

170

QUANTIFICAÇÃO DO COLESTEROL DA MEMBRANA PLASMÁTICA PELO MÉTODO DA COLESTEROL OXIDASE. Ana Luiza Ziulkoski, Carla C. A. Cardoso e Fátima C. R. Guma (Departamento de Bioquímica, ICBS, UFRGS)

O colesterol é um importante componente da membrana plasmática das células animais, que atua na modulação da fluidez, da estabilidade da membrana e da forma celular. As células da linhagem GRX são representativas do tecido conjuntivo hepático, caracterizando-se por sua capacidade de sofrer uma transformação fenotípica, passando de miofibroblasto (M-GRX), produtor de matriz extracelular, à lipócito (L-GRX), armazenador de vitamina A. A enzima colesterol oxidase (Chose) catalisa a oxidação do colesterol (Ch) à colestenoína (Chona). Vários trabalhos mostram que esta reação pode ocorrer diretamente em membranas plasmáticas de células em suspensão. Nosso objetivo foi adaptar esta técnica para utilização em monocamadas celulares. Monocamadas de células da linhagem GRX foram fixadas com 1% de glutaraldeído (15 min, 0°C). Após as culturas foram pré-incubadas por outros 15 min, à 37°C em tampão fosfato 0,5mM, 310mM em sacarose (pH 7,5) e então incubadas com 1,25 IU/ml de Chose. Ao fim da incubação enzimática, a Chona era extraída e quantificada espectrofotometricamente a 235 nm. A extensão da oxidação do Ch foi medida também por CCD, usando-se para separação o sistema n-heptano/éter isopropílico/ácido fórmico (60:20:2, v/v/v). As placas cromatográficas foram coradas e as bandas lipídicas quantificadas por densitometria. Através de uma curva de tempo de oxidação, verificamos que a oxidação máxima do Ch nas células M-GRX se dá após 120 min e corresponde a 60% do Ch celular. Experimentos paralelos usando células M-GRX em suspensão produziram resultados semelhantes. Utilizando esta técnica pretendemos determinar o conteúdo de Ch existente na membrana plasmática de célula M-GRX e L-GRX. (CNPq-PIBIC/UFRGS; FAPERGS).