

347

ESTUDO DA FOSFORILAÇÃO PROTÉICA EM CULTURA DE ASTRÓCITOS PERMEABILIZADOS COM DIGITONINA. Francine Tramontina, Juliana D. Karl, Carmem Gottfried, Richard Rodnight e Carlos Alberto Gonçalves (Depto de Bioquímica, ICBS, UFRGS).

Diversos estudos vêm demonstrando o importante papel dos astrócitos na plasticidade do tecido neural. Sabe-se que muitas das atividades astrocíticas são reguladas pela fosforilação de proteínas, como a GFAP (proteína ácida fibrilar glial). Esta proteína é marcadora de astrócitos e tem seu estado de fosforilação alterado, tanto em situações normais quanto patológicas, regulando a polimerização dos filamentos intermediários. A caracterização das proteínas quinases e fosfatases atuantes sobre a GFAP e outras fosfoproteínas tem sido realizadas em nosso laboratório através do uso de células intactas e frações citoesqueléticas. Verificando as limitações destes métodos, padronizamos recentemente a técnica de permeabilização de astrócitos em cultura com digitonina. Através deste método poderemos controlar mensageiros intracelulares como Ca^{2+} e AMPc, bem como, introduzir inibidores peptídicos de quinases e fosfatases, os quais são específicos e impermeáveis à membrana plasmática intacta. Foram utilizadas culturas de astrócitos de hipocampo de 15 a 25 dias, às quais foram permeabilizadas com digitonina ($30\mu M/10$ min.) em meios com diferentes composições iônicas. A permeabilização foi medida por exclusão ao corante azul de tripan. Após a permeabilização, as células foram incubadas com [^{32}P]ATP e a incorporação de ^{32}P às proteínas foi analisada por eletroforese. O perfil fosfoprotéico obtido nestas condições evidencia a viabilidade deste modelo de permeabilização para estudar o sistema fosforilante da GFAP.(CNPq, FAPERGS, PRONEX, PROPESQ)