

A fração enriquecida de membrana plasmática (MP) obtida através de protocolos de fracionamento subcelular é comumente utilizada em estudos que investigam a capacidade de um composto para se ligar a uma proteína alvo (receptor). No entanto, a presença de membranas mitocôndrias (MM) na fração enriquecida de MP pode comprometer vários resultados experimentais porque a MM também contém receptores encontrados na MP. Com o objetivo de analisar a qualidade do fracionamento subcelular de um protocolo padrão baseado na diferença de densidades das frações subcelulares, investigamos a atividade das enzimas (a) Na⁺ K⁺-ATPase (marcador de MP) e (b) succinato desidrogenase - SD (marcador de MM), assim como (c) o imunoconteúdo do translocador de nucleotídeo de adenina (TNA - marcador de membrana MI) em frações teoricamente enriquecidas com MP ou MM. Visto que vários protocolos para o estudo da ligação de proteínas a seus receptores exigem longos períodos de incubação, também verificamos a qualidade das frações supracitadas após 24 horas de incubação em tampão adequado. Como metodologias, utilizamos ensaios colorimétricos para analisar as atividades enzimáticas. Para atividade Na⁺ K⁺-ATPase específica foi quantificado o conteúdo de fosfato inorgânico após incubação com ATP, com ou sem ouabaina específica, e para a SD foi quantificado a redução de indofenol após incubação com succinato. O imunoconteúdo do TNA foi averiguado utilizando a técnica de Western blot. Nossos resultados mostram que frações enriquecidas de MP e MM apresentam contaminação com MM e/ou MP, respectivamente. Não observamos qualquer efeito de incubação por 24h na atividade da Na + K +-ATPase e no conteúdo do TNA em ambas as frações. Surpreendentemente, a atividade da SD foi preservada na fração enriquecida de MP, mas não na fração enriquecida de MM após a incubação. Esses dados sugerem a necessidade de um uso mais cuidadoso da preparação da fração enriquecida de MP em estudos envolvendo a caracterização de proteínas da MP.