



Evento	Salão UFRGS 2018: FEIRA DE INOVAÇÃO TECNOLÓGICA DA UFRGS - FINOVA
Ano	2018
Local	Campus do Vale - UFRGS
Título	Padronização de técnicas de quantificação da atividade enzimática para células do cumulus oophorus humano
Autores	LUIZA DA SILVA RODRIGUES LÚCIA VON MENGDEN MEIRELLES
Orientador	FABIO KLAMT

RESUMO

TÍTULO DO PROJETO: Padronização de técnicas de quantificação da atividade enzimática para células do cumulus oophorus humano

Aluno: Luiza da Silva Rodrigues

Orientador: Fábio Klamt

RESUMO DAS ATIVIDADES

- Introdução:** As células do cumulus oophorus estão intimamente relacionadas ao oócito por meio de junções do tipo GAP e participam diretamente dos processos de maturação oocitária e proteção contra estresse oxidativo. O objetivo desse trabalho é padronizar as técnicas de quantificação da atividade enzimática da catalase e da superóxido dismutase, envolvidas no processo de defesa antioxidante, para as células do cumulus oophorus humano, com o intuito de posteriormente analisá-las como possíveis biomarcadores da qualidade oocitária. O estabelecimento de um volume mínimo de amostra necessário para realização de ensaios é extremamente relevante, já que estas possuem volume limitado.
- Atividades realizadas:** As amostras foram colocadas em 700µl de PBS e centrifugadas a 10.000g por 7 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e adicionou-se 70µl de tampão de lise (50mM TRIS pH 7.5, 150mM EDTA, 150mM NaCl, 0,5% Igepal e uma mini cápsula de inibidor de protease). As amostras foram colocadas no gelo por 30 minutos, centrifugadas novamente e o sobrenadante foi utilizado para os ensaios. A quantificação proteica foi feita pelo método de Bradford. A atividade da catalase foi determinada por espectrofotometria a 240nm em tampão KH₂PO₄ 25mM Na₂HPO₄ 40mM e peróxido 4,4M, por 60 min a 37°C. A atividade é expressa em unidade de catalase/mg de proteína. Foram testados 10, 20 e 30µl de duas amostras de cumulus (0,5408µg e 0,6355µg de proteína). A atividade da superóxido dismutase foi determinada por espectrofotometria a 480nm em tampão de glicina 50mM pH 10.2, adrenalina 60mM e catalase 10µM, pela inibição da oxidação da adrenalina. Foram testadas curvas de 0, 5, 10 e 15 µl em quatro amostras e curvas de 0, 15, 20 e 30µl em outras quatro amostras (entre 0,088 e 0,5536µg de proteína).
- Objetivos atingidos:** Padronização dos ensaios enzimáticos
- Resultados obtidos:** No ensaio da catalase, a atividade enzimática variou entre 0,6667 e 5,060 nas duas amostras, indicando que as quantidades de proteína testadas estão dentro da faixa de detecção do método. Após 30 minutos de leitura, o platô foi atingido e não foram detectadas diferenças de absorbância mesmo em maiores quantidades de proteína. No ensaio da superóxido dismutase, o método não foi eficiente para detectar a atividade da enzima em quantidades baixas de proteína (curva de 0, 5, 10 e 15µl). Já em maiores

quantidades (curva de 0, 15, 20, 30 μ l), a atividade enzimática variou entre 119,9 e 303.

5. **Conclusão:** Os resultados do ensaio da catalase mostram que o volume mínimo testado (10 μ l) pode ser utilizado para ensaios futuros. Também determinou-se 30 minutos o tempo de leitura necessário. Os resultados do ensaio da superóxido dismutase mostram que devem ser usados volumes de 15, 20 e 30 μ l e o tempo estabelecido para leitura foi de 40 minutos.