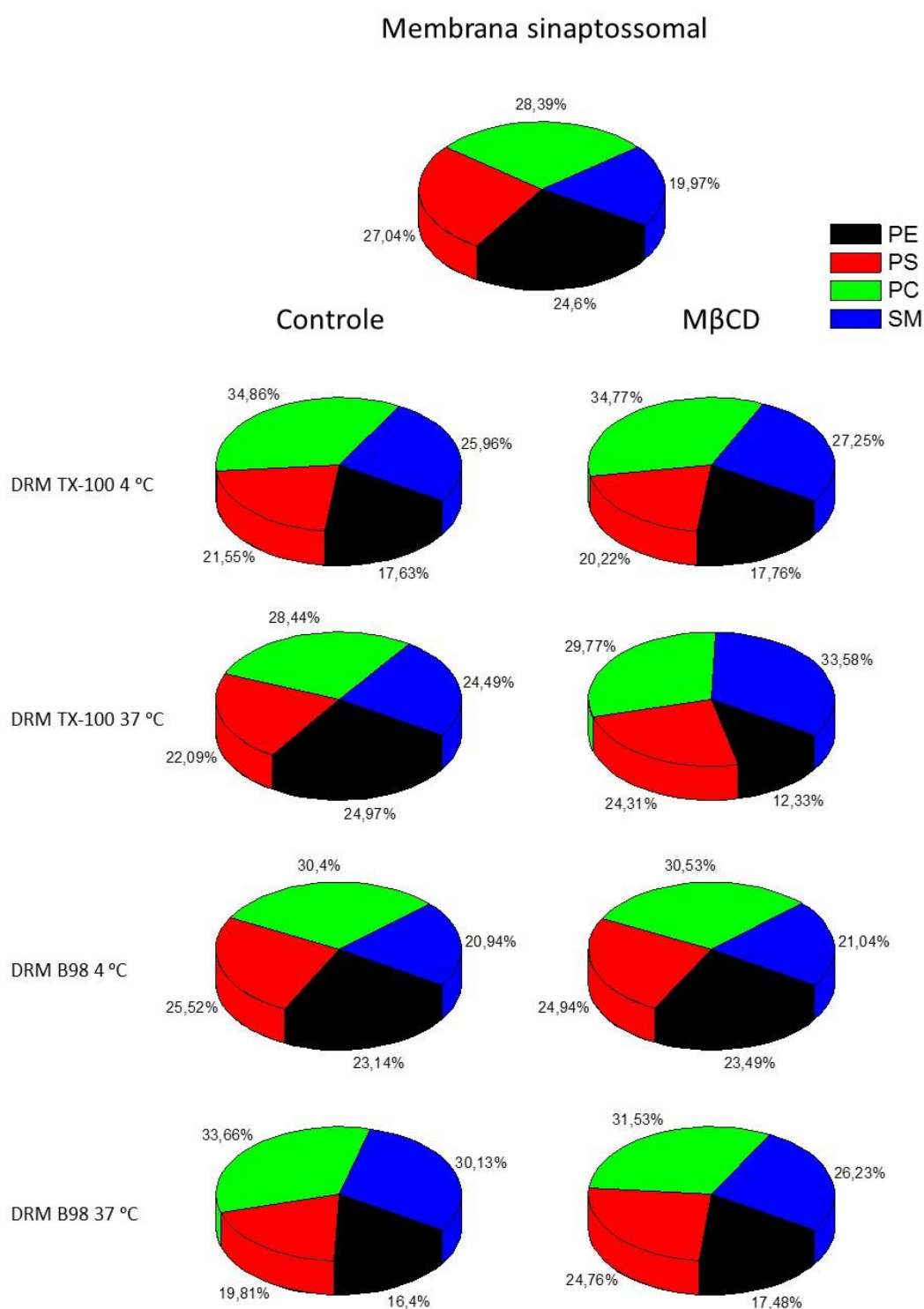


Figura 28. Distribuição dos fosfolipídios (SM, PC, PE e PS) da membrana sinaptossomal e DRMs de TX-100 e Brij 98 preparadas a partir de membranas sinaptossomais íntegras (controle) ou com o conteúdo reduzido de colesterol (MβCD), obtidas à 4 ou 37 °C, detectados por HPTLC. Os valores estão expressos em $\mu\text{g } \%$ e correspondem a uma média de 3 experimentos independentes. $n = 3$.

Foi observado um enriquecimento no teor de SM nas DRMs de TX-100 ($> 24 \%$); esse enriquecimento também foi observado em DRMs de Brij preparadas a 37 °C.

Diferentemente do esperado, DRMs de Brij 98 preparadas a 4 °C apresentaram uma distribuição de SM e glicerofosfolipídios bem similar à encontrada na membrana sinaptossomal.

Na membrana sinaptossomal, PE e PS são lipídios localizados principalmente na monocamada interna (80% do total de PE e 100% das PS estão presentes no lado citossólico da bicamada) (Sackmann, 1995). Assim como observado em outros estudos (Schuck et al., 2003; Pike et al., 2005; Casadei et al., 2014a), os fosfolipídios da monocamada interna (PE e PS) foram mais resistentes ao Brij do que ao TX-100, nas DRMs preparadas a 4 °C. Enquanto a razão PC:PE variou entre 1-1,3 para DRM de Brij a 4 °C, essa razão foi de 2,2 para DRM de TX-100 (Figura 28). Esses resultados indicam que a habilidade de solubilizar lipídios da monocamada interna não é a mesma para todos os detergentes e sim uma característica particular de cada composto surfatante. Segundo Pike et al. (2005), os lipídios da monocamada interna seriam menos estáveis que os da monocamada externa, devido à ausência ou diminuição de interações entre esfingolipídios e colesterol, já que SM distribui-se preferencialmente na monocamada externa das biomembranas e não estaria presente na monocamada intracelular de *lipid rafts* (Niu & Litman, 2002; Pike et al., 2005). Além disso, o TX-100 possui a habilidade de se translocar (*flip-flop*) para a monocamada interna, o que poderia justificar a solubilização dos lipídios da monocamada interna. Esses resultados também foram encontrados nas DRMs de membrana eritrocitária, onde Brij 98 solubilizou preferencialmente lipídios da monocamada externa (Casadei et al., 2014a). Pike & cols. (2005) também demonstraram que DRMs de células CHO lisadas com TX-100 apresentaram grande proporção de esfingomielina, comparativamente à membrana original, enquanto que DRMs de Brij 98 eram menos enriquecidos em esfingomielina que as DRMs de TX-100.

Determinação da morfologia e do tamanho das DRMs de sinaptossomas

A morfologia das DRMs de sinaptossomas, revelada por MET pode ser observada na Figura 29. As DRMs apresentaram formas circulares e superfícies regulares. O tratamento prévio das membranas sinaptossomais com M β CD, para remoção de parte do colesterol, não alterou a morfologia das DRMs.

Utilizamos também medidas de espalhamento de luz (*dynamic light scattering* - DLS) para determinar o diâmetro médio das vesículas de DRMs obtidas a partir das membranas sinaptossomais. As medidas foram realizadas através da análise multimodal e os resultados foram registrados pelo número de partículas (Tabela 4).

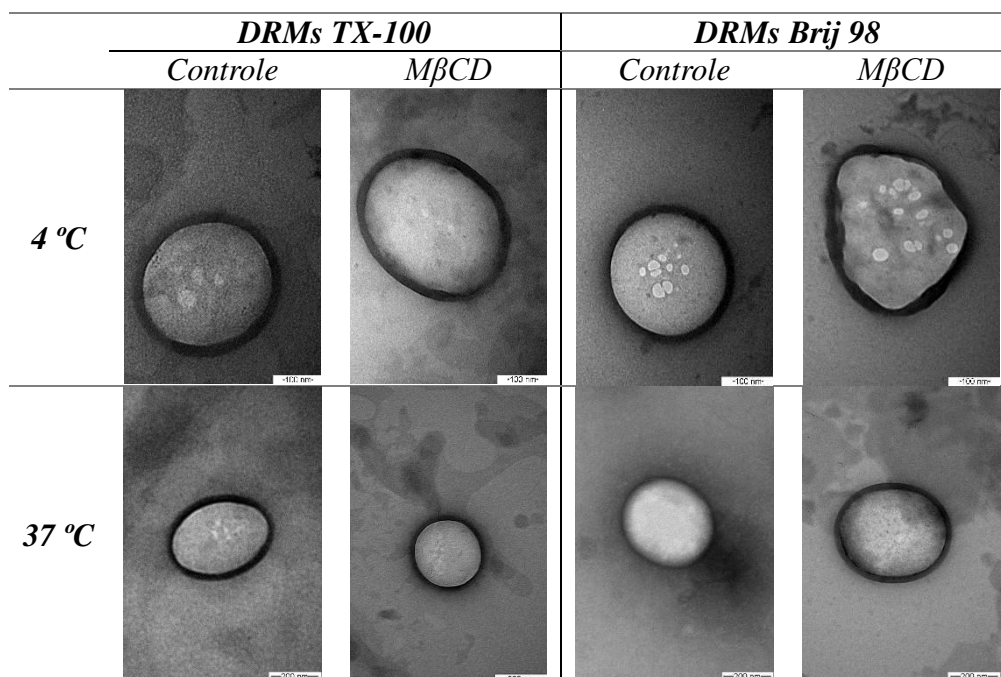


Figura 29. Fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de transmissão das amostras de DRMs de TX-100 e Brij 98, preparadas à 4 °C ou 37 °C, a partir de membrana sinaptossomal íntegra (controle) ou tratada com MβCD. As imagens foram obtidas com aumento de 77.500 e 60.000x (para as vesículas preparadas a 4 °C e 37 °C, respectivamente).

Tabela 4. Diâmetro médio das vesículas de DRMs de TX-100 e Brij 98 preparadas a 4 °C ou 37 °C, a partir de membrana sinaptossomal íntegra (controle) ou tratada com MβCD, n=3. Medidas de espalhamento de luz dinâmico.

				Diâmetro (nm)	% da população	Polidispersão
Membrana sinaptossomal	Controle			461,1 ±47,8	95,7	0,4
	MβCD			494,8 ±63,0	97,2	0,5
DRMs	TX- 100	4 °C	Controle	268,6 ±55,8	93,3	0,4
			MβCD	114,8 ±21,4	87,4	0,5
		37°C	Controle	184,4 ±40,6	96,6	0,4
			MβCD	146,9 ±40,6	87,6	0,4
	Brij 98	4 °C	Controle	201,1 ±39,8	99,9	0,3
			MβCD	112,6 ±15,0	87,7	0,5
		37°C	Controle	169,3 ±28,5	97,1	0,6
			MβCD	147,6 ±23,4	96,9	0,6

As DRMs controle, preparadas a partir de membranas sinaptossomais íntegras, apresentaram diâmetro médio de aproximadamente 200 nm. Trabalhos na literatura têm

descrito os *lipid rafts* como estruturas membranares com tamanhos variáveis entre 10-200 nm (Pike, 2006; Rajendran et al., 2010). Che e Lawrence (2009) encontraram diâmetros semelhantes em cérebro de rato (130 – 380 nm). Apesar da diferença na composição, não observamos diferenças estatísticas significativas entre as DRMs obtidas a partir de diferentes detergentes ou a diferentes temperaturas ($p > 0,05$, *test T de Student*).

As DRMs obtidas a partir de membranas sinaptossomais com conteúdo reduzido de colesterol (tratadas com M β CD) apresentaram diâmetro menor (63% daquele das DRMs preparadas a partir de membranas íntegras), o que reflete a diminuição do conteúdo de colesterol e fosfolipídios nas DRMs de TX-100 e colesterol e proteínas nas DRMs de Brij 98, como mostrado na Figura 24.

Medidas de ressonância paramagnética eletrônica (RPE) em membras sinaptossomais e DRMs

Para avaliar o empacotamento dos lipídios presentes nas DRMs de sinaptossomas empregamos a técnica de ressonância paramagnética eletrônica (RPE), com uso dos marcadores de spin 5-SASL (que monitora a cadeia acila dos fosfolipídios de membrana, na região mais próxima ao glicerol) e 16-SASL (que monitora região mais hidrofóbica, próxima ao centro da bicamada lipídica).

As medidas foram realizadas em 3 temperaturas: 4, 22 e 37 °C. Essas temperaturas foram selecionadas porque as DRMs foram isoladas a 4 ou 37 °C e para compararmos os resultados com medidas realizadas à 22 °C (temperatura ambiente). Os marcadores foram incorporados numa proporção de 1 mol%, em relação ao total de lipídios, para evitar interferência dos mesmos no grau de organização das membranas (ver item 3.4.9).

A Figura 30 mostra os espectros obtidos com o marcador 5-SASL incorporado nas membranas sinaptossomais, íntegras ou com conteúdo reduzido de colesterol, e nas DRMs de TX-100 e Brij 98 preparadas a partir das mesmas, a 4 e 37 °C. Como já descrito na Figura 19, os espectros do marcador em sinaptossomas (e também nos DRMs destes) apresentam duas componentes, uma mais rígida que corresponde ao sinal do marcador incorporado entre os lipídios da bicamada (sinais alargados) e uma livre, que corresponde ao sinal do marcador em solução (com movimento isotrópico que justifica os picos estreitos). As mesmas componentes (móvel e imobilizada) foram detectadas com o uso do marcador 16-SASL, porém com sinais bem mais isotrópicos, refletindo o menor grau de organização molecular no (interior da bicamada) ambiente monitorado pelo 16-SASL (Figura 31).

Para os espectros do marcador 5-SASL (Figura 30), o parâmetro de análise escolhido foi o máximo desdobramento hiperfino ($2A_{\max}$ - ver item 3.4.9), devido à alta anisotropia do espectro registrado com as amostras a 4 °C (dados mostrados na Figura 32A). Valores maiores de $2A_{\max}$ indicam maior anisotropia do marcador, refletindo um maior grau de ordem/empacotamento lipídico.

Nos espectros do marcador 16-SASL (Figura 31) avaliamos a razão entre as alturas dos picos de campo baixo e central (h_{+1}/h_0) em função da temperatura (dados mostrados na Figura 32B). Este parâmetro foi escolhido pela falta de resolução espectral devida à menor anisotropia dos sinais marcador nas amostras medidas a 37 °C, principalmente nas DRMs de Brij 98 preparadas a partir de membranas sinaptossomais com conteúdo diminuído de colesterol.

Os valores médios e as análises estatísticas do marcador 5-SASL estão expressos na Tabela 5 e do marcador 16-SASL, na Tabela 6.

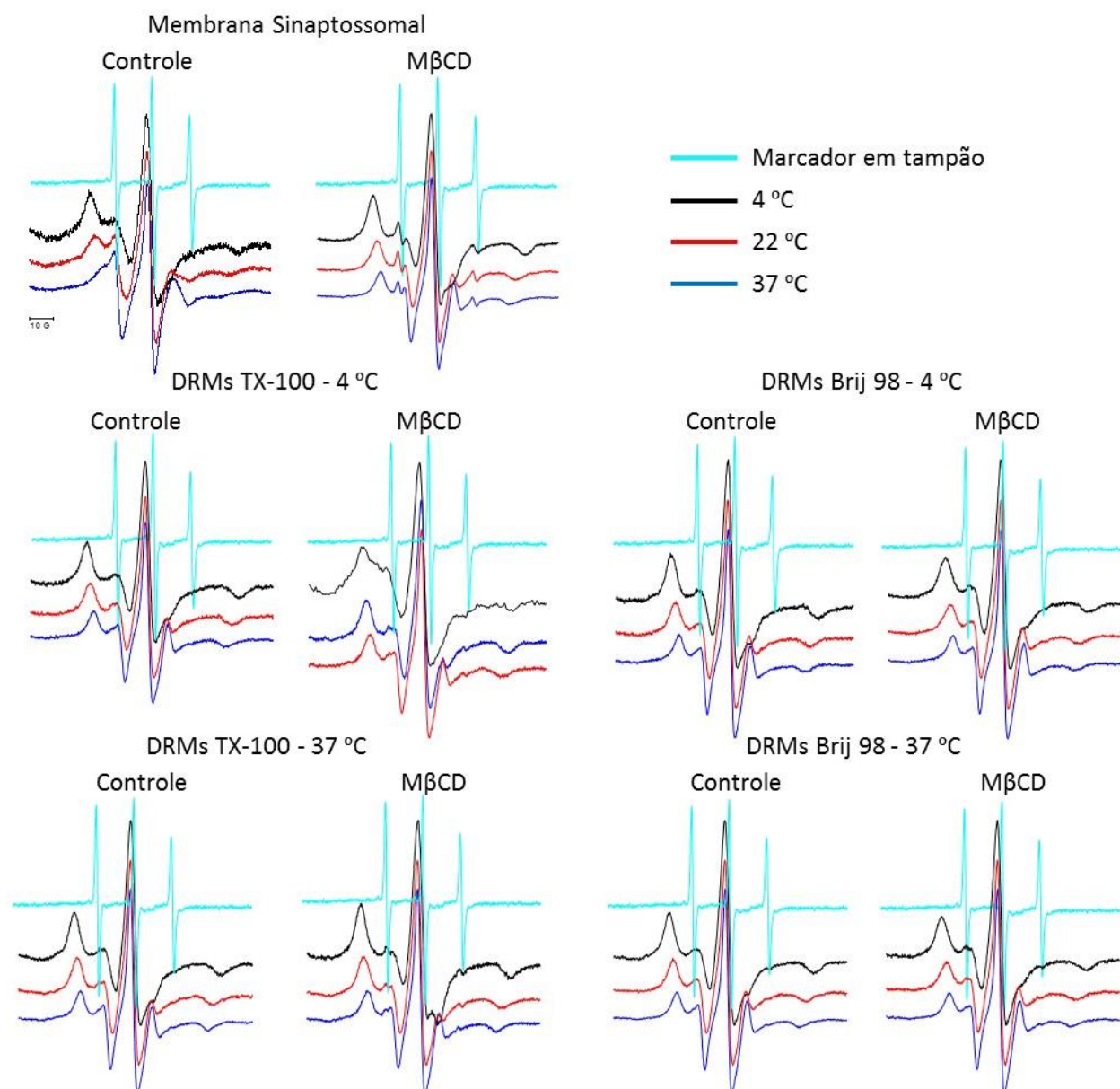


Figura 30. Espectros de RPE medidos à 4, 22 e 37 °C, do marcador de spins **5-SASL** em tampão HEPES e incorporado em membranas sinaptossomais íntegras (controle) e com conteúdo reduzido de colesterol (M β CD) e suas respectivas DRMs, obtidas com uso de TX-100 ou Brij 98, à 4 ou 37 °C.

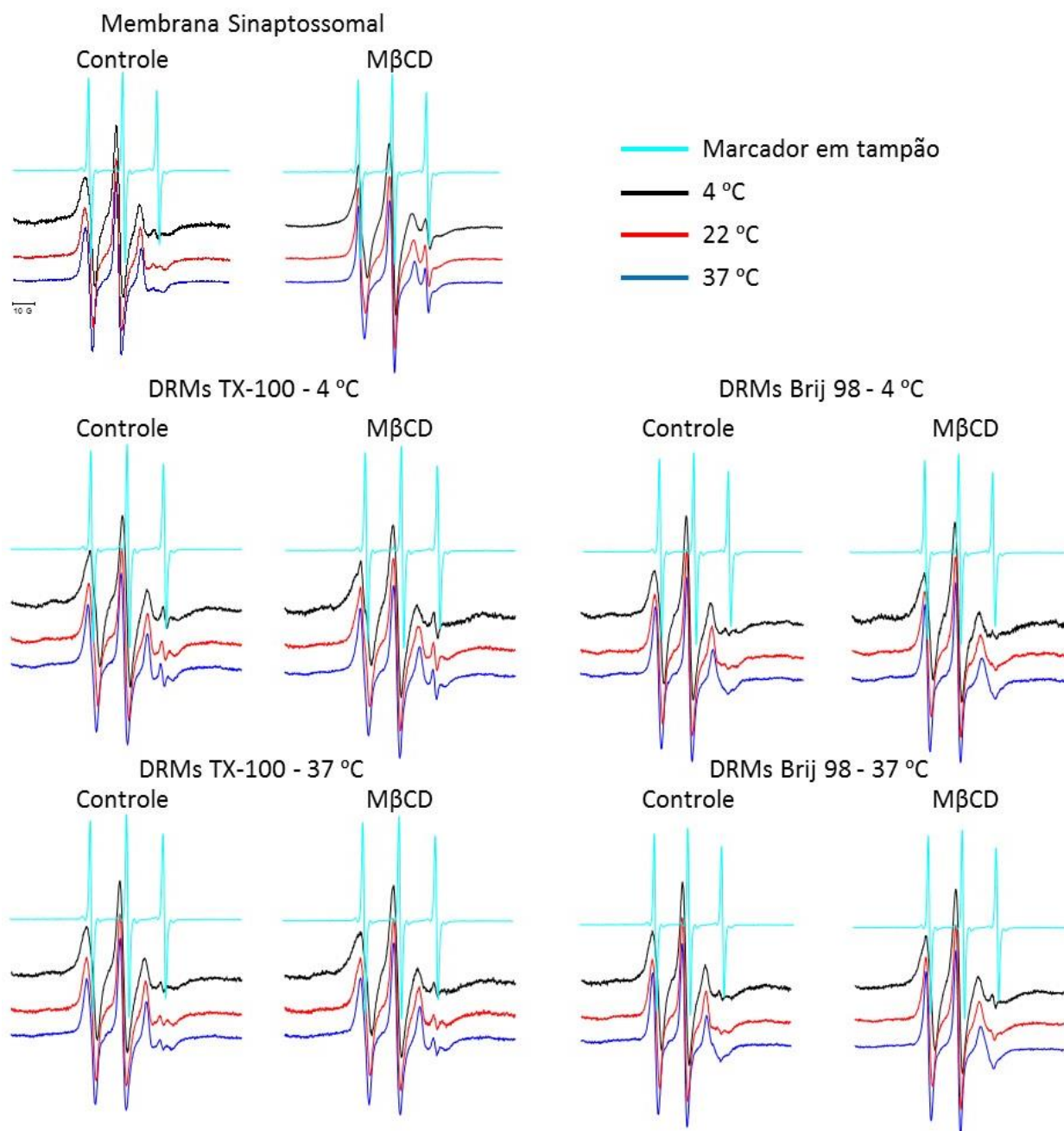


Figura 31. Espectros de RPE medidos à 4, 22 e 37 °C, do marcador de spins **16-SASL** em tampão Hepes e incorporado em membranas sinaptossomais íntegras (controle) e com conteúdo reduzido de colesterol (MβCD) e suas respectivas DRMs, obtidas a partir de TX-100 ou Brij 98, à 4 ou 37 °C.

Pela Figura 32, observa-se que tanto o marcador 5-SASL quanto o 16-SASL detectaram variações significativas nos parâmetros analisados entre as três temperaturas testadas, 4, 22 e 37 °C ($p < 0,01$, *test t de student*). Como esperado, houve menor ordenamento dos lipídios com aumento da temperatura (tanto em membranas íntegras como em DRMs). Isso é esperado, pois a 37 °C a maioria dos lipídios se encontra acima da temperatura de transição de fases (Radhakrishnan et al., 2001).

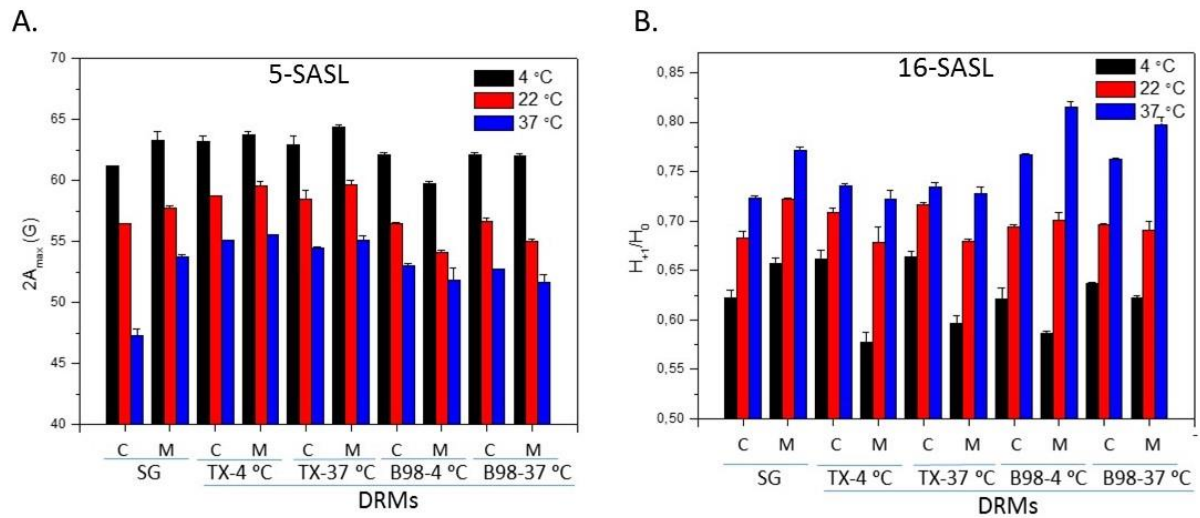


Figura 32. Variação dos parâmetros espectrais medidos por RPE: máximo desdobramento hiperfino ($2A_{\max}$) nos espectros do marcador de spins 5-SASL (A) e razão entre os picos de campo baixo (h_{+1}) e médio (h_0), nos espectros de 16-SASL (B), medidos à 4, 22 e 37 °C em membranas sinaptossomais íntegras (controle, C) e com conteúdo reduzido de colesterol (sequestrado por M β CD, M) e suas respectivas DRMs, obtidas a partir de TX-100 ou Brij 98, à 4 ou 37 °C, $n = 3$.

Tabela 5. Máximo desdobramento hiperfino ($2A_{\max}$) nos espectros do marcador de spins 5-SASL, medidos à 4, 22 e 37 °C em membranas sinaptossomais íntegras (control) e com conteúdo reduzido de colesterol (M β CD) e suas respectivas DRMs, obtidas a partir de TX-100 ou Brij 98, à 4 ou 37 °C. ^a membrana sinaptossomal controle *versus* membrana sinaptossomal M β CD; ^b DRMs controle *versus* DRMs M β CD; ^c membrana sinaptossomal controle *versus* DRMs controle; ^d DRMs TX-100 4 °C *versus* DRMs Brij 4 °C; ^e DRMs TX-100 37 °C *versus* DRMs Brij 37 °C; ***p < 0,001, **p < 0,01; *p < 0,05 (*test T de Student*).

				$2A_{\max}$		
				4 °C	22 °C	37 °C
Membrana sinaptossomal	Controle			61,2 $\pm$ 0,0	56,5 $\pm$ 0,0	47,3 $\pm$ 0,6
	M β CD			63,3 $\pm$ 0,7 ^{a*}	57,7 $\pm$ 0,2	53,8 $\pm$ 0,1 ^{a**}
DRMs	TX-100	4 °C	Control	63,2 $\pm$ 0,4 ^{c*}	58,7 $\pm$ 0,0 ^{c**}	55,1 $\pm$ 0,0 ^{c***}
			M β CD	63,8 $\pm$ 0,2	59,6 $\pm$ 0,4	55,5 $\pm$ 0,1
		37 °C	Control	63,0 $\pm$ 0,7 ^{c*}	58,5 $\pm$ 0,7 ^{c*}	54,5 $\pm$ 0,1 ^{c**}
			M β CD	64,4 $\pm$ 0,1	59,6 $\pm$ 0,4	55,1 $\pm$ 0,4
	Brij 98	4 °C	Control	62,2 $\pm$ 0,2	56,5 $\pm$ 0,1 ^{d**}	53,0 $\pm$ 0,1 ^{c***}
			M β CD	59,8 $\pm$ 0,2 ^{b**}	54,1 $\pm$ 0,2 ^{b**}	51,8 $\pm$ 1,1
		37 °C	Control	62,1 $\pm$ 0,1	56,7 $\pm$ 0,3	52,8 $\pm$ 0,0 ^{c**}
			M β CD	62,0 $\pm$ 0,2	55,0 $\pm$ 0,2 ^{b*}	51,7 $\pm$ 0,6

Tabela 6. Razão entre os picos de campo baixo (h_{+1}) e médio (h_0), nos espectros de 16-SASL, medidos à 4, 22 e 37 °C em membranas sinaptossomais íntegras (control) e com conteúdo reduzido de colesterol (M β CD) e suas respectivas DRMs, obtidas a partir de TX-100 ou Brij 98, à 4 ou 37 °C. ^a membrana sinaptossomal controle *versus* membrana sinaptossomal M β CD; ^b DRMs controle *versus* DRMs M β CD; ^c membrana sinaptossomal controle *versus* DRMs controle; ^d DRMs TX-100 4 °C *versus* DRMs Brij 4 °C; ^e DRMs TX-100 37 °C *versus* DRMs Brij 37 °C; ^f DRMs TX-100 4 °C *versus* 37 °C; **p < 0,01; *p < 0,05 (*test T de Student*).

				h_{+1}/h_0		
				4 °C	22 °C	37 °C
Membrana sinaptossomal	Controle			0,62 ±0,01	0,68 ±0,01	0,72 ±0,00
	M β CD			0,66 ±0,01 ^{a*}	0,72 ±0,00 ^{a*}	0,77 ±0,00 ^{a**}
DRMs	TX100	4 °C	Control	0,66 ±0,01 ^{c*}	0,71 ±0,00 ^{c*}	0,74 ±0,00 ^{c*}
			M β CD	0,58 ±0,01 ^{b**}	0,68 ±0,01	0,72 ±0,01
		37 °C	Control	0,66 ±0,01 ^{c*}	0,72 ±0,00 ^{c*}	0,73 ±0,00
			M β CD	0,60 ±0,01 ^{b**}	0,68±0,00 ^{b**}	0,73 ±0,01
	Brij 98	4 °C	Control	0,62 ±0,01	0,69 ±0,00	0,76 ±0,00 ^{c,d**}
			M β CD	0,59 ±0,00	0,70 ±0,01	0,81 ±0,00 ^{b**}
		37 °C	Control	0,64 ±0,00 ^{e*}	0,70 ±0,00 ^{e**}	0,76 ±0,00 ^{c,e**}
			M β CD	0,62 ±0,00 ^{b*}	0,69 ±0,01	0,8 ±0,00 ^{b*}

O 5-SASL detectou ordenamento dos lipídios da bicamada com a redução do conteúdo de colesterol das membranas sinaptossomais íntegras nas medidas realizadas a 4 e 37 °C (Tabela 6) na região da cadeia acila mais próxima ao glicerol. Este resultado é curioso, pois, como “modulador da fluidez de membranas biológicas”, em membranas em fase L_d , espera-se que o colesterol aumente a orientação geral das cadeias acilas dos fosfolipídios, em relação ao plano da bicamada, preenchendo espaços entre as cadeias acila em conformação *trans-gauche* (Wydro, 2011b); assim, sua depleção deveria causar diminuição da organização molecular (maior fluidez) nas regiões mais superficiais da cadeia acila, diferentemente do observado com o marcador 5-SASL (Figura 32^a e Tabela 5). A 4 °C a diminuição da fluidez que acompanha a diminuição do colesterol, pode estar relacionada com a existência de fase gel (S_o), originada principalmente pelo aumento da proporção de esfingomielinas, após retirada de parte do colesterol dessas membranas. Na fase S_o o efeito do colesterol, acima de 20 – 25 mol%, é de aumento na rotação das cadeias acilas e na difusão lateral dos lipídios (Ge et al., 1999), tal que sua depleção seria acompanhada por aumento da ordem molecular, como observado na Figura 32A.

Em relação às membranas sinaptossomais íntegras, o marcador 16-SASL detectou aumento nos valores de h_{+1}/h_0 na membrana com conteúdo reduzido de colesterol, nas três temperaturas medidas (Tabela 6). Este resultado é esperado, uma vez que o colesterol é mais curto que os fosfolipídios de membrana e, ao inserir-se na região de interface da bicamada (para expor sua hidroxila na superfície polar), preenche o espaçamento entre os lipídios, causado pelo alto grau de movimentação das cadeias acila em conformação *trans-gauche*, aumentando a ordem nas regiões mais superficiais da bicamada (Yeagle, 2012); sua retirada é, então, acompanhada por aumento da fluidez, como monitorado no core hidrofóbico, pelo 16-SASL. Resultados semelhantes foram observados com depleção de colesterol de eritrócitos, monitorados com 16-SASL (Cassera e cols., 2002; Domingues et al., 2010). Subczynski & cols. (2009), em membranas modelos de POPC e usando diversos marcadores de spin (n-PC e n-SASL), reportaram aumento da fluidez com a retirada de colesterol, efeito este mais pronunciado com marcadores inseridos mais próximos ao centro da bicamada.

Na fase L_o , o colesterol tem como característica aumentar a ordem principalmente nas posições dos carbonos 5 e 7 das cadeias acilas dos ácidos graxos e diminuir a ordem nas posições dos carbonos 14 e 16 das cadeias acilas (Mainali et al., 2012). Em relação às membranas íntegras, houve aumento da ordem medida pelo 5-SASL nas DRMs preparadas com TX-100 ($p < 0,05$, teste *T de student*). Esse resultado corrobora os dados de aumento de colesterol (50 – 60 mol%, Tabela 3) e SM, em relação a membrana sinaptossomal íntegra (42 mol%, Tabela 3), e constitui uma evidência da formação de fase L_o , em DRMs de TX-100, de maneira similar ao observado em eritrócitos (Domingues et al., 2010) e em GUVs de lipídios de membranas eritrocitárias tratadas com TX-100 (item 4.2.2). Já o marcador 16-SASL, detectou um aumento nos valores de h_{+1}/h_0 nas DRMs de TX-100 em relação à membrana íntegra, indicando maior fluidez na região próxima ao core hidrofóbico.

Já nas DRMs de Brij 98, não houve um aumento significativo na ordem molecular dos lipídios ($p > 0,05$, teste *T de student*) em relação a membrana sinaptossomal íntegra, para ambos marcadores (5 e 16-SASL) pois essas DRMs não se apresentaram enriquecidas em colesterol (37 - 43 mol%); além disso, esse efeito também pode ser justificado pela maior quantidade de proteínas e fosfolipídios da monocamada interna, em relação a DRM de TX-100, como também encontrado nas DRMs de membranas eritrocitárias obtidas a partir de Brij (Casadei et al., 2014).

Em relação às DRMs íntegras *versus* DRMs com conteúdo reduzido de colesterol (tratadas com M β CD) não foi observada diferença entre as três temperaturas medidas, pois nas DRMs de TX-100 a diminuição do conteúdo de colesterol foi acompanhada pela

diminuição no conteúdo de fosfolípido (Tabela 3) enquanto nas DRMs de Brij 98, a diminuição do conteúdo de colesterol foi acompanhada pela diminuição do teor proteico (Figura 24). Concluímos assim que a diminuição do conteúdo de colesterol acompanhada da diminuição simultânea do conteúdo de fosfolípidios ou proteínas, não alterou o parâmetro de ordem medido pelo 5 e 16-SASL, nos dois tipos de DRMs preparadas.

Comparando as temperaturas de preparação das DRMs não foram detectadas variações significativas no empacotamento lipídico para as DRMs de TX-100 preparadas a 4 e 37 °C ou para as DRMs de Brij 98 preparadas a 4 e 37 °C; Assim, apesar das DRMs de TX-100 e Brij 98 preparadas a 37 °C apresentarem menos proteínas e fosfolípidios, não detectamos alterações significativas na ordem das DRMs preparadas a 4 °C e 37 °C, sendo que o conteúdo de colesterol foi o principal modulador de fases, com efeitos sensível aos experimentos de RPE com as sonda 5 e 16-SASL.

Como demonstrado anteriormente as DRMs de TX-100 são enriquecidas de colesterol (Tabela 3) e esfingomielinas (Figura 28) e tem baixo teor de PE e PS (Figura 28). Já as DRMs de Brij 98 são proporcionalmente mais ricas em proteínas (Tabela 3) e apresentaram distribuição de fosfolípidios semelhante à encontrada nas membranas sinaptossomais íntegras (Figura 20). Portanto, esses resultados indicam que a menor proporção de SM encontrada nas DRMs de Brij 98 e a presença de maior proporção de glicerolípídios (PC + PE) pode justificar a maior fluidez dessas frações, em relação às de TX-100. Modelos de *rafts* predizem que o empacotamento lipídico na fase L_o dos lipídios na monocamada externa levaria a uma equivalente organização da monocamada interna (Diakowski et al., 2006). A partir dos dados obtidos com as monocamadas e bicamadas preparadas a partir de lipídios de eritrócitos, juntamente com os resultados obtidos a partir das membranas sinaptossomais, é possível que o Brij 98, devido a sua cabeça polar (2 vezes maior que a do TX-100), apesar da sua alta capacidade de inserção na bicamada lipídica (Tabela 2), se insira preferencialmente na monocamada externa, desestabilizando e rearranjando a vesícula em pequenas partículas de composição semelhante a membrana íntegra, diferentemente do TX-100, que é capaz de se transpor para a monocamada interna, solubilizando-a (Sudbrack et al., 2011).

5. Conclusões

Neste trabalho estudamos o mecanismo de solubilização da membrana eritrocitária e caracterizamos as frações de membranas sinaptossomais resistentes aos detergentes TX-100 e Brij 98, concluímos:

- Experimentos em monocamadas preparadas com lípidios extraídos de *ghosts* se mostraram um ótimo modelo para estudos com membranas biológicas, pois os resultados se assemelharam aos de hemólise, realizados a partir da membrana íntegra (Casadei, 2011), evidenciando um papel mais importante dos lípidios na solubilização de membranas, em relação às proteínas. Em ambos testes o Brij 98 mostrou maior interação com os lípidios de eritrócitos, em relação ao TX-100;
- Em trabalhos anteriores, demonstramos que o tratamento da membrana eritrocitária com os detergentes não iônicos TX-100 e Brij 98 permitiu separar frações insolúveis (DRMs), tanto a 4 quanto a 37 °C (Casadei et al., 2014a). As DRMs de TX-100 mostraram-se ricas em colesterol e esfingomieline e com empacotamento lipídico compatível com a fase L_o de *lipid rafts* (Domingues et al., 2010). Já as DRMs de Brij 98 preservaram a composição lipídica da membrana original. O aumento da temperatura não alterou o conteúdo de proteínas e colesterol das DRMs preparadas a partir de TX-100 a 37 °C, em comparação com as DRMs preparadas a 4 °C, enquanto que para as DRMs preparadas a partir de Brij 98, o colesterol foi mais facilmente solubilizado a 37 °C que nas DRMs preparadas a 4 °C. DRMs de membranas eritrocitárias preparadas a partir de Brij 98 e TX-100 formam vesículas seladas em que estão presentes marcadores de *lipid rafts* (flotilina e proteínas do citoesqueleto);
- Em experimentos realizados a partir de GUVs, verificamos que o TX-100 solubiliza parcialmente os lípidios na membrana eritrocitária, apenas acima da CMC; já o Brij 98 se insere na bicamada, em concentrações abaixo da CMC, e fragmenta a membrana em microvesículas, não ocorrendo uma solubilização total ou parcial da membrana, como previsto pela ação de detergentes (Lichtenberg, 1985);
- Tanto nos experimentos em monocamadas quanto em bicamadas (GUVs) preparadas a partir de lipídios extraídos de *ghosts*, ambos detergentes tiveram efeito destruturador da membrana: em concentrações acima da CMC para o TX-100 e abaixo da CMC para o Brij 98, evidenciando que ambos modelos experimentais foram eficientes;

- O TX-100, em concentrações acima da CMC, induziu a formação de domínios macroscópicos em GUVs preparadas a partir de lipídios extraídos de membranas eritrocitárias; houve solubilização da fração L_d , restando uma vesícula insolúvel composta principalmente por esfingomielinas e colesterol, com menor contraste de fases e sem fluorescência, que se apresenta na fase L_o ;
- O tratamento da membrana sinaptossomal com os detergentes não iônicos TX-100 e Brij 98 permitiu separá-la em fração solúvel (mais densa) e insolúvel (DRMs, menos densa). Quanto maior a quantidade de detergente empregado, maior a separação entre as frações, até 16 mM e 8 mM para o TX-100 e Brij 98, respectivamente;
- A M β CD se mostrou a melhor ciclodextrina para reduzir a quantidade de colesterol da membrana sinaptossomal, não alterando o conteúdo de fosfolipídios e proteínas, quando usada até a concentração de 35 mM. A diminuição de 50% do conteúdo de colesterol presente nas membranas sinaptossomais foi alcançada com tratamento da mesma com uma solução de 20 mM de M β CD;
- Os detergentes testados solubilizaram de forma diferencial a membrana sinaptossomal, gerando DRMs com composições diferentes, tanto à 4 quanto à 37 °C. As DRMs de TX-100 são ricas em colesterol e esfingomielinas e apresentam empacotamento lipídico compatível com a fase L_o de *lipid rafts*. Já as DRMs de Brij 98 preservam a composição lipídica dos sinaptossomas, promovendo maior estabilidade às proteínas. O aumento da temperatura favoreceu a solubilização de fosfolipídios e proteínas pelo TX-100 enquanto que para o Brij 98, as proteínas foram mais facilmente solubilizadas, porém o colesterol apresentou maior resistência à solubilização à 37 °C;
- DRMs de membranas sinaptossomais preparados a partir de Brij 98 e TX-100 são vesículas seladas e apresentam tanto os marcadores de *lipid rafts* (flotilina e proteínas do citoesqueleto), quanto diâmetro médio compatível aos desses microdomínios (*ca.* 200 nm). A flotilina foi encontrada exclusivamente nas DRMs preparadas a 4 °C, com ambos detergentes;
- O colesterol é o principal agente modulador de fases, aumentando o empacotamento lipídico (medido por RPE) nas DRMs de membranas sinaptossomais preparadas a partir de TX-100, evidenciando a formação de fase líquido-ordenada; já as DRMs de Brij 98 apresentaram menor empacotamento lipídico em relação às DRMs de TX-100, o que pode ser justificado pela maior quantidade de proteínas, e pela presença de fosfolipídios da monocamada interna nas frações obtidas com Brij 98;

- As DRMs de TX-100 preparadas a partir de conteúdo reduzido de colesterol, não apresentaram variação na fluidez, em relação às DRMs de TX-100 preparadas a partir de membranas íntegras, pois a diminuição do conteúdo de colesterol foi acompanhada por menor teor de fosfolipídios. De um modo geral, a diminuição de colesterol também não alterou a ordem da bicamada nas DRM de Brij 98, pois a diminuição do conteúdo de colesterol foi acompanhada por menor teor de proteínas destas.

Enfim, os resultados obtidos com a preparação de DRMs a partir de membranas sinaptossomais do córtex de cérebro suíno, apontam semelhanças com os DRMs de membranas eritrocitárias (Casadei et al., 2014a), apesar da diferente composição dessas biomembranas, como por exemplo a razão colesterol/proteína (0,3 na membrana eritrocitária e 0,8 na membrana sinaptossomal). O que podemos concluir é que a formação de DRMs é mais dependente do detergente utilizado do que da composição da biomembrana e que existe uma solubilização preferencial pelos detergentes testados: TX-100 solubiliza preferencialmente proteínas e os fosfolipídios PC, PS e PE, enquanto o Brij 98 fragmenta a membrana, solubilizando mais colesterol do que fosfolipídios e proteínas. Mesmo que exista uma interação preferencial entre esfingomielinas e colesterol, que é mais resistente à solubilização pelo TX-100, esta interação não é observada (ou suficientemente forte) quando se usa Brij 98, pois suas DRMs tem menor proporção destes lipídios;

De acordo com os resultados obtidos com as diferentes abordagens experimentais em membranas eritrocitárias e sinaptossomais, podemos afirmar que somente o tratamento das membranas biológicas com o detergente TX-100 foi capaz de isolar eficientemente frações resistentes com características de domínios lipídicos (*lipid rafts*): enriquecidas em esfingomielinas, colesterol e flotilina; com fluidez característica da fase *Lo* e com tamanho da ordem de 20-300 nm).

6. Perspectivas

- Testar o efeito de Brij 98 em GUVs compostas por diferentes concentrações de fosfatidiletanolamina, colesterol, fosfatidilcolina e esfingomiéline para verificar a separação de fases L_o e L_d , a partir de sondas fluorescentes;
- Analisar a composição dos ácidos graxos das DRMs sinaptossomais.
- Decompor e analisar por simulação espectral os espectros de RPE de DRMs de TX-100 e Brij 98, a fim de entender a origem do sinal imobilizado do marcador na bicamada.

7. Referências Bibliográficas

- ABI-RIZK, G. & BESSON, F. (2008). Interactions of Triton X-100 with sphingomyelin and phosphatidylcholine monolayers: influence of the cholesterol content. — *Colloids Surf Bioin* 66, 163-7.
- AHMED, S., BROWN, D. & LONDON, E. (1997). On the origin of sphingolipid/cholesterol-rich detergent-insoluble cell membranes: Physiological concentrations of cholesterol and sphingolipid induce formation of a detergent-insoluble, liquid-ordered lipid phase in model membranes. — *Biochemistry* 36, 10944-10953.
- AHYAYAUCH, H., COLLADO, M. I., GONI, F. M. & LICHTENBERG, D. (2009). Cholesterol reverts Triton X-100 preferential solubilization of sphingomyelin over phosphatidylcholine: A P-31-NMR study. — *Febs Letters* 583, 2859-2864.
- ALAARG, A., SCHIFFELERS, R. M., VAN SOLINGE, W. W. & VAN WIJK, R. (2013). Red blood cell vesiculation in hereditary hemolytic anemia. — *Front Physiol* 4, 365.
- ALMEIDA, P. F. (2009). Thermodynamics of lipid interactions in complex bilayers. — *Biochim Biophys Acta* 1788, 72-85.
- AN, X., GUO, X., SUM, H., MORROW, J., GRATZER, W. & MOHANDAS, N. (2004). Phosphatidylserine binding sites in erythroid spectrin: location and implications for membrane stability. — *Biochemistry* 43, 310-5.
- ANGELOVA, M. I. & DIMITROV, D. S. (1986). Liposome electroformation. — *Faraday Discuss Chem Soc* 81, 301-311.
- ARAPULISAMY, O., MANNANGATTI, P. & JAYANTHI, L. D. (2013). Regulated Norepinephrine Transporter Interaction with the Neurokinin-1 Receptor Establishes Transporter Subcellular Localization. — *J Biol Chem* 288, 28599-610.
- BAGATOLLI, L. A. (2003). Direct observation of lipid domains in free standing bilayers: from simple to complex lipid mixtures. — *Chem Phys Lipids* 122, 137-45.
- BAUMGART, T., HESS, S. T. & WEBB, W. W. (2003). Imaging coexisting fluid domains in biomembrane models coupling curvature and line tension. — *Nature* 425, 821-4.
- BENTING, J., RIETVELD, A., ANSORGE, I. & SIMONS, K. (1999). Acyl and alkyl chain length of GPI-anchors is critical for raft association in vitro. — *Febs Letters* 462, 47-50.
- BESSHOH, S., BAWA, D., TEVES, L., WALLACE, M. C. & GURD, J. W. (2005). Increased phosphorylation and redistribution of NMDA receptors between synaptic lipid rafts and post-synaptic densities following transient global ischemia in the rat brain. — *J Neurochem* 93, 186-94.
- BEUTLER, E., WEST, C. & BLUME, K. G. (1976). The removal of leukocytes and platelets from whole blood. — *J Lab Clin Med* 88, 328-33.
- BEZLYEPKINA, N., GRACIÀ, R. S., SHCHELOKOVSKYY, P., LIPOWSKY, R. & DIMOVA, R. (2013). Phase diagram and tie-line determination for the ternary mixture DOPC/eSM/cholesterol. — *Biophys J* 104, 1456-64.
- BROWN, D. (2006a). Lipid rafts, detergent-resistant membranes, and raft targeting signals. — *Physiology* 21, 430-439.
- BROWN, D. & LONDON, E. (1998). Functions of lipid rafts in biological membranes. — *Annu Rev Cell Develop Biol* 14, 111-136.
- BROWN, D. A. (2006b). Lipid rafts, detergent-resistant membranes, and raft targeting signals. — *Physiology* 21, 430-439.
- BROWN, D. A. & ROSE, J. K. (1992). Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. — *Cell* 68, 533-44.

- CASADEI, B. R. (2011). Estudos de membranas eritrocitárias resistentes a detergentes da série éter de polioxietileno (Brij). — Dissertação de mestrado, Universidade Estadual de Campinas.
- CASADEI, B. R., DE OLIVEIRA CARVALHO, P., RISKE, K. A., BARBOSA, R. E. M., DE PAULA, E. & DOMINGUES, C. C. (2014a). Brij detergents reveal new aspects of membrane microdomain in erythrocytes. — *Mol Membr Biol* 31, 195-205.
- CASADEI, B. R., DOMINGUES, C. C., DE PAULA, E. & RISKE, K. A. (2014b). Direct visualization of the action of Triton X-100 on giant vesicles of erythrocyte membrane lipids. — *Biophys J* 106, 2417-25.
- CHASIS, J. A. & SHOHET, S. B. (1987). Red cell biochemical anatomy and membrane properties. — *Annu Rev Physiol* 49, 237-48.
- CHEN, K., BAXTER, T., MUIR, W. M., GROENEN, M. A. & SCHOOK, L. B. (2007). Genetic resources, genome mapping and evolutionary genomics of the pig (*Sus scrofa*). — *Int J Biol Sci* 3, 153-65.
- CHEN, P. S., TORIBARA, J. T. Y. & WARNER, H. (1956). Microdetermination of phosphorus. — *Anal. Chem.* 28, 1756-1758.
- CHICHILI, G. & RODGERS, W. (2009). Cytoskeleton-membrane interactions in membrane raft structure. — *Cell Mol Life Sci* 66, 2319-28.
- CIANA, A., ACHILLI, C., BALDUINI, C. & MINETTI, G. (2011). On the association of lipid rafts to the spectrin skeleton in human erythrocytes. — *Biochim Biophys Acta* 1808, 183-90.
- CIANA, A., ACHILLI, C. & MINETTI, G. (2014). Membrane rafts of the human red blood cell. — *Mol Membr Biol* 31, 47-57.
- CIANA, A., BALDUINI, C. & MINETTI, G. (2005). Detergent-resistant membranes in human erythrocytes and their connection to the membrane-skeleton. — *Biosciences*, 317-328.
- COLE, A. A., DOSEMECI, A. & REESE, T. S. (2010). Co-segregation of AMPA receptors with G(M1) ganglioside in synaptosomal membrane subfractions. — *Biochem J* 427, 535-40.
- CONNOR, J., GILLUM, K. & SCHROIT, A. J. (1990). Maintenance of lipid asymmetry in red blood cells and ghosts: effect of divalent cations and serum albumin on the transbilayer distribution of phosphatidylserine. — *Biochim Biophys Acta* 1025, 82-6.
- CONTRERAS, F., SANCHEZ-MAGRANER, L., ALONSO, A. & GONI, F. (2010). Transbilayer (flip-flop) lipid motion and lipid scrambling in membranes. — *Febs Letters*, 1779-1786.
- COOPER, G. M. (2000). The cell surface. In: *The cell: a molecular approach*. — ASM Press, Washington 2ª edição, capítulo 12, Washington, DC.
- CORTIJO, M., ALONSO, A., GOMEZ-FERNANDEZ, J. C. & CHAPMAN, D. (1982). Intrinsic protein-lipid interactions. Infrared spectroscopic studies of gramicidin A, bacteriorhodopsin and Ca²⁺-ATPase in biomembranes and reconstituted systems. — *J Mol Biol* 157, 597-618.
- CRAMER, W. A., ENGELMAN, D. M., VON HEIJNE, G. & REES, D. C. (1992). Forces involved in the assembly and stabilization of membrane proteins. — *Faseb J* 6, 3397-402.
- CREPALDI DOMINGUES, C., CIANA, A., BUTTAFAVA, A., BALDUINI, C., DE PAULA, E. & MINETTI, G. (2009). Resistance of Human Erythrocyte Membranes to Triton X-100 and C₁₂E₈. — *J Membr Biol* 227, 39-48.
- CRiado, M., EIBL, H. & BARRANTES, F. J. (1982). Effects of lipids on acetylcholine receptor. Essential need of cholesterol for maintenance of agonist-induced state transitions in lipid vesicles. — *Biochemistry* 21, 3622-9.
- CUBÍ, R., MATAS, L. A., POU, M., AGUILERA, J. & GIL, C. (2013). Differential sensitivity to detergents of actin cytoskeleton from nerve endings. — *Biochim Biophys Acta* 1828, 2385-93.

- CUDDY, L. K., WINICK-NG, W. & RYLETT, R. J. (2014). Regulation of the high-affinity choline transporter activity and trafficking by its association with cholesterol-rich lipid rafts. — *J Neurochem* 128, 725-40.
- DALEKE, D. L. (2008). Regulation of phospholipid asymmetry in the erythrocyte membrane. — *Curr Opin Hematol* 15, 191-5.
- DE MATOS ALVES PINTO, L., MALHEIROS, S. V., LINO, A. C., DE PAULA, E. & PERILLO, M. A. (2006). Hydroxyzine, promethazine and thioridazine interaction with phospholipid monomolecular layers at the air-water interface. — *Biophys Chem* 119, 247-55.
- DELAUNAY, J., BRETON, M., TRUGNAN, G. & MAURICE, M. (2008a). Differential solubilization of inner plasma membrane leaflet components by Lubrol WX and Triton X-100. — *Biochim Biophys Acta* 1778, 105-12.
- DELAUNAY, J. L., BRETON, M., TRUGNAN, G. & MAURICE, M. (2008b). Differential solubilization of inner plasma membrane leaflet components by Lubrol WX and Triton X-100. — *Biochim Biophys Acta* 1778, 105-12.
- DEVAUX, P. F., HERRMANN, A., OHLWEIN, N. & KOZLOV, M. M. (2008). How lipid flippases can modulate membrane structure. — *Biochim Biophys Acta* 1778, 1591-600.
- DIAKOWSKI, W., OZIMEK, Ł., BIELSKA, E., BEM, S., LANGNER, M. & SIKORSKI, A. F. (2006). Cholesterol affects spectrin-phospholipid interactions in a manner different from changes resulting from alterations in membrane fluidity due to fatty acyl chain composition. — *Biochim Biophys Acta* 1758, 4-12.
- DIETRICH, C., BAGATOLLI, L., VOLOVYK, Z., THOMPSON, N., LEVI, M., JACOBSON, K. & GRATTON, E. (2001). Lipid rafts reconstituted in model membranes. — *Biophys J*, 1417-1428.
- DODGE, J. T., MITCHELL, C. & HANAHAN, D. J. (1963). The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghosts of human erythrocytes. — *Arch Biochem Biophys* 100, 119-30.
- DOMINGUES, C., MALHEIROS, S. & PAULA, E. (2008). Solubilization of human erythrocyte membranes by ASB detergents. — *Braz J Med Biol Res* 41, 758-64.
- DOMINGUES, C. C., CIANA, A., BUTTAFAVA, A., CASADEI, B. R., BALDUINI, C., DE PAULA, E. & MINETTI, G. (2010). Effect of cholesterol depletion and temperature on the isolation of detergent-resistant membranes from human erythrocytes. — *J Membr Biol* 234, 195-205.
- DREVOT, P., LANGLET, C., GUO, X. J., BERNARD, A. M., COLARD, O., CHAUVIN, J. P., LASSERRE, R. & HE, H. T. (2002). TCR signal initiation machinery is pre-assembled and activated in a subset of membrane rafts. — *EMBO J* 21, 1899-908.
- DUARTE, E. L., OLIVEIRA, T. R., ALVES, D. S., MICOL, V. & LAMY, M. T. (2008). On the interaction of the anthraquinone barbaloin with negatively charged DMPG bilayers. — *Langmuir* 24, 4041-9.
- DUNKLEY, P. R., JARVIE, P. E. & ROBINSON, P. J. (2008). A rapid Percoll gradient procedure for preparation of synaptosomes. — *Nat Protoc* 3, 1718-28.
- ECKERT, G. P., IGBAVBOA, U., MÜLLER, W. E. & WOOD, W. G. (2003). Lipid rafts of purified mouse brain synaptosomes prepared with or without detergent reveal different lipid and protein domains. — *Brain Res* 962, 144-50.
- EVANS, E. A. & SKALAK, R. (1979). Mechanics and thermodynamics of biomembranes: part 1. — *CRC Crit Rev Bioeng* 3, 181-330.
- FOLCH, J., LEES, M. & SLOANE STANLEY, G. H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. — *J Biol Chem* 226, 497-509.
- FONTAINE, P., FAURÉ, M. C., MULLER, F., POUJADE, M., MICHA, J. S., RIEUTORD, F. & GOLDMANN, M. (2007). Unexpected stability of phospholipid langmuir monolayers deposited on Triton X-100 aqueous solutions. — *Langmuir* 23, 12959-65.

- FUCHS, B., SCHILLER, J., SÜSS, R., ZSCHARNACK, M., BADER, A., MÜLLER, P., SCHÜRENBERG, M., BECKER, M. & SUCKAU, D. (2008). Analysis of stem cell lipids by offline HPTLC-MALDI-TOF MS. — *Anal Bioanal Chem* 392, 849-60.
- GAINES, G. (1966). *Insoluble Monolayers at Liquid-gas Interfaces*. — Interscience Publishers, New York.
- GALLAGHER, P. & FORGET, B. (2001). The red cell membrane. — In: *Hematology* (E. Beutler, M. A. Lichtman, B. S. Collier, T. J. Kipps & U. Selingsohn, eds). McGraw-Hill, New York.
- GARNER, A. E., SMITH, D. A. & HOOPER, N. M. (2008). Visualization of detergent solubilization of membranes: implications for the isolation of rafts. — *Biophys J* 94, 1326-40.
- GE, M., FIELD, K. A., ANEJA, R., HOLOWKA, D., BAIRD, B. & FREED, J. H. (1999). Electron spin resonance characterization of liquid ordered phase of detergent-resistant membranes from RBL-2H3 cells. — *Biophys J* 77, 925-33.
- GENNARO, A. M., LUQUITA, A. & RASIA, M. (1996). Comparison between internal microviscosity of low-density erythrocytes and the microviscosity of hemoglobin solutions: an electron paramagnetic resonance study. — *Biophys J* 71, 389-93.
- GIL, C., CUBÍ, R., BLASI, J. & AGUILERA, J. (2006). Synaptic proteins associate with a sub-set of lipid rafts when isolated from nerve endings at physiological temperature. — *Biochem Biophys Res Commun* 348, 1334-42.
- GIL, C., FALQUÉS, A., SARRÓ, E., CUBI, R., BLASI, J., AGUILERA, J. & ITARTE, E. (2011). Protein kinase CK2 associates to lipid rafts and its pharmacological inhibition enhances neurotransmitter release. — *FEBS Lett* 585, 414-20.
- GIL, C., SOLER-JOVER, A., BLASI, J. & AGUILERA, J. (2005). Synaptic proteins and SNARE complexes are localized in lipid rafts from rat brain synaptosomes. — *Biochem Biophys Res Commun* 329, 117-24.
- GOÑI, F. M. (2014). The basic structure and dynamics of cell membranes: An update of the Singer-Nicolson model. — *Biochim Biophys Acta*.
- GRIFFIN, W. C. (1949). Classification of surface-active agents by HLB. — *J. Soc. Cosmet. Chem.* 1, 311-319.
- GRUENBERG, J. & VAN DER GOOT, F. G. (2006). Mechanisms of pathogen entry through the endosomal compartments. — *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 495-504.
- HAIT, S. K. & MOULIK, S. P. (2001). Determination of Critical Micelle Concentration (CMC) of Nonionic Surfactants by Donor–Acceptor Interaction with Iodine and Correlation of CMC with Hydrophile–Lipophile Balance and Other Parameters of the Surfactants. — *J Surfact Deterg* 4, 303-309.
- HARISH, G., MAHADEVAN, A., SRINIVAS BHARATH, M. M. & SHANKAR, S. K. (2013). Alteration in glutathione content and associated enzyme activities in the synaptic terminals but not in the non-synaptic mitochondria from the frontal cortex of Parkinson's disease brains. — *Neurochem Res* 38, 186-200.
- HEAD, B. P., PEART, J. N., PANNEERSELVAM, M., YOKOYAMA, T., PEARN, M. L., NIESMAN, I. R., BONDS, J. A., SCHILLING, J. M., MIYANOYAMA, A., HEADRICK, J., ALI, S. S., ROTH, D. M., PATEL, P. M. & PATEL, H. H. (2010). Loss of caveolin-1 accelerates neurodegeneration and aging. — *PLoS One* 5, e15697.
- HEBB, C. O. & WHITTAKER, V. P. (1958). Intracellular distributions of acetylcholine and choline acetylase. — *J Physiol* 142, 187-96.
- HEERKLOTZ, H. (2002). Triton promotes domain formation in lipid raft mixtures. — *Biophys J* 83, 2693-2701.
- . (2008). Interactions of surfactants with lipid membranes. — *Q Rev Biophys* 41, 205-64.

- HEERKLOTZ, H. & SEELIG, J. (2000). Correlation of membrane/water partition coefficients of detergents with the critical micelle concentration. — *Biophys J* 78, 2435-40.
- HELFRICH, W. (1973). Elastic properties of lipid bilayers: theory and possible experiments. — *Z Naturforsch C* 28, 693-703.
- HEMMINGA, M. & LAWRENCE, J. (2007). *ESR Spectroscopy in Membrane Biophysics — Biological Magnetic Resonance* 27, New York.
- HOFSSÄSS, C., LINDAHL, E. & EDHOLM, O. (2003). Molecular dynamics simulations of phospholipid bilayers with cholesterol. — *Biophys J* 84, 2192-206.
- HOPE, H. R. & PIKE, L. J. (1996). Phosphoinositides and phosphoinositide-utilizing enzymes in detergent-insoluble lipid domains. — *Mol Biol Cell* 7, 843-51.
- HUANG, Z. & LONDON, E. (2013). Effect of cyclodextrin and membrane lipid structure upon cyclodextrin-lipid interaction. — *Langmuir* 29, 14631-8.
- HUBBELL, W. L. & MCCONNELL, H. M. (1971). Molecular motion in spin-labeled phospholipids and membranes. — *J Am Chem Soc* 93, 314-26.
- INGELMO-TORRES, M., GAUS, K., HERMS, A., GONZALEZ-MORENO, E., KASSAN, A., BOSCH, M., GREWAL, T., TEBAR, F., ENRICH, C. & POL, A. (2009). Triton X-100 promotes a cholesterol-dependent condensation of the plasma membrane. — *Biochem J*, 373-381.
- IPSEN, J. H., KARLSTROM, G., MOURITSEN, O. G., WENNERSTROM, H. & ZUCKERMANN, M. J. (1987). Phase equilibria in the phosphatidylcholine-cholesterol system. — *Biochim Biophys Acta* 905, 162-72.
- JACOBSON, K., ISHIHARA, A. & INMAN, R. (1987). Lateral diffusion of proteins in membranes. — *Annu Rev Physiol* 49, 163-75.
- JANES, P., LEY, S. & MAGEE, A. (1999). Aggregation of lipid rafts accompanies signaling via the T cell antigen receptor. — *J Cell Biol* 147, 447-461.
- JIANG, L., FANG, J., MOORE, D. S., GOGICHAeva, N. V., GALEVA, N. A., MICHAELIS, M. L. & ZAIDI, A. (2010). Age-associated changes in synaptic lipid raft proteins revealed by two-dimensional fluorescence difference gel electrophoresis. — *Neurobiol Aging* 31, 2146-59.
- KAMATA, K., MANNO, S., OZAKI, M. & TAKAKUWA, Y. (2008). Functional evidence for presence of lipid rafts in erythrocyte membranes: G α in rafts is essential for signal transduction. — *Am J Hematol* 83, 371-5.
- KAN, C. C., YAN, J. & BITTMAN, R. (1992). Rates of spontaneous exchange of synthetic radiolabeled sterols between lipid vesicles. — *Biochemistry* 31, 1866-74.
- KELLER, P. & SIMONS, K. (1998). Cholesterol is required for surface transport of influenza virus hemagglutinin. — *J Cell Biol* 140, 1357-67.
- KOLOMIYTSEVA, I. K., PEREPELKINA, N. I., ZHARIKOVA, A. D. & POPOV, V. I. (2008). Membrane lipids and morphology of brain cortex synaptosomes isolated from hibernating Yakutian ground squirrel. — *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 151, 386-91.
- KOTER, M., FRANIAK, I., STRYCHALSKA, K., BRONCEL, M. & CHOJNOWSKA-JEZIERSKA, J. (2004). Damage to the structure of erythrocyte plasma membranes in patients with type-2 hypercholesterolemia. — *Int J Biochem Cell Biol* 36, 205-15.
- KUSUMI, A., SUZUKI, K. G., KASAI, R. S., RITCHIE, K. & FUJIWARA, T. K. (2011). Hierarchical mesoscale domain organization of the plasma membrane. — *Trends Biochem Sci* 36, 604-15.
- LANGE, Y., YE, J., RIGNEY, M. & STECK, T. L. (1999). Regulation of endoplasmic reticulum cholesterol by plasma membrane cholesterol. — *J Lipid Res* 40, 2264-70.
- LE MAIRE, M., CHAMPEIL, P. & MOLLER, J. (2000). Interaction of membrane proteins and lipids with solubilizing detergents. — *Biochim Biophys Acta* 1508, 86-111.

- LEIDL, K., LIEBISCH, G., RICHTER, D. & SCHMITZ, G. (2008). Mass spectrometric analysis of lipid species of human circulating blood cells. — *Biochim Biophys Acta* 1781, 655-64.
- LENNE, P., WAWREZINIECK, L., CONCHONAUD, F., WURTZ, O., BONED, A., GUO, X., RIGNEAULT, H., HE, H. & MARGUET, D. (2006). Dynamic molecular confinement in the plasma membrane by microdomains and the cytoskeleton meshwork. — *EMBO J* 25, 3245-56.
- LI, X. M., MOMSEN, M. M., SMABY, J. M., BROCKMAN, H. L. & BROWN, R. E. (2001). Cholesterol decreases the interfacial elasticity and detergent solubility of sphingomyelins. — *Biochemistry* 40, 5954-63.
- LICHTENBERG, D. (1985). Characterization of the solubilization of lipid bilayers by surfactants. — *Biochim Biophys Acta* 821, 470-8.
- LICHTENBERG, D., AHYAYAUCH, H. & GOÑI, F. M. (2013). The mechanism of detergent solubilization of lipid bilayers. — *Biophys J* 105, 289-99.
- 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.
- LOPEZ, C. A., DE VRIES, A. H. & MARRINK, S. J. (2011). Molecular mechanism of cyclodextrin mediated cholesterol extraction. — *PLoS Comput Biol* 7, e1002020.
- LUNA, E., NEBL, T., TAKIZAWA & CROWLEY, J. (2005). Lipid raft membrane skeletons. — Humana Press, Totowa, NJ.
- MACHAN, R. & HOF, M. (2010). Lipid diffusion in planar membranes investigated by fluorescence correlation spectroscopy. — *Biochim Biophys Acta-Biomembranes* 1798, 1377-1391.
- MAIER, A. G., COOKE, B. M., COWMAN, A. F. & TILLEY, L. (2009). Malaria parasite proteins that remodel the host erythrocyte. — *Nat Rev Microbiol* 7, 341-54.
- MAINALI, L., RAGUZ, M. & SUBCZYNSKI, W. K. (2012). Phases and domains in sphingomyelin-cholesterol membranes: structure and properties using EPR spin-labeling methods. — *Eur Biophys J* 41, 147-59.
- MALHEIROS, S. V., BRITO, M. A., BRITES, D. & MEIRELLES, N. C. (2000). Membrane effects of trifluoperazine, dibucaine and praziquantel on human erythrocytes. — *Chem Biol Interact* 126, 79-95.
- MALHEIROS, S. V., PINTO, L. M., GOTTARDO, L., YOKAICHIYA, D. K., FRACETO, L. F., MEIRELLES, N. C. & DE PAULA, E. (2004). A new look at the hemolytic effect of local anesthetics, considering their real membrane/water partitioning at pH 7.4. — *Biophys Chem* 110, 213-21.
- MARSH, D. (1996). Intrinsic curvature in normal and inverted lipid structures and in membranes. — *Biophys J* 70, 2248-55.
- MAULIK, P. R., SRIPADA, P. K. & SHIPLEY, G. G. (1991). Structure and thermotropic properties of hydrated N-stearoyl sphingomyelin bilayer membranes. — *Biochim Biophys Acta* 1062, 211-9.
- MAZA, P., STRAUS, A., TOLEDO, M., TAKAHASHI, H. & SUZUKI, E. (2008). Interaction of epithelial cell membrane rafts with *Paracoccidioides brasiliensis* leads to fungal adhesion and Src-family kinase activation. — *Microbes Infect* 10, 540-7.
- MILLES, S., MEYER, T., SCHEIDT, H. A., SCHWARZER, R., THOMAS, L., MAREK, M., SZENTE, L., BITTMAN, R., HERRMANN, A., GUNTHER POMORSKI, T., HUSTER, D. & MULLER, P. (2013). Organization of fluorescent cholesterol analogs in lipid bilayers - lessons from cyclodextrin extraction. — *Biochim Biophys Acta* 1828, 1822-8.
- MOFFETT, S., BROWN, D. & LINDER, M. (2000). Lipid-dependent targeting of G proteins into rafts. — *J Biol Chem*, 275, 2191-2198.

- MRÓWCZYŃSKA, L., SALZER, U., PERUTKOVÁ, S., IGLIČ, A. & HÄGERSTRAND, H. (2010). Echinophilic proteins stomatin, sorcin, and synexin locate outside gangliosideM1 (GM1) patches in the erythrocyte membrane. — *Biochem Biophys Res Commun* 401, 396-400.
- MURADOR, P. & DEFFUNE, E. (2007). Aspectos estruturais da membrana eritrocitaria. — In: *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.*, p. 168-178.
- MURPHY, S. C., FERNANDEZ-POL, S., CHUNG, P. H., PRASANNA MURTHY, S. N., MILNE, S. B., SALOMAO, M., BROWN, H. A., LOMASNEY, J. W., MOHANDAS, N. & HALDAR, K. (2007). Cytoplasmic remodeling of erythrocyte raft lipids during infection by the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. — *Blood* 110, 2132-9.
- MURPHY, S. C., SAMUEL, B. U., HARRISON, T., SPEICHER, K. D., SPEICHER, D. W., REID, M. E., PROHASKA, R., LOW, P. S., TANNER, M. J., MOHANDAS, N. & HALDAR, K. (2004). Erythrocyte detergent-resistant membrane proteins: their characterization and selective uptake during malarial infection. — *Blood* 103, 1920-8.
- NEUMANN-GIESEN, C., FALKENBACH, B., BEICHT, P., CLAASEN, S., LÜERS, G., STUERMER, C., HERZOG, V. & TIKKANEN, R. (2004). Membrane and raft association of reggie-1/flotillin-2: role of myristoylation, palmitoylation and oligomerization and induction of filopodia by overexpression. — *Biochem J* 378, 509-18.
- NICOLSON, G. L. (2013). The Fluid-Mosaic Model of Membrane Structure: Still relevant to understanding the structure, function and dynamics of biological membranes after more than 40 years. — *Biochim Biophys Acta* 1838, 1451-1466.
- NIU, S. L. & LITMAN, B. J. (2002). Determination of membrane cholesterol partition coefficient using a lipid vesicle-cyclodextrin binary system: effect of phospholipid acyl chain unsaturation and headgroup composition. — *Biophys J* 83, 3408-15.
- NÚÑEZ, E., ALONSO-TORRES, P., FORNÉS, A., ARAGÓN, C. & LÓPEZ-CORCUERA, B. (2008). The neuronal glycine transporter GLYT2 associates with membrane rafts: functional modulation by lipid environment. — *J Neurochem* 105, 2080-90.
- PIKE, L. (2009). The challenge of lipid rafts. — *J Lipid Res* 50 Suppl, S323-8.
- PIKE, L. J. (2006). Rafts defined: a report on the Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function. — *J Lipid Res* 47, 1597-1598.
- PIKE, L. J., HAN, X. & GROSS, R. W. (2005). Epidermal growth factor receptors are localized to lipid rafts that contain a balance of inner and outer leaflet lipids: a shotgun lipidomics study. — *J Biol Chem* 280, 26796-804.
- POMORSKI, T. & MENON, A. (2006). Lipid flippases and their biological functions. — *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2908-2921.
- POPIK, W., ALCE, T. M. & AU, W. C. (2002). Human immunodeficiency virus type 1 uses lipid raft-colocalized CD4 and chemokine receptors for productive entry into CD4(+) T cells. — *J Virol* 76, 4709-22.
- PRETÉ, P. S., DOMINGUES, C. C., MEIRELLES, N. C., MALHEIROS, S. V., GOÑI, F. M., DE PAULA, E. & SCHREIER, S. (2011). Multiple stages of detergent-erythrocyte membrane interaction--a spin label study. — *Biochim Biophys Acta* 1808, 164-70.
- QIU, Y., WANG, Y., LAW, P. Y., CHEN, H. Z. & LOH, H. H. (2011). Cholesterol regulates {micro}-opioid receptor induced {beta}-arrestin 2 translocation to membrane lipid rafts. — *Mol Pharmacol* 80, 210-218.
- QUINN, P. (2010). A lipid matrix model of membrane raft structure. — *Prog Lipid Res*.
- RADHAKRISHNAN, A., LI, X. M., BROWN, R. E. & MCCONNELL, H. M. (2001). Stoichiometry of cholesterol-sphingomyelin condensed complexes in monolayers. — *Biochim Biophys Acta* 1511, 1-6.
- RAGHUPATHY, R., ANILKUMAR, A. A., POLLEY, A., SINGH, P. P., YADAV, M., JOHNSON, C., SURYAWANSHI, S., SAIKAM, V., SAWANT, S. D., PANDA, A., GUO, Z., VISHWAKARMA, R.

- A., RAO, M. & MAYOR, S. (2015). Transbilayer lipid interactions mediate nanoclustering of lipid-anchored proteins. — *Cell* 161, 581-94.
- RAJENDRAN, L., KNÖLKER, H. J. & SIMONS, K. (2010). Subcellular targeting strategies for drug design and delivery. — *Nat Rev Drug Discov* 9, 29-42.
- RIDYARD, M. & ROBBINS, S. (2003). Fibroblast growth factor-2-induced signaling through lipid raft-associated fibroblast growth factor receptor substrate 2 (FRS2). — *J Biol Chem* 278, 13803-13809.
- RODI, P. M., CABEZA, M. S. & GENNARO, A. M. (2006). Detergent solubilization of bovine erythrocytes. Comparison between the insoluble material and the intact membrane. — *Biophys Chem* 122, 114-22.
- RODRÍGUEZ-ASIAIN, A., RUIZ-BABOT, G., ROMERO, W., CUBÍ, R., ERAZO, T., BIONDI, R. M., BAYASCAS, J. R., AGUILERA, J., GÓMEZ, N., GIL, C., CLARO, E. & LIZCANO, J. M. (2011). Brain Specific Kinase-1 BRSK1/SAD-B associates with lipid rafts: modulation of kinase activity by lipid environment. — *Biochim Biophys Acta* 1811, 1124-35.
- SACKMANN, E. (1995). Biological membranes architecture and function. — In: *Structure and Dynamics of Membranes* (R. Lipowski & S. Sackmann, eds). Elsevier, Amsterdam.
- SAITO, Y. & SILBERT, D. F. (1979). Selective effects of membrane sterol depletion on surface function thymidine and 3-O-methyl-D-glucose transport in a sterol auxotroph. — *J Biol Chem* 254, 1102-7.
- SALZER, U. & PROHASKA, R. (2001). Stomatin, flotillin-1, and flotillin-2 are major integral proteins of erythrocyte lipid rafts. — *Blood* 97, 1141-3.
- SAMUEL, B. U., MOHANDAS, N., HARRISON, T., MCMANUS, H., ROSSE, W., REID, M. & HALDAR, K. (2001). The role of cholesterol and glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins of erythrocyte rafts in regulating raft protein content and malarial infection. — *J Biol Chem* 276, 29319-29.
- SCHREIER, S., MALHEIROS, S. V. & DE PAULA, E. (2000). Surface active drugs: self-association and interaction with membranes and surfactants. Physicochemical and biological aspects. — *Biochim Biophys Acta* 1508, 210-34.
- SCHREIER, S., POLNASZEK, C. F. & SMITH, I. C. (1978). Spin labels in membranes. Problems in practice. — *Biochim Biophys Acta* 515, 395-436.
- SCHUCK, S., HONSHO, M., EKROOS, K., SHEVCHENKO, A. & SIMONS, K. (2003). Resistance of cell membranes to different detergents. — *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 5795-800.
- SEVCSIK, E., BRAMESHUBER, M., FOLSER, M., WEGHUBER, J., HONIGMANN, A. & SCHUTZ, G. J. (2015). GPI-anchored proteins do not reside in ordered domains in the live cell plasma membrane. — *Nat Commun* 6, 6969.
- SHOUFFANI, A. & KANNER, B. I. (1990). Cholesterol is required for the reconstruction of the sodium- and chloride-coupled, gamma-aminobutyric acid transporter from rat brain. — *J Biol Chem* 265, 6002-8.
- SILVIUS, J. (2003). Role of cholesterol in lipid raft formation: lessons from lipid model systems. — *Biochim Biophys Acta-Biomembranes*, 174-183.
- SIMONS, K. & GERL, M. (2010). Revitalizing membrane rafts: new tools and insights. — *Nature Rev Molr Cell Biol* 11, 688-699.
- SIMONS, K. & IKONEN, E. (1997). Functional rafts in cell membranes. — *Nature* 387, 569-572.
- SINGER, S. J. (1990). The structure and insertion of integral proteins in membranes. — *Annu Rev Cell Biol* 6, 247-96.
- SINGER, S. J. & NICOLSON, G. L. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. — *Science* 175, 720-31.

- SOKOLOW, S., HENKINS, K. M., BILOUSOVA, T., GONZALEZ, B., VINTERS, H. V., MILLER, C. A., CORNWELL, L., POON, W. W. & GYLYS, K. H. (2015). Pre-synaptic C-terminal truncated tau is released from cortical synapses in Alzheimer's disease. — *J Neurochem* 133, 368-79.
- SOMOGYI, G., POSTA, J., BURIS, L. & VARGA, M. (2006). Cyclodextrin (CD) complexes of cholesterol—their potential use in reducing dietary cholesterol intake. — *Pharmazie* 61, 154-6.
- SOT, J., BAGATOLLI, L. A., GOÑI, F. M. & ALONSO, A. (2006). Detergent-resistant, ceramide-enriched domains in sphingomyelin/ceramide bilayers. — *Biophys J* 90, 903-14.
- SOWMIYA, M., TIWARI, A. K. & SAHA, S. K. (2010). Fluorescent probe studies of micropolarity, premicellar and micellar aggregation of non-ionic Brij surfactants. — *J Colloid Interface Sci* 344, 97-104.
- STANEVA, G., SEIGNEURET, M., KOUMANOV, K., TRUGNAN, G. & ANGELOVA, M. I. (2005). Detergents induce raft-like domains budding and fission from giant unilamellar heterogeneous vesicles: a direct microscopy observation. — *Chem Phys Lipids* 136, 55-66.
- STORCH, J. & KLEINFELD, A. (1985). The lipid structure of biological membranes. — 10.
- SUBCZYNSKI, W., WIDOMSKA, J. & FEIX, J. (2009). Physical properties of lipid bilayers from EPR spin labeling and their influence on chemical reactions in a membrane environment. — *Free Radic Biol Med* 46, 707-18.
- SUDBRACK, T. P., ARCHILHA, N. L., ITRI, R. & RISKE, K. A. (2011). Observing the solubilization of lipid bilayers by detergents with optical microscopy of GUVs. — *J Phys Chem B* 115, 269-77.
- SWAMY, M. J., CIANI, L., GE, M., SMITH, A. K., HOLOWKA, D., BAIRD, B. & FREED, J. H. (2006). Coexisting domains in the plasma membranes of live cells characterized by spin-label ESR spectroscopy. — *Biophys J* 90, 4452-65.
- TAGLIARI, L., TOLEDO, M. S., LACERDA, T. G., SUZUKI, E., STRAUS, A. H. & TAKAHASHI, H. K. (2012). Membrane microdomain components of *Histoplasma capsulatum* yeast forms, and their role in alveolar macrophage infectivity. — *Biochim Biophys Acta* 1818, 458-66.
- TAKAHASHI, H. K., TOLEDO, M. S., SUZUKI, E., TAGLIARI, L. & STRAUS, A. H. (2009). Current relevance of fungal and trypanosomatid glycolipids and sphingolipids: studies defining structures conspicuously absent in mammals. — *An Acad Bras Cienc* 81, 477-88.
- TAMBA, Y., TANAKA, T., YAHAGI, T., YAMASHITA, Y. & YAMAZAKI, M. (2004). Stability of giant unilamellar vesicles and large unilamellar vesicles of liquid-ordered phase membranes in the presence of Triton X-100. — *Biochim Biophys Acta* 1667, 1-6.
- TANAKA, A., GORIN, P., TAKAHASHI, H. & STRAUS, A. (2007). Role of *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* amastigote glycosphingolipids in macrophage infectivity. — *Braz J Med Biol Res* 40, 799-806.
- TEIXEIRA, G., VIEIRA, L. B., GOMEZ, M. V. & GUATIMOSIM, C. (2012). Cholesterol as a key player in the balance of evoked and spontaneous glutamate release in rat brain cortical synaptosomes. — *Neurochem Int* 61, 1151-9.
- TOLEDO, M. S., SUZUKI, E., HANDA, K. & HAKOMORI, S. (2004). Cell growth regulation through GM3-enriched microdomain (glycosynapse) in human lung embryonal fibroblast WI38 and its oncogenic transformant VA13. — *J Biol Chem* 279, 34655-64.
- TOLEDO, M. S., SUZUKI, E., STRAUS, A. H. & TAKAHASHI, H. K. (1995). Glycolipids from *Paracoccidioides brasiliensis*. Isolation of a galactofuranose-containing glycolipid reactive with sera of patients with paracoccidioidomycosis. — *J Med Vet Mycol* 33, 247-51.

- TURINA, A. V., SCHREIER, S. & PERILLO, M. A. (2012). Coupling Between GABA(A)-R Ligand-Binding Activity and Membrane Organization in β -Cyclodextrin-Treated Synaptosomal Membranes from Bovine Brain Cortex: New Insights from EPR Experiments. — *Cell Biochem Biophys*.
- VALENCIA, A., SAPP, E., KIMM, J. S., MCCLORY, H., ANSONG, K. A., YOHRLING, G., KWAK, S., KEGEL, K. B., GREEN, K. M., SHAFFER, S. A., ARONIN, N. & DiFIGLIA, M. (2013). Striatal synaptosomes from Hdh140Q/140Q knock-in mice have altered protein levels, novel sites of methionine oxidation, and excess glutamate release after stimulation. — *J Huntingtons Dis* 2, 459-75.
- VAN MEER, G., VOELKER, D. R. & FEIGENSON, G. W. (2008). Membrane lipids: where they are and how they behave. — *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 112-24.
- VEATCH, S. & KELLER, S. (2005). Seeing spots: Complex phase behavior in simple membranes. — *Biochim Biophys Acta-Molecular Cell Research*, 172-185.
- VEMURI, R. & PHILIPSON, K. D. (1989). Influence of sterols and phospholipids on sarcolemmal and sarcoplasmic reticular cation transporters. — *J Biol Chem* 264, 8680-5.
- WEINGARTEN, J., LASSEK, M., MUELLER, B. F., ROHMER, M., LUNGER, I., BAEUMLISBERGER, D., DUDEK, S., GOGESCH, P., KARAS, M. & VOLKNANDT, W. (2014). The proteome of the presynaptic active zone from mouse brain. — *Mol Cell Neurosci* 59, 106-18.
- WOLF, C., KOUMANOV, K., TENCHOV, B. & QUINN, P. J. (2001). Cholesterol favors phase separation of sphingomyelin. — *Biophys Chem* 89, 163-72.
- WYDRO, P. (2011a). The interactions between cholesterol and phospholipids located in the inner leaflet of human erythrocytes membrane (DPPE and DPPS) in binary and ternary films--the effect of sodium and calcium ions. — *Colloids Surf B Biointerfaces* 82, 209-16.
- . (2011b). The magnitude of condensation induced by cholesterol on the mixtures of sphingomyelin with phosphatidylcholines-Study on ternary and quaternary systems. — *Colloids Surf B Biointerfaces* 82, 594-601.
- YEAGLE, P. (2012). *The Structure of cell membranes*. — CRC Press, Boca Raton, New York, 3^a edição.
- YOUNG, R., ZHENG, X., HOLOWKA, D. & BAIRD, B. (2005). Reconstitution of regulated phosphorylation of Fc epsilon RI by a lipid raft-excluded protein-tyrosine phosphatase. — *J Biol Chem* 280, 1230-1235.
- YWAZAKI, C. Y., MAZA, P. K., SUZUKI, E., TAKAHASHI, H. K. & STRAUS, A. H. (2011). Role of host glycosphingolipids on *Paracoccidioides brasiliensis* adhesion. — *Mycopathologia* 171, 325-32.
- ZIDOVETZKI, R. & LEVITAN, I. (2007). Use of cyclodextrins to manipulate plasma membrane cholesterol content: evidence, misconceptions and control strategies. — *Biochim Biophys Acta* 1768, 1311-24.
- ZIMMERBERG, J. & GAWRISCH, K. (2006). The physical chemistry of biological membranes. — *Nat Chem Biol* 2, 564-7.

8. Produção científica no período

Artigos publicados em periódicos

1. Silva, CMG da; Fraceto, LF; Franz-Montan, M; Couto, VM; **Casadei, BR**; Cereda, CMS; de Paula, E. (2015) Development of egg PC/cholesterol/ -tocopherol liposomes with ionic gradients to deliver ropivacaine. *Journal of Liposome Research*. 26:1-10.
2. **Casadei, BR**; Carvalho, PO; Riske, KA; Melo Barbosa, R; de Paula, E; Domingues, CC. (2014) Brij detergents reveal new aspects of membrane microdomain composition in erythrocytes. *Molecular Membrane Biology*. 31 (6):195-205.
3. **Casadei, BR**; Domingues, CC; de Paula, E; Riske, KA. (2014) Direct visualization of the action of Triton X-100 on giant vesicles of erythrocyte membrane lipids. *Biophysical Journal*. 106:2417-2425, 2014.
4. Cereda, CMS; Franz-Montan, M; Silva, CMG; **Casadei, BR**; Domingues, CC; Tofoli, GR; Araújo, DR; de Paula, E. (2013) Transdermal delivery of butamben using elastic and conventional liposomes. *Journal of Liposome Research*. 23:228-234.
5. Domingues, CC; Ciana, A; Buttafava, A; **Casadei, BR**; Balduini, C; de Paula, E; Minetti, G. (2010) Effect of cholesterol depletion and temperature on the isolation of detergent-resistant membranes from human erythrocytes. *J Membr Biol*. 234:195-205.

Artigos à serem submetidos/em preparação

1. **Casadei, BR**; Clop, EM; Domingues, CC; Perillo, MA; de Paula, E. Interaction between detergents and erythrocytes membranes by Langmuir monolayers.
2. **Casadei, BR**; Ropelle, AC; Domingues, CC; de Paula, E. Effect of cyclodextrins in synaptosomal membranes.
3. **Casadei, BR**; Duarte, EL; Lamy, MT; Ropelle, AC; Silva, CMG da; Domingues, CC; de Paula, E. Effects of TX-100 and Brij 98 in synaptosomal membrane from cortex suine.

Comunicações e resumos publicados em anais de congressos

1. Silva, CMG; **Casadei, BR**; Guilherme, VA; Cereda, CMS; de Paula, E. (2014) Liposomal system designed for the sustained release of ropivacaine. In: 41° Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society, Chicago.
2. Couto, VM; Silva, CMG; **Casadei, BR**; de Paula, E. (2014) Characterization of remote-loading liposomes containing dibucaine. In: XXIX Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, Caxambú, MG.

3. Ropelle, AC; **Casadei, BR**; Domingues, CC; de Paula, E. (2014) Caracterização de membranas sinaptossomais resistentes a detergentes. In: XXII Congresso de iniciação científica da Unicamp, Campinas, SP.
4. Ropelle, AC; **Casadei, BR**; Silva, CMG; Domingues, CC; de Paula, E. (2014) Isolation of detergent-resistant membranes from synaptosomes. In: II Workshop Pós Graduação em Biologia Funcional e Molecular, Campinas, SP.
5. **Casadei, BR**; Ropelle, AC; de Paula, E. (2014) Which beta-cyclodextrin is more effective in depleting cholesterol from synaptosomal membranes?. In: II Workshop Pós Graduação em Biologia Funcional e Molecular, Campinas.
6. Ropelle, AC; **Casadei, BR**; de Paula, E; Domingues, CC. (2013) Avaliação da solubilização de membranas eritrocitárias e suas frações resistentes aos detergentes Brij 78 e Brij 97. XXI Congresso de iniciação científica da Unicamp, Campinas, SP.
7. Melo Barbosa, R; **Casadei, BR**; da Silva, CMG; Itri, R; Barbosa, L; de Paula, E. (2013) Spin Label and SAXS Study of Cetylpalmitate Solid Lipid Nanoparticles Loaded with Dibucaine. *Biophysical Journal*. 104:344a.
8. **Casadei, BR**; Melo Barbosa, R; Marcato, PD; Durán, N; de Paula E. (2013) Structural Effects of Dibucaine Encapsulation into Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructured Lipid Carriers. *Biophysical Journal*. 104:344a.
9. da Silva, CMG; **Casadei, BR**; Cereda, CMS.; de Paula, E. (2012) Characterization of liposomal systems designed for the remote loading of ropivacaine. II Latin American Federation of Biophysical Society Congress / XXXVII Brazilian Biophysical Society Congress, Búzios - RJ.
10. **Casadei, BR**; Domingues, CC; Clop, EM; Perillo, MA; de Paula, E. (2012) Estudo da interação detergente-membrana eritrocitária e suas frações resistentes a solubilização, em monocamadas de Langmuir. 3º encontro sobre estruturas auto-organizadas em soluções e interfaces-Autoorg, São Pedro.
11. Domingues, CC; **Casadei, BR**; Clop, PD; Perillo, MA; de Paula, E. (2012) Estudo de monocamadas lipídicas obtidas de frações da membrana eritrocitária. 3º encontro sobre estruturas auto-organizadas em soluções e interfaces-Autoorg, São Pedro.
12. **Casadei, BR**; Domingues, CC; de Paula, E. (2011) Lipid distribution in detergent-resistant membranes from human erythrocytes. *Chem Phys Lipids*. 164:S42.
13. **Casadei, BR**; Martins, J; Carvalho, PO; Domingues, CC; de Paula, E. (2011) Characterization of Brij 58 and 98-resistant membranes from human erythrocytes. *Eur Biophys J*. 40:S74.
14. **Casadei, BR**; Lacerda, JM; Carvalho, PO; Domingues, CC; de Paula, E. (2011) Characterization of Detergent-Resistant Membranes from Human Erythrocytes treated with Brij detergents. 1ª Workshop Pós Biologia Funcional e Molecular, Campinas - SP.
15. **Casadei, BR**; Clop, EM; Carvalho, PO; Domingues, CC; Perillo, MA; de Paula, E. (2011) Caracterização de membranas eritrocitárias resistentes a TX-100, Brij 98 e Brij 58. XL Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Biofísica, Buenos Aires, Argentina.

16. Cereda, CMS, Franz-Montan, M, **Casadei, BR**, Pinheiro, LS, Araujo, DR, de Paula, E. (2011) Preparation of a Butamben Formulation in Elastic Liposomes. XL Annual Meeting of SBBq, Foz do Iguaçu, PR.

9. Anexos

Profa. Dra. Rachel Meneguello
Presidente
Comissão Central de Pós-Graduação
Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **“Solubilização parcial de membranas de eritrócitos e de sinaptossomas induzida por detergentes não iônicos”**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 27 de julho de 2015

Assinatura : 
Nome do(a) autor(a): **Bruna Renata Casadei**
RG n.º 43.521.649-1

Assinatura : 
Nome do(a) orientador(a): **Dra. Eneida de Paula**
RG n.º 1.512.155-9



CEP, 25/05/09.
(Grupo III)

PARECER CEP: N° 227/2009 (Este n° deve ser citado nas correspondências referente a este projeto)
CAAE: 0168.0.146.000-09

I - IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “EFEITO DE DIFERENTES DETERGENTES, ANESTÉSICOS LOCAIS E TEMPERATURA NA OBTENÇÃO DE FRAÇÕES DE MEMBRANA DE ERITRÓCITO RESISTENTES A DETERGENTES (DRM)”.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Bruna Renata Casadei.

INSTITUIÇÃO: Instituto de Biologia/UNICAMP

APRESENTAÇÃO AO CEP: 03/04/2009

APRESENTAR RELATÓRIO EM: 25/05/10 (O formulário encontra-se no *site* acima)

II - OBJETIVOS

Preparar DRMs de eritrócitos através do uso de Brij 56,58 e 98, Tween-20 e litocolato de sódio e compará-las com as obtidas por Triton X-100. Caracterizar quanto ao conteúdo lipídico (de colesterol) e protéico (total e específico), DRMs preparadas a partir de Triton X-100, Brij 56,58 e 98, Tween-20 e litocolato de sódio. Caracterizar a estrutura de DRMs obtidas com Triton X-100, Brij 56, 58 e 98, Tween-20 e litocolato de sódio. Avaliar possíveis efeitos ou interações de anestésicos locais com DRMs de eritrócitos verificar se DRMs da membrana eritrocitária podem ser isoladas e temperaturas superiores e 4°C. Variar fona iônica.

III - SUMÁRIO

Trata-se de um projeto experimental com amostra de sangue do Hemocentro, no qual serão utilizados alguns detergentes para identificar Eritrócitos Resistentes a Detergente (DRM). A pesquisadora vai utilizar amostras de anônimas de sangue e, portanto solicita dispensa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. O projeto contém um demonstrativo de orçamento e apresenta cronograma.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

Após respostas às pendências, o projeto encontra-se adequadamente redigido e de acordo com a Resolução CNS/MS 196/96 e suas complementares, bem como a dispensa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, resolve aprovar sem

**FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

🌐 www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html

restrições o Protocolo de Pesquisa, bem como ter aprovado a dispensa do Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa supracitada.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

VII - DATA DA REUNIÃO

Homologado na IV Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 28 de abril de 2009.


Prof. Dra. Carphen Sílvia Bertuzzo
PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM/UNICAMP