



REVISTA DO HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE E
FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

REVISTA HCPA 2003; 23 (Supl.)

23^a SEMANA CIENTÍFICA do HCPA

De 01 a 05 de Setembro de 2003

10º Congresso de Pesquisa e Desenvolvimento em Saúde do Mercosul

Anais

EXPRESSÃO DA 3-METIL-3-GLUTARIL COENZIMA A (HMG-COA) REDUTASE EM INTESTINOS FETAIS. Gazzola J* , Verlengia R** , Curi R** . Depart. de Med. Int.-Curso de Nutrição-FAMED-UFRGS RS* Depart. de Fisiologia e Biofísica- ICB-Lab. de Metabolismo Celular USP-SP** . FAMED - UFRGS.

Fundamentação: O colesterol é um constituinte importante de membranas e participa ativamente da proliferação e diferenciação celulares. O conteúdo de colesterol na membrana plasmática de enterócitos é essencial, por exemplo, para o processo de dimerização do receptor de transcobalamina II e conseqüentemente a absorção da vitamina B12. Dessa forma, os enterócitos necessitam de um mecanismo eficiente para manter o conteúdo de colesterol intracelular em valores apropriados. A HMG-CoA redutase [E. C. 1.1.1.34], enzima - chave do metabolismo do colesterol, que catalisa a conversão de HMG-CoA em mevalonato, é o passo limitante da síntese de novo de colesterol nas células dos mamíferos. A presença de atividade dessa enzima é indicativo da capacidade de uma determinada célula em produzir colesterol. Objetivo: Assim, investigamos neste trabalho a expressão da HMG-CoA redutase em intestinos fetais de ratos. Métodos e Resultados: Fêmeas grávidas (20 dias de gestação), foram sacrificadas por decapitação o útero e o intestino delgado dos fetos foi exposto e retirado através de uma incisão abdominal. Os intestinos fetais foram cultivados em meio HF12 sem e com 10% de soro fetal bovino, durante os períodos de 4, 6 e 8 horas. Manteve-se a cultura em estufa com temperatura controlada a 37°C, atmosfera umidificada com 5% de CO₂ e 95% de ar. Após estes períodos, as amostras foram homogeneizadas com Trizol®. Extraíu-se e precipitou-se o RNA com isopropanol a 70°C. Lavou-se o precipitado com etanol a 75%, centrifugou-se e ressuspendeu-se o precipitado com 30Microlitros/L de água DEPC (dietil pirocarbonato) autoclavada. O RNA foi quantificado por espectrofotometria a 260nm. Após, fracionou-se amostras de 2Microgramas de RNA por eletroforese em gel de agarose a 1% para verificar a integridade do mesmo. Purificou-se o RNA após tratamento com 1Microlitro/L de Dnase (1U/Microgramas/L). Sintetizou-se o cDNA por transcrição reversa após reação a 42°C por 60 min num volume final de 20 Microlitros/L. Ao tubo de reação, adicionou-se 4Microlitros/L do tampão TR 5X, 2Microlitros/L de ditiotreitola a 100mM, 1Microlitro/L de uma mistura de dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP a 10mM cada), 1Microlitro/L de primers randômicos 6dNTP a 1mM, 1Microlitro/L de transcriptase reversa (Super-Script – 200U/mL) e volume apropriado de água DEPC. Ao tubo de reação de TR, adicionou-se 5Microlitros/L de tampão PCR 10X, 1Microlitro/L de dNTP, 38Microlitros/L de água DEPC, 1Microlitro/L de primer sense e 1Microlitro/L de primer anti-sense, ambos a 10Microgramas/M para o gene HMG-CoA redutase e 1Microlitro/L de Taq DNA polimerase (5U/Microlitros/L). A amplificação foi realizada utilizando um termociclador com a seguinte programação: 94°C por 3 min (desnaturação), 60°C por 1 min (anelamento) e 72°C por 1 min (extensão). Após eletroforese, confirmou-se a amplificação de fragmentos com 350bp (da HMG-CoA redutase). Dentre os períodos estudados, a HMG-CoA passou a ser expressa de modo mais notório após 4 horas de cultivo na ausência de soro fetal bovino. Conclusão: Os resultados obtidos são sugestivos de que enterócitos apresentam capacidade de síntese de colesterol já durante a fase fetal de desenvolvimento. Apoio Financeiro: FAPESP, PRONEX, CNPq, CAPES.