

P 3762

A sonda impermeabilizante Sulfo-NHS-LC-Biotina bloqueia a atividade da desidase tipo 3, mas não da desidase tipo 1, em células humanas intactas

Túlio Macário Graccho Serrano, Simone Magagnin Wajner
Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA)

Introdução: A desidase tipo 3 (D3) é a principal enzima inativadora de hormônios tireoidianos. Estudos prévios demonstraram que esta enzima está localizada na membrana plasmática, mas a localização do seu sítio catalítico ainda é tema de debate. **Objetivo:** Determinar se a reação catalizada pela D3 ocorre no espaço intra ou extracelular. **Métodos:** Células HEK-293 expressando de modo transiente as desidases D1 e D3 humanas (hD1 e hD3) foram incubadas por 6 ou 24 horas em meio contendo o impermeabilizante Sulfo-NHS-LC-Biotina (1mg/ml) ou a sonda intracelular Biocitina (1mg/ml). A atividade da D3 e da D1 foi medida em células intactas com concentrações fisiológicas de T3 livre e cofator endógeno. Experimentos similares foram realizados utilizando linhagens de células com expressão endógena da D1 (HEP-G2) e da D3 (MCF-7). A atividade das desidases foi medida por cromatografia descendente em papel e/ou em coluna. **Resultados:** A adição de Biotina no meio de cultura bloqueou a atividade da D3 em 6h (19.1 ± 2.2 vs. 5.8 ± 0.7 fmol/mg.prot), enquanto a atividade da D1 não foi afetada (21.2 ± 1.12 vs. 17.55 ± 1.07 pmol/mg.prot). O oposto ocorreu quando a sonda intracelular Biocitina foi utilizada (D3, 19.1 ± 2.2 vs. 12.33 ± 0.7 fmol/mg.prot e D1, 21.2 ± 1.12 vs. 3.6 ± 0.7 pmol/mg.prot). O efeito da Biotina e da Biocitina desapareceu depois de 24h de incubação, indicando que a modificação covalente causa uma inativação enzimática reversível, tempo-dependente. Resultados similares foram observados quando os experimentos foram realizados com homogenato de células e na presença do cofator artificial DTT. **Conclusão:** Esses resultados indicam que a porção catalítica da D3 está localizada no espaço extracelular. Essa localização externa da D3 na membrana plasmática dá fácil acesso para que ela inative os hormônios tireoidianos circulantes em condições fisiológicas e patológicas. Projeto aprovado pelo CEP HCPA. **Palavras-chaves:** Endocrinologia, tireóide, desidases.