

083

**QUANTIFICAÇÃO DE SUBSTÂNCIA P EM MEDULA ESPINHAL DE RÃ POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA PERFORMANCE (HPLC) E RADIOIMUNOENSAIO (RIA).** Marco Pablo M. Baraldo<sup>1</sup>, André P. Schmidt<sup>1</sup>, Matilde A. Helena<sup>2</sup>, Rosa H. Crestana<sup>1</sup>, Wania A. Partata<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Departamento de Fisiologia,

<sup>2</sup>Departamento de Ciências Morfológicas, ICBS, UFRGS).

A substância P possui várias ações e possíveis funções no sistema nervoso, tais como neurotransmissor de fibras aferentes sensoriais, cossecção de fibras dopaminérgicas, entre outras. A substância P está presente nas fibras C envolvidas na neurotransmissão da dor, sendo liberada em resposta a estímulos nociceptivos. Antagonistas da substância P, quando injetados na medula dorsal, possuem efeito analgésico. HPLC vem sendo muito útil na quantificação de substâncias químicas em amostras biológicas por ser um método bastante preciso e sensível. O objetivo do presente trabalho foi desenvolver um método para identificar substância P presente em medula espinhal de rã, através de HPLC para quantificação em RIA. Utilizamos uma coluna LC-18 (25cm 4,6cm) e um gradiente de dois tampões: tampão A, água e ácido trifluoracético (TFA) 0,1%; tampão B, acetonitrilo, água e TFA (80:20:0,1%). O gradiente vai de 10 a 60% de tampão B em 35 min. A substância P foi separada de acordo com sua hidrofobicidade e detectada em 220nm com detector ultravioleta. As medulas espinhais das rãs foram retiradas após anestesia e congeladas à -80 C. A substância P foi extraída por homogeneização em ácido acético 1N; fervura por 10 minutos e centrifugação a 10 mil rpm durante 1 hora; O sobrenadante foi liofilizado, diluído em água e TFA 0,1% e filtrado em Milipore 0,  $\mu$ m. O extrato foi submetido ao HPLC, onde foi identificado o pico de substância P, apresentando um tempo de retenção de 17 minutos. Com a identificação deste pico, podemos coletar a substância P presente nas medulas e quantificá-la, posteriormente, através de RIA. (Apoio financeiro: FAPERGS; FINEP).