

INTRODUÇÃO

A enzima Glutamina Sintetase (GS) cataliza a formação de glutamina a partir de glutamato e NH_4^+ . Esta atividade é particularmente importante no Sistema Nervoso Central (SNC), uma vez que auxilia na detoxificação da amônia (altamente tóxica neste tecido), além de participar no Ciclo Glutamato-Glutamina. Para avaliar se a atividade de GS é comprometida em doenças cerebrais, ensaios radiométricos são amplamente usados devido a sua alta sensibilidade. No entanto, estes ensaios exigem um alto custo e são de difícil manipulação em comparação a um ensaio colorimétrico. A GS, além da atividade de produção de glutamina, possui outro sítio catalítico que exerce a atividade glutamil-transferase, produzindo γ -glutamil-hidroxamato a partir de glutamina e NH_4^+ . Esta atividade pode ser determinada de forma colorimétrica, uma vez que o γ -glutamil-hidroxamato forma um produto corado ao entrar em contato com o cloreto férrico. Esta metodologia já foi padronizada para utilização em tecido muscular, porém nunca em tecido cerebral. Deste modo, o objetivo deste trabalho foi padronizar e avaliar a atividade glutamil-transferase da GS em fatias hipocampais de ratos e em cultura de astrócitos através de um ensaio colorimétrico.



METODOLOGIA

Amostras de tecido hipocampal ou cultura de astrócitos foram lisadas em Imidazol 50 mM

As amostras foram incubadas em tampão A (contendo os substratos e cofatores da reação) a 37°C pelo tempo indicado nas figuras

A reação foi interrompida pela adição de tampão B (contendo cloreto férrico, para a formação de cor)

A absorbância em 540 nm foi determinada em espectrofotômetro.

A curva padrão foi realizada a partir de concentrações conhecidas de γ -glutamil-hidroxamato.

RESULTADOS

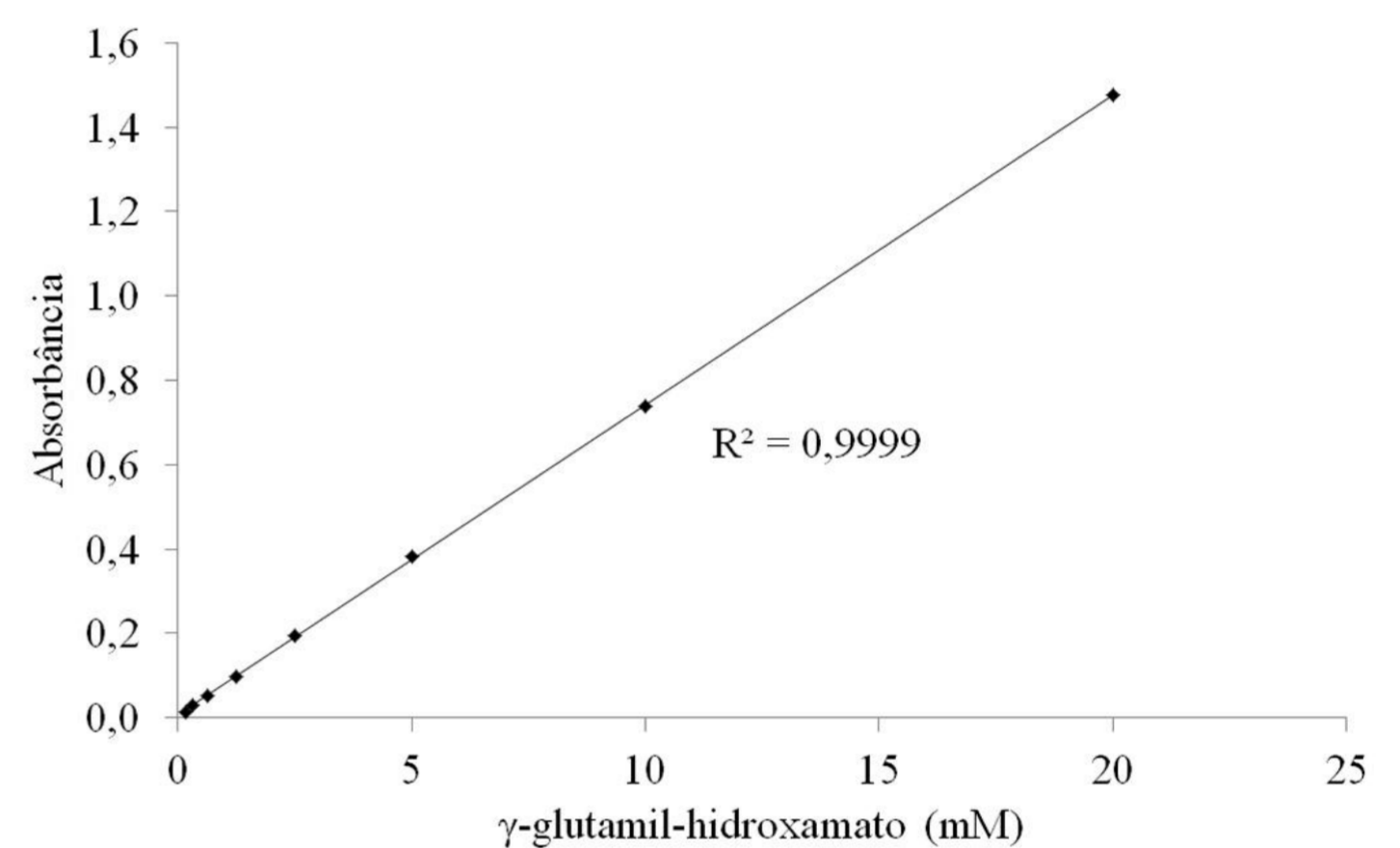


Figura 1: Curva de sensibilidade e linearidade. Curva padrão representativa realizada com quantidades conhecidas de γ -glutamil-hidroxamato variando de 0,15 a 20 mM, com o cálculo do coeficiente de correlação (R^2)

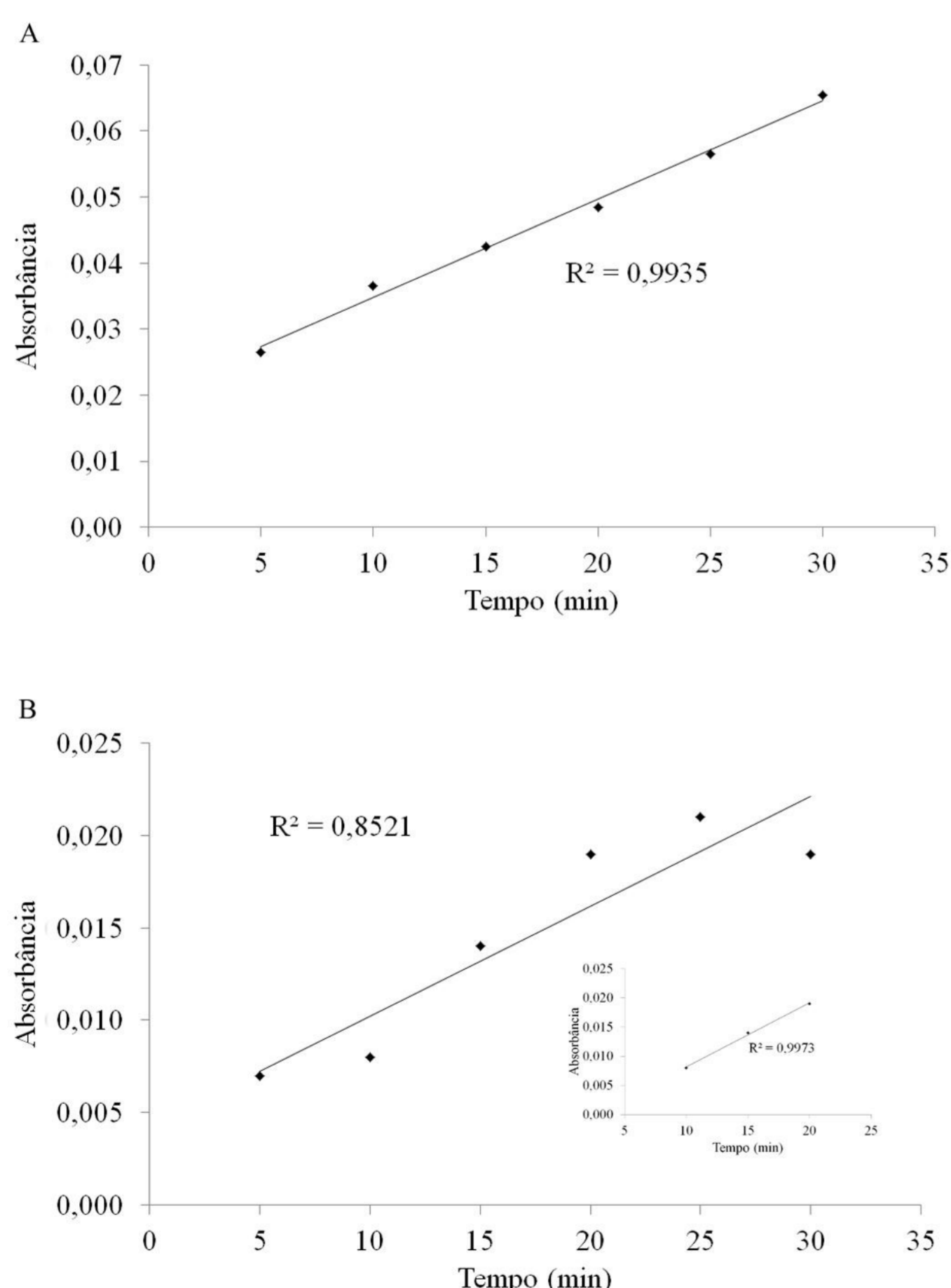


Figura 2: Curva de tempo de incubação. As mesmas amostras de cultura de astrócitos (A) ou fatias hipocampais (B) foram incubadas em diferentes intervalos de tempo, variando de 5 a 30 minutos com tampão A e, após a realização da técnica e medida da absorbância, o coeficiente de correlação (R^2) foi calculado. No detalhe em B, observamos a variação de tempo de 10 a 20 minutos.

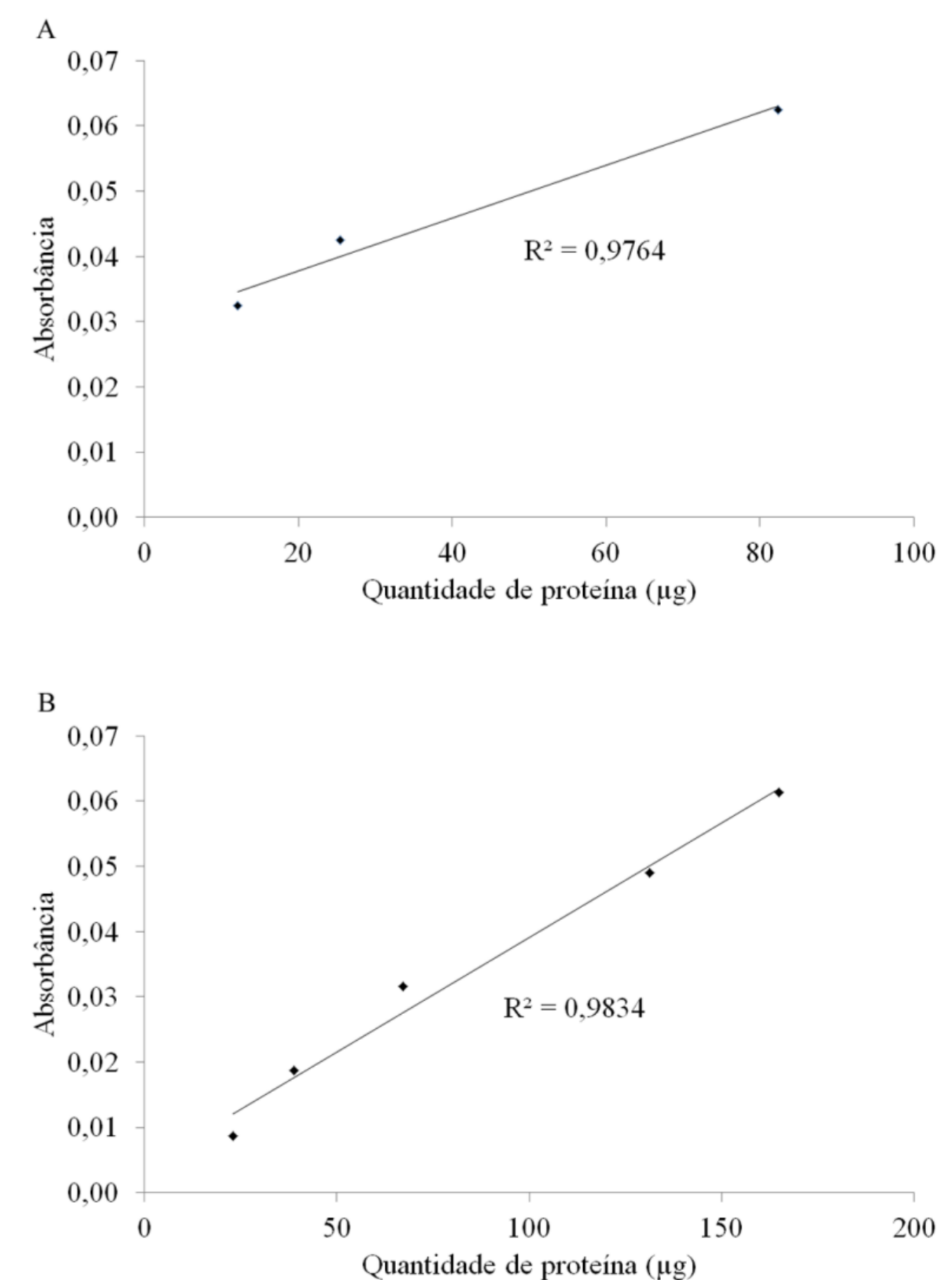


Figura 3: Curva de quantidade de proteína total. Diferentes quantidades da mesma amostra de cultura de astrócitos, variando de 20 a 80 μg (A) ou de fatias hipocampais, variando de 20 a 180 μg (B) foram incubadas por 15 minutos em tampão A e, após a realização da técnica e medida da absorbância, o coeficiente de correlação (R^2) foi calculado.

CONCLUSÕES

- ✓ A curva de GS, feita a partir do produto final de reação incubado em diferentes concentrações, teve sensibilidade a partir de 0,15 mM, sendo linear até 20 mM.
- ✓ A atividade da enzima se mostrou linear com a variação do tempo de incubação, de 5 a 30 min para amostras de cultura de astrócitos, e de 10 a 20 minutos para fatias hipocampais.
- ✓ Este ensaio se mostrou confiável, sensível, barato e rápido, tornando-se uma ferramenta útil para a investigação da atividade desta enzima em condições normais e patológicas em tecido hipocampal de ratos e em cultura de astrócitos.