

## **DOIS PROCEDIMENTOS PARA ISOLAR SINAPTOSSOMAS USANDO GRADIENTES DE PERCOLL**

**Joao Batista Teixeira da Rocha, Carlos Fernando de Mello,**  
Departamento de Química - Centro de Ciências Naturais e Exatas  
UFSM - Santa Maria, RS

**Ana Maria Oliveira Battastini, Renato Dutra Dias**  
Departamento de Bioquímica - IB  
UFRGS - Porto Alegre, RS

**Rodrigo Bainy Leal**  
Departamento de Bioquímica - CCB  
UFSC - Florianópolis, SC

Utilizou-se recentemente com sucesso gradientes de Percoll no isolamento de sinaptossomas. O presente trabalho descreve dois procedimentos para se isolar sinaptossomas. Um deles requer o uso de um tipo de centrifuga bastante comum (Sorvall RC 2B, rotor SS-34), enquanto o outro requer o uso de ultracentrifuga (Beckman, rotor SW 50.1). O uso deste último procedimento possibilita que sinaptossomas sejam obtidos a partir de quantidades pequenas de tecido nervoso (100 mg). A caracterização parcial das frações obtidas demonstraram que os sinaptossomas sedimentam nas interfaces 10%/15% e 10%/16% para as centrifugas Sorvall e Beckman, respectivamente. A contaminação mitocondrial das frações sinaptossomais resultante dos dois procedimentos utilizados foram similares entre si e com os dados já publicados na literatura. A contaminação por membranas foi baixa no procedimento utilizando a ultracentrifuga, sendo maior com o uso da centrifuga Sorvall. Os resultados do presente estudo sugerem que sinaptossomas podem ser obtidos utilizando-se centrifugas relativamente simples (tipo "super speed") ou a partir de pequenas quantidades de tecidos (Beckman, rotor SW 50.1), num período de tempo que varia de 20 a 60 minutos.

### **SUMMARY**

Recently, Percoll gradients have been successfully used for the isolation of synaptosomes. The present report describes two procedures for isolating synaptosomes using discontinuous Percoll

gradients. One of them uses a superspeed centrifuge (Sorvall RC 2B, fixed-angle rotor SS-34), while the other uses an ultracentrifuge swinging bucket rotor (SW 50.1). Using this swinging rotor synaptosomes can be obtained from small tissue samples (100mg). The partial characterization of the fractions resulting from gradients demonstrated that intact synaptosomes were recovered from the 10%/15% and 10/16% Percoll interphases for the superspeed and ultracentrifuge, respectively. The mitochondrial contamination of the synaptosomal fractions was similar in both procedures and also similar to those reported in literature. The membrane contamination of the synaptosomal fraction obtained using the swinging rotor was very low, while the use of SS-34 rotor yield a fraction more contaminated with membranes. The results of the present study demonstrate that synaptosomes can be obtained by using relatively simple centrifuges (superspeed) or from small tissue sample (swinging rotor SW 50.1). The time of preparation range from 20 to 60 minutes.

## INTRODUÇÃO

O uso de gradientes de Percoll no isolamento de células e frações subcelulares, tais como mitocôndrias e cloroplastos tem sido bastante eficaz (1,2). Recentemente, utilizou-se com sucesso gradientes desta substância no isolamento de terminações nervosas (3-5). Os procedimentos utilizados na obtenção de terminações nervosas (sinaptossomas) mostraram inúmeras vantagens sobre outros métodos tradicionais, tais como gradientes de sacarose e Ficoll. O Percoll, devido a sua baixa viscosidade, permite que um bom fracionamento seja obtido em pouco tempo e com o uso de forças centrífugas relativamente baixas. Assim, enquanto que pelos procedimentos tradicionais, gasta-se um tempo de 2 a 5 horas para obtenção de sinaptossomas, o uso de gradientes de Percoll reduz este tempo para 20 a 60 minutos. Esta redução no tempo, associada à possibilidade de manutenção da isotonicidade do meio, permite que sinaptossomas metabolicamente ativos sejam obtidos (2,4).

O presente trabalho descreve dois procedimentos utilizados no isolamento de sinaptossomas em gradientes de Percoll. Um dos procedimentos requer o uso da centrífuga RC 2B Sorvall (rotor de ângulo fixo SS-34) e basicamente consistiu no uso da técnica descrita por Dunkley e colaboradores (4) e outro o uso de ultracentrifuga (rotor de ângulo móvel SW 50.1). A localização da fração sinaptossomal foi feita através da enzima lactato desidrogenase. Para avaliar o grau de contaminação por membranas e mitocôndrias nas diversas frações obtidas, verificou-se a distribuição das enzimas succinato desidrogenase e Na-K ATPase. O método utilizando a centrífuga Sorvall RC 2B apresenta vantagem sobre os métodos já publicados por requerer o uso de uma

centrífuga relativamente simples (tipo "superspeed"), além do que este método permitirá dizer se os dados obtidos por Dunkley colaboradores se assemelham aos obtidos com esta centrífuga. Já a técnica utilizando ultracentrífuga Beckman (rotor SW 50.1) possibilita que sinaptossomas sejam obtidos de quantidades relativamente pequenas de tecido nervoso (cerca 100 mg de tecido) o que representa uma vantagem sobre os métodos já descritos que requerem uma quantidade maior de material.

## MATERIAL E MÉTODOS

Animais e obtenção da fração S1: Foram utilizados ratos Wistar de ambos os sexos com idades que variaram de 3 a 5 meses. Os animais eram mantidos em uma colônia com ciclo de claro/escuro de 12 horas, sendo a temperatura da mesma mantida entre 23 e 25°C. Após a decapitação o cérebro era rapidamente retirado e colocado numa placa de Petri invertida sobre o gelo. Posteriormente o cortex era removido e homogenizado numa solução que consistia de Sacarose 0.32 M, EDTA 1 mM e ditioneitol (DTT) 0.25 mM, em homogeneizador de vidro. Para os experimentos utilizando a centrífuga RC 2B Sorvall a proporção peso/volume foi de 1/15. Para os experimentos utilizando a ultracentrífuga a proporção utilizada foi de 1/10. A dispersão foi obtida com 6 movimentos verticais (1000 rpm) e o homogenizado centrifugado a 1000 g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante desta fração era o S1. O precipitado desta centrifugação (núcleos e fragmentos de células) era descartado.

Preparação dos Gradientes de Percoll: As soluções contendo diferentes concentrações de Percoll (volume/volume) eram preparadas semanalmente. O volume adequado de Percoll era colocado em uma solução 4 vezes concentrada que consistia de 1.28 M de Sacarose, 4 mM de EDTA e 1 mM de DTT. O pH era ajustado para 7.4 (utilizando-se NaOH ou HCl diluído) e o volume completado com água para se ter uma concentração final de Sacarose de 0.32 M, 1 mM de EDTA e 0.25 mM de DTT.

RC 2B Sorvall: Para as experiências com a RC 2B Sorvall foram utilizados tubos de polialomeros com capacidade para 12 ml. Nestas experiências utilizou-se um gradiente de 4 passos (2 ml cada) que consistiam das seguintes concentrações de Percoll: 3%, 10%, 15% e 23%. As soluções de Percoll eram colocadas com pipetas de 2 ml, tendo-se o cuidado para não misturar soluções de concentrações distintas de Percoll. Deve-se ressaltar que era possível se enxergar uma tênue linha separando duas soluções de Percoll. A visualização da linha era feita logo após a

colocação do último passo do gradiente, e quando as três linhas (das interfaces 2%/7%, 7%/15%, 15%/23%) não eram encontradas, descartava-se o tubo. Sobre a solução de Percoll de 2% colocava-se 2 ml da fração S1. Centrifugava-se por 5 minutos a 33000 g na centrífuga RC 2B Sorvall, utilizando-se o rotor de ângulo fixo SS-34. O tempo era cronometrado e não incluía o período de aceleração e desaceleração. Desta centrifugação resultavam 4 frações que localizavam-se nas interfaces S1/3%, 3%/10%, 10%/15%, 15%/23% e um precipitado na solução 23%, as quais foram chamadas de frações 1, 2, 3, 4, e 5, respectivamente.

Ultracentrífuga Beckman: Para esta experiência utilizou-se tubos de nitrocelulose com capacidade de 5 ml. O gradiente aqui empregado possuía 4 passos de soluções de Percoll com as seguintes concentrações: 2% (1 ml), 5% (1 ml), 10% (1 ml) e 16% (1.3 ml). Como descrito acima, os gradientes que não apresentavam as 3 linhas entre os diferentes passos eram descartados. Sobre a solução de 2% colocava-se 0,6 a 0,7 ml de S1 e centrifugava-se por 20 minutos a 36000 g, utilizando-se o rotor móvel SW 50.1. Desta concentração resultavam 4 frações que localizavam-se nas interfaces S1/2% 2%/5%, 5%/10%, 10%/16% e um precipitado na solução de Percoll 16%, as quais foram chamadas de 1, 2, 3, 4 e 5, respectivamente.

Dosagem das enzimas e distribuição de proteínas: Para localizar a fração enriquecida em sinaptossomas dosou-se a enzima lactato desidrogenase (LDH) nas cinco frações coletadas antes e após o tratamento com Triton X-100. Um aumento na atividade desta enzima após o tratamento com Triton X-100 indica que existe uma liberação desta enzima "citoplasmática" de dentro do sinaptossomas. A atividade da enzima foi avaliada através do Kit A-050 (Dole reagentes e equipamentos, Goiás, Brasil) com algumas modificações. As frações (10-40 µg de proteínas) eram adicionadas a uma solução que continha uma concentração final de 0.32 M de sacarose num volume final de 720 µl (500 µl de substrato e 20 µl de alumínio férrico). As frações que foram tratadas com triton eram adicionadas a uma solução que continha um volume final de 720 µl (500 µl de substrato e 20 µl de alumínio férrico). As frações eram pré-incubadas por 5 minutos a 37°C. A reação era iniciada pela adição de 20 µl de NAD/FMS e interrompida 5 minutos após pela adição de 500 µl e solução estabilizada.

Succinato desidrogenase (SDH): A atividade da SDH foi dosada em um meio que continha 40 mM de tampão fosfato, 1.5 mM de cianeto de sódio, 50 µl de 2,6 dicloroindofenol (DCIP), 30 mM de succinato de sódio e 100 a 300 µg de proteína. As frações eram pré-incubadas por 5 minutos à 37°C e a reação iniciada pela adição de succinato de sódio. A variação na extinção foi verificada em 650 nm. O tempo de reação variou de 5 a 30 minutos, conforme a fração estudada.

Na<sup>+</sup> + K-ATPase: A atividade da Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase foi avaliada pela diferença na atividade entre um

meio que não continha e um que continha 2 mM de ouabaina. Excetuando-se a ouabaina, os meios eram constituídos de 1.5 mM de  $MgCl_2$ , 125 mM de NaCl, 5 mM de KCl, 10 de mM glicose, 225 mM de sacarose, 0.1 mM de EDTA, 50 mM de tampão tris HCl (pH 7.8) e de 50 a 300  $\mu g$  de proteínas. As frações eram pré-incubadas por 5 minutos à 37°C, sendo a reação iniciada pela adição de ATP (concentração final de 1 mM). O tempo de reação variou de 10 a 30 minutos. A reação era interrompida pela adição de TCA (2.5%). O fosfato liberado foi dosado de acordo com Fiske & Subarow (6).

Dosagem de proteína: A concentração de proteína das frações foi determinada pelo método de Lowry et al (7).

## RESULTADOS

Centrifuga RC 2B Sorvall: Os resultados da distribuição de proteínas e das enzimas marcadoras são mostrados na tabela 1. Como pode ser observado, o tratamento das frações com Triton X-100 resultou num aumento na atividade da enzima em todas as frações; sendo este aumento maior na fração 3 (interface 10%/15%). O tratamento desta fração com o detergente resultou num aumento de cerca de 15 vezes na atividade da enzima, indicando que uma maior quantidade de sinaptossomas se localizava nesta interface. A distribuição da succinato desidrogenase demonstrou que 34% da atividade foi recuperada na fração 5 (precipitado), sendo atividade específica da mesma cerca de 12 vezes maior na fração 5 do que na fração inicial (S1). A atividade específica desta enzima na fração sinaptossomal (fração 3) foi semelhante a encontrada no S1, sendo a recuperação da mesma de 6,3% nesta fração. A recuperação da enzima marcadora de membrana ( $Na^+$ ,  $K^+$ -ATPase) foi maior nas frações 1 e 2, sendo também a atividade específica da mesma maior nestas duas frações. A recuperação desta enzima na fração sinaptossomal (interface 10%/15%) foi de 5.8%.

Ultracentrifuga Beckman: Os resultados da distribuição de proteína e das enzimas marcadoras são mostradas na tabela 2. O tratamento das frações com Triton X-100 provocou um aumento na atividade da LDH de todas as frações, sendo, todavia, maior nas frações 4 (interface 10%/16%) e 5 (precipitado). A recuperação da SDH foi maior na fração 5 (cerca de 54%), sendo atividade específica da mesma maior nesta fração (cerca de 5 vezes maior que na fração S1). A fração 4 (sinaptossomal) apresentou uma recuperação de 6.4% desta enzima, sendo a atividade específica da mesma menor que a do S1. A recuperação da  $Na^+$ ,  $K^+$ -ATPase foi maior nas frações

1,2 e 3. A fração 4 apresentou uma recuperação de 2,6% da enzima, tendo-se uma redução na atividade específica da mesma de cerca de 5 vezes em relação ao S1.

## DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo demonstram que pode-se obter frações enriquecidas em sinaptossomas em períodos de tempo relativamente reduzidos (cerca de 20 a 60 minutos). No geral, a distribuição das enzimas marcadoras foi semelhante nos dois procedimentos utilizados, sendo que em relação a enzima marcadora de membrana ( $\text{Na}^+$ , K-ATPase) os resultados utilizando o rotor móvel (SW 50.1) mostraram melhores resultados: na fração sinaptossomal obtida utilizando-se o rotor SS-34 a recuperação da ATPase foi de 5,8%, o uso do rotor SW 50.1 resultou numa recuperação de 2,6% desta enzima. Isto sugere que a contaminação por membranas foi menor quando se utilizou o rotor SW 50.1. Em relação a enzima marcadora de mitocôndria, os resultados não mostraram diferenças entre os dois procedimentos. O uso do rotor SS-34 ou SW 50.1 resultou numa contaminação de cerca de 6% da atividade da succinato desidrogenase. Em relação à distribuição de proteínas, os resultados mostraram que o uso do rotor SS-34 determina uma recuperação maior de proteína na fração 1 enquanto o uso do rotor SW 50.1 determina uma maior recuperação na fração 5.

Trabalhando a partir da fração S1 Dunkley et al (5) demonstraram que os sinaptossomas são recuperados principalmente nas frações 3 e 4 (interfaces 10%/15% e 15%/23%). Considerando o aumento na atividade da LDH, os resultados dos experimentos utilizando rotor SS-34 sugerem que a fração 3 (interface 7%/15%) foi a mais enriquecida em sinaptossomas. O pequeno aumento na atividade da LDH após o tratamento com Triton na fração 4 (interface 15%/23%) sugere que esta fração apresentou um baixo enriquecimento em sinaptossomas. Estes resultados diferem dos obtidos por Dunkley et al (5) que, baseados em estudos morfológicos, demonstraram que esta fração está enriquecida em sinaptossomas. Por outro lado, baseando-se na distribuição de sinapsina I estes autores encontraram um maior enriquecimento desta proteína na fração 3 (interface 10%/15%). Estes resultados obtidos por Dunkley et al (5) sugerem que pode existir uma certa discrepância entre os marcadores bioquímicos e os morfológicos. Assim, é possível que a fração 4 obtida usando-se o rotor SS-34 esteja enriquecida em sinaptossomas quando se avalie a homogeneidade da mesma em bases morfológicas.

Os resultados da LDH obtidos utilizando o rotor SW 50.1 demonstram que a fração 4 (interface 8%/16%) foi a que apresentou um maior enriquecimento em sinaptossomas. A fração 5

também apresentou um considerável aumento na atividade da LDH após o tratamento com Triton X-100, indicando que, apesar de ser a fração enriquecida em mitocôndrias, uma quantidade considerável de sinaptossomas nela se localizou. Os resultados obtidos com ambos os tipos de rotores sugerem que os sinaptossomas se localizam nas regiões onde a concentração de Percoll é de cerca de 15 a 16%.

Em relação à distribuição da enzima marcadora de mitocôndria, os resultados demonstraram que as frações 3 (SS-34) e 4 (SW 50.1) apresentaram uma contaminação similar (cerca de 6%). A atividade específica destas frações foram também semelhantes entre si e em relação à fração inicial S1. A contaminação mitocondrial obtida no presente estudo foi menor do que a obtida por Dunkley et al (5). Estes autores encontraram, em bases morfológicas, uma contaminação mitocondrial de cerca de 8%, sendo que em base bioquímica encontraram uma contaminação de 16%. Esta discrepância entre os resultados morfológicos e bioquímicos provavelmente ocorrem devido ao fato do marcador bioquímico não distinguir as mitocôndrias intrassinaptossomais das extrassinaptossomais. No presente estudo, provavelmente a contaminação por mitocôndrias livres (extrassinaptossomais) seja ainda menor que 6%.

Em relação à distribuição da enzima marcadora de membranas ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase) os resultados mostraram que o uso do rotor SW 50.1 produziu uma fração sinaptossomal com menor contaminação com esta atividade. Os resultados obtidos no presente trabalho não puderam ser comparados com os de Dunkley et al (5) pois os mesmos não estudaram contaminação por membranas. Tais autores fizeram a análise morfológica das frações obtidas e demonstraram que cerca de 45-55% do volume das frações 3 e 4 (enriquecidas em sinaptossomas) são ocupados por sinaptossomas intactos. O restante do volume ocupado se deve à mielina (2-7%), mitocôndria (2-8%) e à estruturas não identificadas. Naturalmente que dentro das estruturas não identificadas pode-se encontrar fragmentos de membrana. Assim parece que a contaminação por membrana é melhor avaliada quando se usa um marcador bioquímico. Nagy e Delgado-Escuta (3) e Nagy et al (8) trabalhando a partir da fração P2 encontraram uma contaminação por membranas de 1,7% na fração sinaptossomal (interface 10%/16%) em relação ao homogeneizado total. A contaminação obtida com o uso do rotor SW 50.1 (2,6%) foi similar a esta por estes autores.

Concluindo, este estudo demonstra que é possível se obter frações enriquecidas em sinaptossomas num período de tempo relativamente curto. A caracterização parcial de cada um dos procedimentos demonstrou que a contaminação por mitocôndrias e membranas foi comparável à obtida pelo uso de métodos tradicionais que envolvem gradientes de sacarose e Ficoll/sacarose (9, 10, 11), tendo a vantagem da redução considerável do tempo. A diminuição no tempo para se obter

as frações sinaptossomais reduz a possibilidade de alterações funcionais nestas estruturas. Os resultados deste trabalho demonstraram que sinaptossomas podem ser obtidos utilizando-se dois tipos bastante diferentes de centrífugas, sugerindo que outros tipos de centrífugas possam ser utilizados para se obter frações enriquecidas em sinaptossomas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- DODD, P. R. et al - A rapid method for preparing synaptosomes: comparison with alternative procedures. Brain Res. 226: 107-118. (1981).
- DUNKLEY, P. R. et al - A rapid Percoll gradient procedure for isolation of synaptosomes directly from an S1 fraction: homogeneity and morphology of subcellular fractions. Brain Res., 441: 59-71. (1988).
- DUNKLEY, P. R., JARVIE, P. E., HEATHH, J. W., KIDD, G. J. e ROSTAS, J.A.P. - A rapid method for isolation of synaptosomes on Percoll gradients. Brain Res., 372: 115-129. (1986).
- FISKE, C. H. e SUBBAROW, Y. - The colorimetric determination of phosphorus. J. Biol. Chem., 66: 375-400. (1925).
- GUTIERREZ, C. et al - Purification of human T and B cells by a discontinuous density gradient of Percoll. J. Immunol. Methods, 29: 57-63. (1979).
- KUROKAWA, M., SAKAMOTO, T. e KATO, M. - Distribution of sodium-plus-potassium-stimulated adenosine-triphosphatase activity in isolated nerve-ending particles. Biochem. J., 97: 833-844. (1965).
- LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L. e RANDALL, R. J. - Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193: 265-275. (1951).
- NAGY, A. e DELGADO-ESCUETA, A. V. - Rapid preparation of synaptosomes from mammalian brain using nontoxic isoosmotic gradient material (Percoll). J. Neurochem., 43: 1114-1123. (1984).
- NAGY, A. K., SHUSTER, T. A. e DELGADO-ESCUETA, A. V. - Ecto-ATPase of mammalian synaptosomes: Identification and enzymic characterization. J. Neurochem., 47: 976-986. (1986).
- NAGY, A. K., SHUSTER, T. A. e ROSENBERG, M. D. - Adenosine triphosphatase activity at the external surface of chicken brain synaptosomes. J. Neurochem., 40: 226-234. (1983).



TAHABE, T., NISHIMURU, M. e AKAZAWA, T. - Isolating of intact chloroplasts from spinach leaf by centrifugation in gradients of modified silica "Percoll". Agric. Biol. Chem. 43: 2137-2142. (1979).

## AGRADECIMENTOS

Ao CNPq (ref. 409.020/87) e FINEP (Nº 43.860.371.00/01) pelo auxílio financeiro e ao Prof. J. A. Guimarães pela doação da ouabaina.

**Tabela 1.** Distribuição de proteínas e das enzimas LDH, SDH e Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPase nas frações S1 (inicial, 1, 2, 3, 4 e 5 obtidas utilizando o rotor SS-34 (RC 2B Sorvoall). O aumento representa o número de vezes que a atividade específica da LDH aumenta nas frações após o tratamento foi obtida dividindo-se a atividade das frações não tratadas pelas tratadas com Triton X-100. SDH: AE representa a atividade específica da enzima expressa em nmol de succinato transformado por min/mg de proteína. ATPase: AE representa a atividade específica expressa em nmol de Pi liberado por min/mg de proteína.

	PROTEÍNA			LDH		
	mg / ml	total (mg)		aumento	% de romp.	
S1	4.12±0.54	8.24±0.94	n=8	1.9	52.6	n=6
1	0.95±0.29	1.25±0.34	n=8	1.5	66.7	n=6
2	0.91±0.28	0.74±0.43	n=8	4.5	22.2	n=6
3	0.96±0.26	0.73±0.20	n=8	12.1	8.3	n=6
4	0.54±0.09	0.34±0.10	n=8	3.2	31.8	n=6
5	0.47±0.15	0.28±0.09	n=8	2.7	37.9	n=6
	SDH			Na-K-ATPase		
	AE	recuperação		AE	% recuperação	
S1	11±3	100.0	n=5	112±17	100.0	n=3
1	6±3	2.1	n=5	171±20	20.4	n=3
2	8±4	3.5	n=5	218±4	23.7	n=3
3	10±4	6.3	n=5	55±21	5.8	n=3
4	26±9	8.2	n=5	19±12	0.8	n=3
5	136±42	34.0	n=5	não detectado	0.0	n=3

Os dados representam média ± desvio padrão.

**Tabela 2.** Distribuição de proteínas e das enzimas LDH, SDH e Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPase nas frações S1 (inicial, 1, 2, 3, 4 e 5 obtidas utilizando o rotor SW 50.1 (Backman). O aumento representa o número de vezes que a atividade específica da LDH após o tratamento com Triton X-100. A

percentagem de rompimento foi obtida dividindo-se a atividade das frações não tratadas pelas tratadas com Triton. SDH: AE representa a atividade específica da enzima expressa em nmol de succinato transformado por min/mg de proteína. ATPase: AE representa a atividade específica expressa em nmol de Pi liberado por min/mg de proteína.

	PROTEÍNA			LDH		
	mg / ml	total (mg)		aumento	% de romp.	
S1	5.12±0.54	3.60±0.60	n=8	1.8	55.5	n=7
1	0.52±0.23	0.38±0.12	n=6	1.4	71.5	n=6
2	0.62±0.11	0.34±0.08	n=8	4.8	20.8	n=6
3	0.74±0.20	0.33±0.07	n=8	5.6	17.9	n=7
4	1.07±0.20	0.49±0.05	n=8	18.8	5.3	n=8
5	2.16±0.46	0.56±0.20	n=8	13.3	7.5	n=8
	SDH			Na-K-ATPase		
	AE	recuperação		AE	% recuperação	
S1	10±2	100.0	n=3	106±27	100.0	n=4
1	não encontrado	0.0	n=3	209±51	22.6	n=2
2	1±1	0.8	n=3	135±43	10.4	n=3
3	3±1	2.2	n=3	116±51	9.6	n=3
4	6±1	6.4	n=3	24±12	2.6	n=4
5	53±8	54.0	n=3	8±7	0.9	n=3

Os dados representam média ± desvio padrão.