

PERMEABILIZAÇÃO DE ASTRÓCITOS EM CULTURA COM DIGITONINA: UM MODELO PARA O ESTUDO DA FOSFORILAÇÃO DA GFAP. *Juliana D. Karl, Carmem Gottfried, Richard Rodnight e Carlos Alberto Gonçalves* (Departamento de Bioquímica, ICBS, UFRGS).

A fosforilação de proteínas no tecido neural é um importante mecanismo de regulação das atividades celulares. A proteína ácida fibrilar glial (GFAP), um marcador de astrócito, tem seu estado de fosforilação alterado tanto em situações normais quanto patológicas. A caracterização das proteínas quinases e fosfatases atuantes sobre a GFAP tem sido realizada através do uso de células intactas e de frações citoesqueléticas. Neste trabalho, a fim de ampliarmos nossos conhecimentos sobre o sistema fosforilante da GFAP, estamos propondo um novo modelo: a permeabilização de astrócitos hipocámpais em cultura. Este método permite o controle do cálcio intracelular, bem como a introdução de inibidores peptídicos de quinases nas células, visto que abre poros na membrana, a qual funciona normalmente como uma barreira para estas moléculas. Em nosso trabalho utilizamos a digitonina como agente permeabilizante e analisamos o grau de permeabilização pela exclusão do corante azul de trypan e atividade da LDH. Diferentes concentrações de digitonina (de 1,5 a 30 μ M) e tempos de permeabilização (de 2 a 20 minutos) foram testados e foi possível identificar a GFAP e vimentina fosforiladas nestas células quando marcadas com $[32P]ATP$. Os resultados obtidos indicam que este modelo é viável para a identificação de quinases e fosfatases endógenas atuantes sobre a GFAP.