Setor 01. Farmacologia Celular e Molecular

01.001

EFEITO DA DESNUTRIÇÃO MULTIFATORIAL NO CONTROLE DA HOMEOSTASIA DO CA^{2+} NO DUCTO DEFERENTE DE RATO (DDR)

Muzi-Filho, H.[1]; Paixao, A. D. O.[2]; Castro-Chaves, C.[2]; Einicker-Lamas, M.[3]; Vieyra, A.[3]; Lara Morcillo, L. S.[1]; Cunha, V. M. N.[1] - [1]UFRJ - Farmacologia Básica e Clínica - ICB; [2]UFPE - Fisiologia e Farmacologia; [3]UFRJ - IBCCF

Introdução: A desnutrição afeta 174 milhões de crianças menores de cinco anos em todo o mundo, sendo caracterizada pelo baixo peso e estatura para a idade. Este quadro é agravado pelas seqüelas de implantação silenciosa que se manifestam na população adulta traduzindo-se em um grave problema de saúde pública. No DDR encontram-se presentes diferentes componentes celulares, tais como os canais liberadores de Ca^{2+} (CRC) e a bomba SERCA, que participam da regulação do movimento intracelular do íon Ca^{2+}. Recentemente, demonstramos que a dissociação do complexo FKBP12-CRC pelo tratamento a 37°C em pH 7,4 e condições iônicas adequadas diminui a acumulação de $^{45}Ca^{2+}$ em vesículas de retículo sarcoplasmático presentes no homogeneizado deste tecido. O objetivo do presente trabalho foi estudar o efeito da desnutrição sobre o acúmulo de $^{45}Ca^{2+}$ intravesicular, a atividade e da bomba SERCA e a expressão da imunofilina FKBP12 no DDR. **Métodos:** Foram estabelecidos dois modelos de desnutrição multifatorial: (1) ratas Wistar grávidas foram alimentadas com Dieta Básica Regional (DBR), sendo sua prole alimentada com uma dieta convencional (DBR-IU); (2) logo após o desmame, ratos provenientes de mães sadias foram submetidos à dieta DBR por 13 semanas (DBR-PN). Nos grupos controles, os ratos se alimentavam da dieta convencional. Os animais foram sacrificados e o DDR foi removido, lavado, homogeneizado e ultracentrifugado a 108.000 *g* para obtenção da fração FKBP(+). Para dissociar o complexo FKBP12-CRC, parte do homogeneizado ultracentrifugado foi tratada a 37°C por 30 min antes de nova ultracentrifugação (fração FKBP(-)). Estas frações foram usadas para medida da captação de $^{45}Ca^{2+}$, atividade $(Ca^{2+}+Mg^{2+})$ATPásica e ensaios de *Western Blotting.* **Resultados:** Após 13 semanas, observa-se um aumento de 16% na relação entre o peso do ducto deferente e o peso corporal nos animais DBR-IU, quando comparada ao controle. Já nos animais DBR-PN ocorre um aumento de 33% nesta relação devido à diminuição drástica do seu peso corporal. O conteúdo de $^{45}Ca^{2+}$ da fração FKBP(-) é menor que de FKBP(+) (3,4 e 4,6 nmol $Ca^{2+}.mg^{-1}.2h^{-1}$, respectivamente, n=4, $P<0,05$) no grupo controle, o que não ocorre nos grupos de ratos desnutridos. Não foi observada alteração na atividade $(Ca^{2+}+Mg^{2+})$ATPásica da fração FKBP(+) em ambos os grupos. Em ensaio de *Western Blotting* foi observada redução de 61% da expressão de FKBP12 na fração FKBP(-) controle. Nos grupos DBR-IU e DBR-PN, observa-se redução de 63% e 82% da expressão desta imunofilina em FKBP(+), respectivamente, em relação a FKBP12(+) do grupo controle. **Discussão:** Durante o período de desnutrição, mecanismos moleculares são alterados de forma que a homeostasia intracelular de Ca^{2+} no DDR é perturbada. O peso corporal dos ratos que sofreram desnutrição é menor na idade adulta, assim como o peso médio do ducto deferente no grupo DBR-PN, sugerindo alterações morfológicas e moleculares neste tecido, decorrentes da desnutrição. Além disso, a expressão da imunofilina FKBP12 é alterada em ambos os modelos de desnutrição multifatorial, o que pode acarretar em redução do conteúdo de Ca^{2+} no lúmen do retículo sarcoplasmático e perda da capacidade contrátil do DDR. **Apoio financeiro:** Projeto Casadinho-CNPq; PROCAD-CAPES; FAPERJ

01.002

SECREÇÃO CONSTITUTIVA DA ENDOPEPTIDADE EC 3.4.24.15 (EP24.15) POR SLICES DE CEREBELO E SUA INTERAÇÃO FÍSICA COM A CALMODULINA I

Russo, L. C.[1]; Mantovani de Castro, L.[2]; Scavone, C.[1]; Ferro, E. S.[1] - [1]ICB - USP - Farmacologia; [2]ICB - USP - Histologia

Introdução A endopeptidase EC 3.4.24.15 (EP24.15) é uma enzima envolvida no metabolismo de oligopeptídeos contendo entre 5-17 aminoácidos. No meio extracelular seus potenciais substratos são neuropeptídeos como bradicinina, opióides, neurotensina, GnRH, entre outros (Shrimpton, Endocr. Rev., 23(5):647, 2002). A EP24.15 é uma proteína hidrofílica desprovida de peptídeo sinal para entrada na via secretória. Assim, sua secreção ocorre por uma via não convencional, que depende da interação com a proteína 14-3-3ε (Carreño *et al*., J.Neurochem, 93:10, 2005). Em ensaios com o sistema duplo híbrido em leveduras foi observado que a EP24.15 pode interagir com a calmodulina I (CaM). Assim, um dos objetivos desse trabalho foi caracterizar a interação física entre EP24.15 e CaM, bem como o efeito dessa possível interação na secreção alternativa da EP24.15 em células neuroendócrinas AtT20 de pituitária de camundongos. Adicionalmente, estamos procurando avaliar a secreção da EP24.15 a partir de *slices* obtidos de cérebros de ratos. **Métodos** *Interação física EP24.15-CaM*: 5µg de CaM recombinante expressa em fusão com GST foi imobilizada na resina Glutationa-Sepharose e posteriormente incubada com 10µg de EP24.15, na presença e ausência de Ca^{2+}. Após lavagens, foi feito western blot utilizando o anticorpo anti-EP24.15 para verificar a interação com a proteína CaM. A normalização da quantidade de proteínas imobilizada na resina foi determinada densitometricamente. A interação proteína-proteína também foi analisada por eletroforese em gel de poliacrilamida não desnaturante. *Slices*: avaliamos a secreção da EP24.15 em slices de cerebelo de ratos Wistar. Após o sacrifício de 4 ratos machos, os cérebros foram dissecados e os cerebelos fatiados em *slices* de 350mm em aparelho Chopper. Os *slices* foram lavados e incubados durante 15 min a 37°C para recuperação dos tecidos em tampão aCFS. Após este período 45mg de *slices* foram incubados no mesmo tampão na ausência (controle) ou presença (estimulado) de 50µM de glutamato, a 37°C. Em tempos determinados o meio foi coletado e mantido em gelo para dosagem da EP24.15 secretada e tecidual. Testes de viabilidade (MTT e LDH) foram realizados antes e após incubação com as drogas. A atividade enzimática da EP24.15 foi determinada utilizando o substrato fluorogênico QFS na presença ou ausência dos inibidores Pro-Ile e JA2. **Resultados** Os experimentos de interação demonstraram que a EP24.15 interage fisicamente com a CaM, tanto na presença como na ausência de Ca^{2+}. Apesar do aumento da secreção da EP24.15 ocorrer com o tempo, mesmo sem haver morte celular mensurável, não encontramos diferenças significativas ($p<0,05$) entre os grupos controle e estimulado com glutamato. **Discussão** Sabemos que o glutamato abre os receptores NMDA, ocasionando influxo de Ca^{2+}. Apesar de esses receptores estarem em pouca quantidade no cerebelo, o fato de termos encontrado aumento da secreção da EP24.15 no decorrer do tempo, mesmo sem estímulo, sugere que no tecido cerebral a enzima também é secretada, mas apenas de forma constitutiva. A interação da EP24.15 com a CaM foi confirmada *in vitro*. Experimentos adicionais estão em andamento procurando caracterizar se essa interação em células AtT20, bem qual sua relevância no processo de secreção alternativa da EP24.15. **Apoio Financeiro:** CAPES e Fapesp

01.003

NONGENOMIC ACTIONS OF 17β-ESTRADIOL AND ICI 182,780 ON PLC-MEDIATED PHOSPHOINOSITIDE HYDROLYSIS IN RAT UTERUS.

Konigame, V. C.[1]; Porto, C. S.[2]; Abdalla, F. M. F.[1] - [1]Instituto Butantan - Farmacologia; [2]UNIFESP - EPM - Farmacologia

Introduction: 17b-estradiol plays an important role in the development and function of the female reproductive organs (Ann. N. Y. Acad. Sci., 955: 48, 2002). In the rat uterus, the presence of estrogen receptors ERα and ERβ has been shown (Endocrinology, 138: 863, 1997). The activation of ERs by 17β-estradiol is important in the cell proliferation and differentiation. These effects can be blocked by treatment of the animals with the antiestrogen ICI 182,780 (fulvestrant) (Reprod. Biol. Endocrinol. 1: 40, 2003). In addition to the classic genomic mechanism of estrogen actions, this steroid also exerts rapid, nongenomic actions initiated at the cell surface by translocation of ERs from nuclei to the plasma membrane, and/or mediated by G-protein coupled receptor GPR30 (Trends Endocrinol. Metab.,16: 362, 2005). Furthermore, ICI 182,780 induces activation of GPR30 in different cell types (Mol. Endocrinol., 16: 70, 2002). The intracellular mechanisms involved in the nongenomic actions of 17b-estradiol and ICI 182,780 have not been explored in the uterus. The aim of the present study was to investigate the effects of 17β-estradiol and ICI 182,780 on intracellular signaling pathway (PLC-mediated phosphoinositide hydrolysis) linked to activation of estrogen receptors in rat uterus. **Methods:** The intracellular total [^{3}H]-inositol phosphate content was measured in whole uterus, myometrium and endometrium obtained from rats in estrus, as previously described (Mol. Cel. Endocr.160:17, 2000). **Results:** 17β-estradiol (1 nM) and ICI 182,780 (1 nM) caused a time-dependent (30 seconds to 30 minutes) increase on the accumulation of total [^{3}H]-inositol phosphate in whole uterus. The maximum effects were observed after 5 min (31,82±3,46% over basal level, n=4) and 1 min (17,89±1,92% over basal level, n=4) of incubation with 17β-estradiol and ICI 182,780, respectively. In the myometrium, both 17β-estradiol (5 min) and ICI 182,780 (1 min) did not change the total [^{3}H]-inositol phosphate content. However, in the endometrium, 17β-estradiol (5 min) and ICI 182,780 (1 min), respectively, induced an increase of total [^{3}H]-inositol phosphate content of 37,66±7,96%, n=6 and 22,11±7,15%, n=5 over basal level. **Conclusion:** These results indicate nongenomic actions of 17β-estradiol and ICI 182,780 on total [^{3}H]-inositol phosphate content in the endometrium and suggest a role in the function of the uterus. **Supported by**: FAPESP and CNPq.

01.004

ALTERATION OF SYMPATHETIC PURINERGIC NEUROTRANSMISSION IN RAT VAS DEFERENS (RVD) OF YOUNG DESCENDANTS OF MOTHERS RECEIVING CHRONIC TREATMENT WITH ALCOHOL DURING PREGNANCY AND NURSERY

Verde, L. F.[1]; Jurkiewicz, N. H.[1]; Reuter, H. R.[1]; Caricati-Neto, A.[1]; Jurkiewicz, A.[1] - [1]UNIFESP - EPM - Farmacologia

Introduction and Goals: Previous evidences showed that chronic treatment of rats with alcohol during pregnancy and nursery causes alteration of sympathetic neurotransmission in rat vas deferens of young descendants (ALF, 2005). Now, our objective was to check if the alterations of sympathetic neurotransmission can be also observed after contractions evoked by electrical field stimulation (EET) at lower frequencies (0.1-2.0 Hz), and if calcium–induced contractions were modified. In addition, detection of purines (ATP) released by DMPP was also made through fluorescence. **Methods and Results:** Wistar rats, 4 months old, were treated from the 1st day of pregnancy until the 10th day post-partum with 20, 25, or 30% oral alcohol *ad libitum*. Controls received drinking water. Twitch contractions were obtained in RVD of 40-day old litters submitted to electrical stimulation (0,1 - 2Hz, 1ms, 60 V). Time – response curves induced by calcium chloride ($CaCl_2$) after despolarization by KCl in calcium – free solution were also studied. The mean values (±EPM) of twitch responses were significantly lower than in controls for stimulations at 0.1 Hz (5.0,0±1.7 for treated and 14.25±3.7 for controls, n=8). Similarly differences were found after 0.2 Hz (4.8±1.6 and 15.0±3.9, n=8), 0.5 (8.5±2.9 and 24.0±6.5, n=8), 1.0 (16.3±6.9and 41.8±10.2, n=8), and 2.0 Hz (18.3±5.6and 43.2±10.1, n=8). The amount of purines (ATP) released in treated (0.006±0.003 nA, and in control vas deferens (0.011±0.003 nA, n=4) was not significantly different. The fading ratio to $CaCl_2$ (32%) was not different for control (40%). **Conclusion:** The use of alcohol during pregnancy and nursery caused a decrease of purinergic phasic response by EET, in RVD of young descendant males (40 days old litters), indicating an alteration on the sympathetic neurotransmission. **Supported by**: Fapesp, CNPq and Capes.

01.005

PARTICIPAÇÃO DO RECEPTOR B1 DE CININAS NA PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS DE MELANOMA MURINO

Dillenburg-Pilla, P.[1]; Costa-Neto, C. M.[1] - [1]FMRP - USP - Bioquímica e Imunologia

INTRODUÇÃO: O Sistema Calicreínas-Cininas (SCC) está classicamente envolvido em respostas inflamatórias e vasodilatação. Tais respostas são mediadas pelos componentes ativos do SCC, que são gerados a partir da clivagem do cininogênio pelas enzimas calicreínas, gerando os peptídeos bradicinina (BK) e calidina (KD), que se ligam com alta afinidade ao receptor B2. As cininases usam estes peptídeos como substrato, retirando a Arg carboxi-terminal de ambos, formando, respectivamente, des-Arg^{9}-BK e des-Arg^{10}-KD, que são agonistas preferenciais para o receptor B1. Melanomas são tumores muito agressivos, frequentemente reincidentes e metastáticos, que conferem baixa expectativa de vida aos pacientes. Tecidos neoplásicos apresentam proliferação celular descontrolada, conseqüência da alteração de vias de sinalização envolvidas em sobrevivência e divisão das células. A ERK, proteína membro da família das quinases ativadas por mitógenos (MAPK), é parte deste grupo de enzimas. Além disto, sabe-se que processos inflamatórios favorecem o desenvolvimento tumoral através da secreção de fatores que estimulam o crescimento do tumor. Trabalhos recentes mostram o envolvimento do receptor B2 na progressão desta neoplasia, no entanto pouco se sabe sobre a participação do receptor B1. Desta forma, o objetivo geral deste trabalho foi avaliar a participação do receptor B1 na proliferação de células de melanoma murino. Para isto, foi analisada a expressão de componentes do SCC nestas células, a taxa de viabilidade celular após tratamento com o agonista desArg^{9}-BK, e a ativação/fosforilação da proteína ERK após tratamento com o mesmo agonista. MÉTODOS: Foram utilizadas células de melanoma murino da linhagem Tm5 cultivadas em meio RPMI suplementado com 5% SFB. A analise da expressão de componentes do SCC foi feita a partir da extração de RNA total por TRIzol e RT-PCR. Para o ensaio de viabilidade/proliferação celular foi utilizado o método de MTT nas culturas tratadas com o veículo ou desArg^{9}-BK (1μM) por 24, 48 e 72h. O ensaio de ativação/fosforilação de ERK foi feito com os mesmos tratamentos por 10, 30 e 60min através de *western blotting* utilizando anti-corpos específicos contra ERK total e fosforilada. RESULTADOS: As células da linhagem Tm5 expressam endogenamente o receptor B1, a enzima conversora de angiotensina (ECA), responsável pela degradação de peptídeos ativos do SCC, e não expressam o receptor B2. Baseados nestes resultados, estimulamos as células com o agonista de B1 desArg^{9}-BK e observamos que houve um aumento de 100% na ativação/fosforilação de ERK a partir de 10min, sendo que este aumento foi sustentando por até 60min. Além disto, o mesmo tratamento feito por 72h induziu o aumento do número de células viáveis. DISCUSSÃO: Nossos resultados mostram que o receptor B1 de cininas está envolvido na progressão e desenvolvimento tumoral não somente por mediar vasodilatação e resposta inflamatória, mas também estimulando diretamente o aumento da proliferação destas células. Os ensaios de *western blotting* sugerem que a ativação de ERK pode estar mediando este efeito, uma vez que a ativação do receptor B1 mostrou-se capaz de fosforilar/ativar esta proteína quando estimulado por seu agonista desArg^{9}-BK. **Apoio Financeiro:** FAPESP, CNPq, CAPES, FAEPA.

01.006

PEPTÍDEOS INTRACELULARES MODULAM A CASCATA DE SINALIZAÇÃO DO RECEPTOR AT1 PARA A ANGIOTENSINA II

Cunha, F. M.[1]; Ferreira, Z. S.[2]; Klitzke, C. F.[3]; Markus, R. P.[2]; Ferro, E. S.[4] - [1]UNIFESP - EPM - Biologia Molecular; [2]IB - USP - Fisiologia; [3]Instituto Butantan - CAT / CEPID; [4]USP - ICB

Introdução Nosso laboratório vem trabalhando com a hipótese de que peptídeos gerados intracelularmente, após a degradação de proteínas pelo proteassoma, exercem um papel importante no estabelecimento e regulação de complexas redes protéicas, como aquelas relacionadas à sinalização induzida por agonistas de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs; Ferro ES, J Neurochem, 91: 769, 2004). Dando suporte experimental a esta hipótese, demonstramos recentemente que aproximadamente 75% dos 35 peptídeos derivados de proteínas intracelulares isolados pelo nosso grupo, possuem sítios de modificação pós-traducional (Machado MF, Biochem Biophys Res Commun, 339: 520, 2006). O objetivo do presente trabalho foi investigar o efeito de peptídeos de origem intracelular na sinalização do receptor AT1 induzida pelo seu agonista, a angiotensina II. **Métodos** O efeito intracelular de peptídeos contendo sítios de fosforilação para proteína quinase C (PKC) sobre a sinalização do receptor AT1 foi investigado em células CHO, utilizando microfisiometria e ensaios de gene-repórter. A internalização dos peptídeos foi realizada através de parte da proteína TAT do HIV. Uma vez dentro das células, estes peptídeos foram desligados do TAT por meio da redução da ponte S-S que une o peptídeo (N-terminal) ao TAT (C-terminal). A entrada e o metabolismo destes peptídeos nas células foram analisados por cromatografia líquida (HPLC) e espectrometria de massas (MALDI-TOF). **Resultados** Nos ensaios microfisiometricos, o pré-tratamento (30 min) das células CHO com uma mistura contendo 5 ou 20 uM de cada um dos peptídeos “5A”, “FE2”, “FE3” e “FE4”, inibiu em 34 e 61% respectivamente, o aumento da taxa de acidificação extracelular induzido pela angiotensina II. O mesmo efeito não foi observado quando as células foram tratadas com o peptídeo “SCB”, desprovido de sítio para PKC. Em ensaios subseqüentes utilizando gene-repórter, o tratamento das células CHO tanto com os peptídeos individuais (80 uM) como com a mistura de peptídeos (20 uM cada) aumentou em média 30% a taxa de transcrição da luciferase induzida pelo agonista angiotensina II. As análises por HPLC mostraram que a concentração citoplasmática de peptídeos livres do TAT corresponde a 1-30 % da concentração extracelular, dependendo do peptídeo analisado. O padrão de fragmentação dos peptídeos observado por MALDI-TOF indica um extenso metabolismo destes pelas oligopeptidases EP24.15 e EP24.16. **Discussão** Nossos dados demonstram pela primeira vez que peptídeos presentes no meio intracelular são capazes de modular a sinalização de GPCRs induzida extracelularmente por agonistas como a angiotensina II. Experimentos adicionais estão em andamento a fim de melhor caracterizar este novo paradigma acerca do mecanismo de ação dos peptídeos intracelulares na sinalização de GPCRs.

Apoio Financeiro: CNPq e FAPESP

01.007

EFFECT OF ARTEMISININ DERIVATIVES ON THE CA^{2+}-ATPASE ACTIVITY OF *Schistosoma mansoni*

Pimenta, P. H.[1]; Furtado, D. R.[2]; Silva, C. L. M.[1]; Noel, F.[1] - [1]UFRJ - Farmacologia Básica e Clínica - ICB; [2]UFRJ - Engenharia Química

Introduction: artemisinins are sesquiterpene lactones extracted from *Artemisia annua* and are widely used to treat multidrug-resistant malaria. Recently, it has been demonstrated that artemisinins selectively inhibit the SarcoEndoplasmic Reticulum Ca^{2+} ATPase (SERCA) ortholog of *Plasmodium falciparum* (PfATP6) with no effect on mammalian SERCAs (Eckstein-Ludwig, Nature 424:957, 2003). The presence of a leucine in position 263 (L263) appears to be critical for susceptibility to artemisinins since replacement of the L263 present in PfATP6 by an amino acid (AA) present in mammalian SERCAs turns the enzyme resistant to these drugs. Since artemether and artesunate also exhibit schistosomicidal properties by a yet unknown mechanism, we decided to investigate the putative effect of these drugs on the Ca^{2+}-ATPase activity of *Schistosoma mansoni* and to compare the AA sequence, near the position 263, of the three Ca2+-ATPases expressed in *S. mansoni* with *P. falciparum* PfATP6, mammalian SERCAs and Secretory Pathway Ca^{2+}-ATPases (SPCAs). Methods: The microsomal fraction of *S. mansoni* was used as a source of thapsigargin-sensitive Ca^{2+}-ATPase. The enzyme was incubated for 1 h in the presence of different concentrations of the artemisinin derivatives. Results: Artesunate and arthemeter partially inhibit the *S. mansoni* Ca^{2+}-ATPase activity (Imax = 69.4±5.7 % and 41.5±6.2 %, respectively) with IC_{50} of 23.5±4.2 μM and 7.4±4.0 μM, respectively (n=3). Artesunate and artemether (30 μM) did not inhibit the Ca^{2+}-ATPase activity of rat gastrocnemius (SERCA2/SERCA3). None of the mammalian and *S. mansoni* SERCAs (SMA1 and SMA2) presents a L263, but schistosome SMA3, which shows some homology with SPCA, has a leucine in position 264 (L264). Discussion: Present data show that two synthetic derivatives of artemisinin, with proven schistosomicidal activity in clinical trials, partially inhibit the Ca^{2+}-ATPase activity of adult *S. mansoni* at concentrations (μM) that have no effect on mammalian SERCAs. Therefore, the worm Ca^{2+}-ATPase may be considered as a potential molecular target of these drugs. **Supported by**: CAPES, FAPERJ, CNPq

01.008

ISOPRENALINE-INDUCED NITRIC OXIDE PRODUCTION IS MAINLY DEPENDENT OF CA^{+2} RELEASED VIA IP_3 RECEPTORS IN RAT AORTIC ENDOTHELIAL CELLS

Neto, M. A.[1]; Bendhack, L. M.[2] - [1]FCFRP - USP - Física e Química; [2]USP - FCFRP

Introduction: In endothelial cells, the b-adrenoceptors agonist isoprenaline (ISO) induce cAMP production that activates PKA leading to increase the cytosolic Ca^{+2} levels ($[Ca^{+2}]_c$) and stimulate the synthesis of nitric oxide (NO) by endothelial nitric oxide synthase (eNOS). The aim of this study was to link the effect of ISO on calcium release from endoplasmic reticulum via IP_3 receptor (IP_3R) and ryanodine receptors (RyR) with the NO production in rat aorta endothelial cells. **Methods:** in order to measure the NO production we have used the technique of Flow Cytometry. Briefly, 1 to $3x10^6$ cells were obtained, harvested and transferred to polystyrene flow cytometric tubes containing 0.5 mL of Hanks solution in 1.6 mM Ca^{+2} or zero-Ca^{+2} at 37°C. For NO detection the cells were incubated for 20 min with the selective NO dye (10 mM DAF-2/DA) as control. Afterwards, ISO (30 mM) or ISO plus the eNOS inhibitor L-NNA (10μM), or the antagonists of endoplasmic reticulum RyR (tetracaine 10μM) and IP_3R (2-APB 10μM), were added to the cells loaded with DAF-2/DA. The fluorescence intensity of DAF-2/DA of the cells was measured after zero (T0), 5 (T5) and 10 min (T10) of the given drugs incubation. The data obtained were compared to the control. **Results:** In control cells, ISO increased the fluorescence DAF-2T emission above the basal (control) in the time incubation measured: T0 (60.4±1.0%, n=3 p< 0.01), T5 (112.9±10.1%, n=3 p<0.01) and T10 (168.4±14.3%, n=3, p< 0.01). The increase of the NO production was inhibited by L-NNA: T0 (36.2±2.3%, n=3, p< 0.05), T5 (96.7±1.7%, n=3 p< 0.05), T10 (108.7±2.5%, n=3 p< 0.05). The NO production stimulated by ISO was not modified by incubation in zero-Ca^{+2} solution: T0 (68.9±6.5%; n=3), T5 (122.9±4.4%, n=3) and T10 (177.4±4.4%, n=3) as compared with control. However, in zero-Ca^{+2} medium the incubation of the cells with the combination of the antagonists 2-APB and tetracaine resulted in inhibition of NO production induced by ISO: T0 (15.6±9.4%, n=3 p< 0.001), T5 (34.8±13.7%, n=3, p<0.001) and T10 (66.1±25.4%, n=3 p< 0.001). The NO production induced by ISO was inhibited by tetracaine: T0 (30.7±3.5 %; n=3), T5 (67.5±5.5 %; n=3) and T10 (114.3±4.2 %; n=3). In the same way, the incubation of the cells with 2-APB reduced the NO production induced by ISO: T0 (51.8±3.1 %; n=3), T5 (101.7±2.2 %; n=3) and T10 (160.5±5.9 %; n=3). The IP_3R is the main mechanism that release the ions Ca^{+2} linked to NO production in rat aortic endothelial cells. **Discussion:** in rat aorta endothelial cells, the increase of fluorescence of DAF-2/DA induced by ISO indicates the NO production. These results were confirmed when L-NNA inhibited the NO production. In zero-Ca^{+2} medium the NO production was strongly inhibit when 2-APB and tetracaine were associated, suggesting that the increase of NO production stimulated by ISO is dependent of Ca^{+2} released from the endoplasmic reticulum. The individual effect of 2-APB and tetracaine after ISO stimulation shown that Ca^{+2} was mainly released via IP_3 receptor. **Supported by**: FAPESP and CNPq

01.009

ESTUDO DA CORRELAÇÃO ENTRE O AUMENTO DE CÁLCIO INTRACELULAR INDUZIDO POR GLUTAMATO E O TIPO DE MORTE CELULAR EM ASTRÓCITOS

Monteforte, P. T.[1]; Garcez do Carmo, L.[1]; Lopes, G. S.[1]; Smaili, S. S.[2] - [1]UNIFESP - EPM - Farmacologia; [2]UNIFESP - EPM - Farmacologia - MAD

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central e atua ativando receptores ionotrópicos (NMDA, AMPA e cainato) e/ou metabotrópicos (mGluR1, mGluR2 e mGluR3). A estimulação dos receptores NMDA, AMPA, cainato e mGluR1 induzem a um aumento do cálcio intracelular (Ca^{2+}_i) necessário a vários processos fisiológicos. Porém, a superestimulação desses receptores pode levar à excitotoxicidade e à morte celular por apoptose ou por necrose. No entanto, não é completamente conhecido o grau de apoptose e necrose e sua correlação com os aumentos de Ca^{2+}_i. Assim, o objetivo deste trabalho foi determinar o grau de apoptose e de necrose induzido por concentrações crescentes de glutamato. Além disso, verificar a relação destes valores com os aumentos de cálcio e o tipo de receptor glutamatérgico envolvido. Para isso foram feitas culturas primárias de astrócitos do córtex de ratos neonatos, cultivados por 8 dias, tripsinizados e utilizados de acordo com o experimento. Para os estudos com citometria as células em suspensão foram incubadas com anexina e PI e para a análise foram utilizados os canais FL-1 e FL-2, que possibilitaram a identificação dos tipos de morte celular induzidos pelo glutamato. Foram analisadas células tratadas por 6 horas com concentrações crescentes de glutamato (100, 250, 500, 750µm e 1mM). Para se observar as concentrações de Ca^{2+}_i e o tipo de receptor envolvido na resposta, as células carregadas com fura-2 foram testadas com glutamato (100, 250 e 500µm) na ausência e presença dos antagonistas DL-AP5 (antagonista de receptor NMDA) e DL-AP3 (antagonista de receptor mGluR). Estas medidas foram realizadas em microscópio de fluorescência de alta resolução em tempo real. Os resultados da citometria mostraram que a menor dose (100µM) de glutamato causou maior número de células apoptóticas (49,77%) do que necróticas (0,87%) e a dose maior de glutamato causou maior necrose (89% em relação à concentração de 100 µM). Nas medidas de Ca^{2+}_i observamos que o efeito do glutamato foi dose dependente, aumentando 37,05% com a concentração de 100 µM e 100% (relação à Rmax com digitonina) com a concentração de 500 µM. O antagonista DL-AP5 inibiu apenas as respostas de 250 e 500µM de glutamato e o DL-AP3 não inibiu as respostas induzidas por 100 µM. Esses resultados mostram que a menor dose (100µM) de glutamato que induz um pequeno aumento de Ca^{2+}_i, foi a dose que causou apoptose de maneira predominante. Ao contrário, concentrações maiores de glutamato causam maior necrose, indicando que concentrações maiores do íon no citosol correlacionam-se com um maior grau de necrose. Por outro lado, variações menores no Ca^{2+}_i podem modular a morte celular por apoptose. Os estudos com os antagonistas indicam a participação de vários receptores no aumento de Ca^{2+}_i pelo glutamato. **Apoio Financeiro:** CNPq e FAPESP.

01.010

O CA^{2+} INTRACELULAR PARTICIPA NA PROLIFERAÇÃO OU NA DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS HEMATOPOÉTICAS DEPENDENDO DA VARIAÇÃO DE CA^{2+} PRODUZIDA POR CITOCINAS OU POR ATP E ANÁLOGOS

Paredes-Gamero, E. J.[1]; Leon, C. M. M. P.[1]; Oshiro, M. E. M.[1]; Ferreira, A. T.[1] - [1]UNIFESP - EPM - Biofísica

Objetivos: Neste trabalho, pretende-se avaliar o papel do Ca^{2+} intracelular (Ca^{2+}_i) no controle dos processos de proliferação e diferenciação das células primitivas hematopoéticas quando estimuladas com citocinas e agonistas dos receptores P2. **Metodologia:** Para determinar se as citocinas movimentam Ca^{2+}_i, nos nichos proliferativos em culturas de medula óssea de longa duração (CMOLD), foram realizadas medidas de Ca^{2+}_i com o fluoróforo fluo-4 por microscopia confocal (Zeiss LSM510) em dois planos Z. As CMOLD que favorecem a mielopoese foram realizadas de camundongos C57BL6. A diferenciação foi avaliada por citometria de fluxo quantificando a porcentagem das populações Gr-1/Mac-1 (antígenos de células mielocíticas) e c-Kit (antígeno de células primitivas). **Resultados:** As células estromais (camada inferior) e hematopoéticas (camada superior) foram responsivas a todas as citocinas testadas (interleucinas: IL-3, IL-6, IL-7; fatores estimuladores de colônias: G-CSF; M-CSF; GM-CSF; stem cell factor; e eritropoetina). A IL-3 e GM-CSF promoveram pequenos aumentos de Ca^{2+}_i e grande proliferação (~20 vezes). Inibidores da sinalização de Ca^{2+}_i (U73122, inibidor da PLC, e 2APB, inibidor do receptor de IP3) inibiram parcialmente a proliferação dependente de IL-3 e GM-CSF, mas não alteraram a diferenciação. O inibidor da CaMKII (Ca^{2+}/calmodulina cinase II), KN62, promoveu diminuição da proliferação dependente de IL-3 e GM-CSF, e o inibidor da PKC, GF109203, inibiu o efeito da IL-3. A IL-3 e o GM-CSF promoveram aumento da expressão das formas ativas da PLCg, MEK, PKC e CaMKII. O ATP, ADP e UTP promoveram pequena proliferação (~6 vezes), diferenciação celular (diminuição de células c-Kit^+) relacionados com grandes aumentos de Ca^{2+}_i sendo estes efeitos inibidos pelo BAPTA/AM, quelante do Ca^{2+}_i. Ondas de Ca^{2+} foram observadas em CMOLD, a presença da conexina 43 (Cx43), proteína formadora das junções comunicantes, foi confirmada em CMOLD. O carboxolona, inibidor de junções comunicantes, diminuiu parcialmente a porcentagem de células responsivas a IL-3 e GM-CSF, no aumento do Ca^{2+}_i, mas não afetou o efeito do ATP. **Discussão:** A via do Ca^{2+}_i pode participar da proliferação dependente de IL-3 e GM-CSF ativando a PLC□ e liberando pequenas quantidades de Ca^{2+} dos estoques, com a participação de junções comunicantes, e de cinases como CaMKII e PKC; mas o Ca^{2+}_i também pode participar da diferenciação produzida por ATP e análogos com grandes elevações de Ca^{2+}_i. **Apoio Financeiro:** FAPESP

01.011

O Ca^{2+} INTRACELULAR PARTICIPA DA ATIVAÇÃO DA MEK1/2 PELO ESTÍMULO POR IL-3 E O GM-CSF EM CÉLULAS TRONCO HEMATOPOÉTICAS HUMANAS E MURINAS

Leon, C. M. M. P.[1]; Paredes-Gamero, E. J.[1]; Oshiro, M. E. M.[1]; Oliveira, J. S. R.[1]; Ferreira, A. T.[1] - [1]UNIFESP - EPM - Biofísica

Introdução

As células tronco hematopoéticas (CTH), que produzem as células sanguíneas, são reconhecidas imunofenotipicamente pelos marcadores c-$Kit^+Sca\text{-}1^+$ em murinos, e $CD34^+$ em humanos. As CTH dividem-se em: CTH de longa duração, que reconstitui indefinidamente a medula óssea (MO), em animais letalmente irradiados; e CTH de curta duração, quando reconstitui a MO de forma transiente. A hematopoese, humana e murina, é controlada por citocinas cujas principais vias de ativação são a via da JAK/STATs e Ras/MEK/MAPK. A fosforilação dos receptores de citocinas pode ser reconhecida pela PLC□ que quebra o PIP_2 produzindo diacilglicerol e IP_3, liberando o Ca^{2+} intracelular (Ca^{2+}_i) dos estoques.

Objetivos

Neste trabalho, avaliou-se o "cross-talk" entre a via do Ca^{2+}_i e a via da MEK pelo estímulo por IL-3 (interleucina 3) e GM-CSF (fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos); que controlam a proliferação e diferenciação das CTH de longa e curta duração, humanas e murinas, comparando as suas respostas.

Metodologia

As células da MO murinas foram retiradas dos fêmures dos animais, enquanto que as células humanas foram obtidas de doadores de transplante. Ambos os tipos celulares foram estimulados em solução Tyrode por IL-3 e GM-CSF (10 ng/ml). As células murinas foram fixadas e marcadas com o coquetel de marcadores de linhagens hematopoéticas maduras: lin (Ter-119; CD3, B220, Mac-1 e Gr-1 biotinilados) reveladas por streptavidina-PERCP; e c-Kit-APC e Sca-1 para as células primitivas. As células humanas foram fixadas e marcadas com CD45-PERCP (pan-leucocitário) e CD34-APC para as células primitivas. A forma ativa da MEK (P-MEK) e da PLC□ foi visualizada pelo anticorpo secundário anti-IgG-Alexa fluor 488. A quantificação da forma ativa da MEK foi realizada em comparação ao controle não estimulado utilizando citometria de fluxo. Imunofenotipagem utilizada: CTH murinas - de longa duração $Lin^-c\text{-}Kit^+Sca\text{-}1^+$; de curta duração $Lin^{low}c\text{-}Kit^+Sca\text{-}1^+$; CTH humanas $CD45^+CD34^{high}$.

Resultados

A IL-3 e o GM-CSF promoveram ativação da PLC□ de forma transiente nas CTH murinas. A ativação da PLC□ por IL-3 e GM-CSF em CTH humanas foi sustentada durante os 30 min avaliados. A IL-3 promoveu aumento da P-MEK de forma transiente, durando aproximadamente 5 min em CTH murinas. Já em CTH humanas, a ativação da P-MEK por IL-3 foi mantida durante os 30 min avaliados. O GM-CSF promoveu aumento sustentado P-MEK, com pico de ativação em 5 min, tanto em CTH murinas como humanas. Os inibidores da sinalização de Ca^{2+}_i, U73122 (inibidor da PLC) e 2APB (inibidor do receptor do IP3) bloquearam a ativação da MEK quando estimulados durante 5 min por IL-3, tanto em murinos quanto em humanos. Os inibidores da PKC (GF109203) e da MEK (PD98059) também bloquearam a ativação da MEK dependente de IL-3 em CTH humanas e murinas. A avaliação dos inibidores com o estímulo por GM-CSF ainda está em andamento.

Discussão

As citocinas, IL-3 e GM-CSF, podem promover seus efeitos pela ativação da PLC□ , que libera o Ca^{2+}_i e ativa as cinases como a PKC e a CaMKII. A ativação destas cinases estimularia a MEK, a qual faz parte da via que controla a hematopoese.

Apoio Financeiro: FAPESP

01.012

EFEITO DO VENENO *Bothrops jararacussu* NA ATIVIDADE E EXPRESSÃO DAS ISOFORMAS DA BOMBA DE CA^{2+} SERCA1 E SERCA2 EM MÚSCULO EDL DE CAMUNDONGOS: EFEITO DA HEPARINA

Schaffazick, N.[1]; Fonseca, T. F.[2]; Tomaz, M. A.[2]; Calil-Elias, S.[3]; Melo, P. A.[2]; Cunha, V. M. N.[2] - [1]UFRJ - Farmacologia; [2]UFRJ - Farmacologia Básica e Clínica - ICB; [3]UFF - Faculdade de Farmácia - Farmácia e Adm. Farmacêutica

Introdução: Dados de literatura mostram que músculos de contração rápida, como o *Extensor digitorum longus* (EDL), expressam altos níveis da isoforma da bomba de Ca^{2+} SERCA1 e, em baixos níveis, da isoforma SERCA2, preferencialmente expressa em músculo de contração lenta. Dados prévios demonstram que a exposição ao veneno de *Bothrops jararacussu* promove redução significativa da expressão da isoforma SERCA1, a partir de 24 h, retornando aos níveis de controle até o 21º dia após a exposição ao veneno. A heparina, que neutraliza a mionecrose deste veneno, não altera o perfil de regeneração da bomba SERCA1. O objetivo do presente trabalho visa avaliar o efeito do veneno de *B. jararacussu* na atividade e na expressão da bomba SERCA2 em relação à bomba SERCA1. **Métodos:** Veneno bruto (1,0 mg/kg), ou solução fisiológica salina (controle) foram administrados no músculo EDL (injeção perimuscular) da pata direita de camundongos albinos suíços. Administrou-se heparina (10 mg/kg) *i.v.*15 e 240 min, após o veneno. Nos dias 1, 3, 7 e 21 após este protocolo, os animais foram anestesiados e sacrificados e o músculo EDL isolado, dissecado, fracionado, homogeneizado e posteriormente ultracentrifugado a 108.000 *g* durante 1 h à 4°C. O material ultracentrifugado (10 µg) foi posteriormente utilizado para a análise da expressão da proteína em ensaios de *Western Blotting*, usando-se microssomas de coração (40 µg) como padrão para isoforma SERCA2 (MsC; 115 kDa). A atividade Ca^{2+}-ATPásica foi avaliada através do método Fiske & Subbarow, 1925. **Resultados:** Ensaios de *Western Blotting* indicaram a presença de banda protéica imunomarcada na mesma região de peso molecular do padrão positivo de SERCA2 (MsC). O nível de expressão da isoforma SERCA2 aumentou em cerca de 120%, 338%, 178%, 87% em 1, 3, 7, 21 dias, respectivamente nos camundongos que receberam veneno. Nos camundongos que receberam o veneno e posterior tratamento com heparina observou-se aumento de 119%, 838%, 354%, 64% em 1, 3, 7, 21 dias, respectivamente. Concentrações crescentes do veneno de *B. jararacussu* (0,1; 1,0; 10,0 µg) inibiram significativamente tanto a atividade ATPásica total (Imáx= 35%; n=3; $P< 0,05$) quanto a Ca^{2+}- estimulada (Imáx= 82%; n=3; $P< 0,05$). **Discussão:** Nossos dados indicam que a expressão da bomba SERCA2, de modo inverso ao que ocorre com a bomba SERCA1, aumenta após a exposição ao veneno de *B. jararacussu*, não retornando aos níveis controles depois da regeneração completa. Foi observado aumento da expressão da isoforma da bomba de Ca^{2+} de *turnover* lento (SERCA2). Além disso, o veneno promoveu redução da atividade da SERCA1 no músculo EDL. **Apoio financeiro:** CAPES, CNPq, FAPERJ, PRONEX

01.013

CHRONIC TREATMENT WITH AMPHETAMINE DURING PREGNANCY AFFECTS CONTRACTILE RESPONSE IN RAT VAS DEFERENS OF NEWBORN DESCENDANTS.

Santos, E. O. P.[1]; Verde, L. F.[1]; Reuter, H. R.[1]; Jurkiewicz, N. H.[1]; Jurkiewicz, A.[1] - [1]UNIFESP - EPM - Farmacologia

Introduction and objectives: Previous evidences showed that chronic injections of amphetamine to pregnant rats reduces alpha adrenergic receptor binding in brain of descendants (Ramirez, O. A., Life Sciences.32, 1835,1983). Our objective was to check if treatment of mothers with amphetamine during pregnancy and nursery produces changes of the adrenergic system in rat vas deferens (RVD) of male litters. In addition, morphologic parameters were studied. **Methods:** Wistar rats, 4-month old, were treated from the 1st day until the 18 th day of pregnancy, followed by the 1st to 28 th day post-partum (1-28 th day of nursery) with 0.5 mg/kg subcutaneous amphetamine sulfate (group P+N). A second group of newborn was treated with amphetamine during pregnancy but not on nursery (group P). Controls received saline injections (group C). Functional experiments were made by testing the contraction induced by agonists in vas deferens of 40-day old litters. **Results:** The following weights were greater in 40-day old male litters of mothers treated during pregnancy (P) than in controls (C): body (C= 145.0±3.53 and P= 160.8±2.66 g *), heart (C= 532.0±21.9 and P= 608.7±12.9* mg), testicle (C= 1.53±0.09 and P= 1.74±0.04* g), respectively, but not in vas deferens (C= 28.2±1.0 and P= 31.2±1.41 mg). The contractile maximal response of the following agonists were also greaten: noradrenaline (C= 40.25±5.32 and P= 52.25±1.39*), and $BaCl_2$ (C= 58.25±7.4 and P= 74.37±3.01*) without change of apparent affinity (pD_2). Only values of apparent affinity (pD_2) for phenylephrine (C= 5.44±0.17 and P= 6.18±0.25 *) and dopamine (C= 5.03±0.1 and P= 5.58±0.22 *) were significantly greater (indicated by asterisks) in relation to controls. For group P+N, the mean of weights for litters was not different from controls, as well as the responsiveness of RVD to adrenergic drugs, that was not modified. **Conclusion:** Amphetamine use during pregnancy affects body and organ weights in young descendant males, as well as the drug-induced contractile response of the vas deferens (group P). It is assumed that the functional changes are related, at least in part, to alterations of receptor systems. However, changes were not detected when mothers were treated during pregnancy and nursery (group P+N). **Supported by**: Fapesp, CNPq and Capes.

01.014

MODIFICATIONS OF THE AUTONOMIC NERVOUS SYSTEM IN RAT VAS DEFERENS (VD) AFTER CHRONIC TREATMENT WITH ETHYL ALCOHOL: STUDY OF THE COLINERGIC SYSTEM.

Zanetti, M.[1]; Jurkiewicz, A.[1]; Verde, L. F.[1]; Jurkiewicz, N. H.[1]; Caricati-Neto, A.[1]; Reuter, H. R.[1]; Hirata, H.[1] - [1]UNIFESP - EPM - Farmacologia

Introduction and Objectives: Our objective was to verify the action of the chronic treatment with alcohol on the activity of the Parasympathetic Nervous System and on the activity of the enzyme acetylcholinesterase (AChE), using the enzyme antagonist neostigmine "in vitro" in VD. The function of calcium was also evaluated through time-effect curves. Material and methods: Wistar 4-month old male rats were treated during 15 days, receiving daily alcohol 30% by gavage (3ml), added to alcohol 30% *ad libitum*. The controls received the same volume of water by gavage and water *ad libitum*. Functional experiments were made in VD to test contractions induced by the cholinergic agonists acetylcholine (ACh) and carbachol (CCh), in the absence and presence of neostigmine (neo) 2µg/ml) incubated for 10 or 20 minutes. From the corresponding concentration-effect curves, we measured the maximum effect (Emax), as well as the affinity (pD_2) of the agonists. Furthermore, calcium time-effect curves were made for the measurement of the corresponding phasic and tonic contractions. Results: The values of Emax for ACh+neo (10 min), of 13,3±2,1mm (n=10) was statistically different from that of control group (21,0±2,8 mm n=10), For the 20-min treated group the values of Emax (20,0±1,3 mm n=10) were also different from control group (28,7±2,2 mm n=10). However, significant differences were not seen for the Emax for ACh (54,6 t =±7,7 mm (n=9)), (c=40,8±2,7 mm (n=9)), nor for the corresponding values of pD_2 for ACh, in the absence and presence of neostigmine. For CCh+neo (10min) the values were 26,83±1,95 mm (n=6), being statistically different from the control group (36,83±2,46 mm (n=6)). Differences were not significant for the group CCh+neo (20min) in relation to control. For CCh, the values of Emax, of 27,83 mm±2,2 (n=6) for the treated group were significantly different from control values of 34,7±1,32 mm (n=6). The curves for calcium showed a phasic peak for the treated animals that was lower (48.72%, n=4) in relation to the control group (100%) while the tonic peak was 25.19% (n=4), being lower of the respective control (100%). The activity of AChE for the treated group (0,150±0,004 nmoles/min/µg/prot., n=12) was not significantly different from that of the control group (0,014±0,040 nmoles/min/µg/prot n=14). Differences were not observed for the density of the enzyme, between treated (0,200±0,004 nmoles/min/µg/prot, n=59) and controls: (0,017±0,003 nmoles/min/µg/prot, n=40). Conclusions: It was here shown that alcohol interferes with the cholinergic system, since differences were detected for the Emax for CCh. In relation to the effect of neostigmine, differences were found for ACh,10 and 20min, and for CCh, 10 min. In addition, the contractile effect of calcium was significantly reduced. However, nor the activity neither the amount of acetylcholinesterase were modified by the chronic treatment with alcohol during 15 days. It is suggested that the changes induced on the cholinergic system might be related to changes on calcium translocation. **Supported by**: Cnpq- PIBIC

01.015

FREE HEME ACTIVATES MICE MESOTHELIAL CELLS: IMPLICATIONS FOR THE INFLAMMATORY RESPONSE ASSOCIATED TO PLEURAL EFFLUX

Candea, A. L. P.[1]; Vergara, F. M. F.[1]; Barja Fidalgo, T. C.[2]; Arruda, M. A.[2]; Henriques, M. G.[1] - [1]FIOCRUZ - IOC - Farmacologia Aplicada; [2]UERJ - Farmacologia

Pathological situations such as hemolytic anemia, trauma and hemorrhage involve the release of high amounts of free heme and are frequently associated with an inflammatory status. We have recently demonstrated that free heme is a pro-inflammatory molecule (Arruda, 2005; Arruda 2006). Pleural effusion is one of those clinical manifestations closely associated to an acute inflammatory response. Mesothelial cells (MC) are metabolically active cells that line the pleura in a continuous monolayer and are able to release several proinflammatory molecules after proper stimulation. In this work, we aim to determine the activation of pleural mesothelial cells by free heme, evaluating the release of pro-inflammatory mediators as well as the pattern of expression of the inducible enzyme heme oxigenase (HO)-1 and the transcription factors hypoxia-inducible factor (HIF)-1alfa, and NF-kB. Mice mesothelial cells obtained from pleural cavity, were incubated over glass coverslips with heme (10μM) for 12-24h, in medium 199, 10% FCS, 5% CO_2, 37°C, in the absence or in the presence of pirrolidyldithiocarbamate (PDTC; 1μM), a NF-κB inhibitor for 30 min. The cell-free medium was then collected in order to analyze cytokines/chemokines production by ELISA. Expression of HO-1, HIF-1alfa and NF-kB was analyzed by confocal microscopy (Olympus, Japan). We observed that free heme was able to trigger a robust increase in KC and TNF-alpha secretion by mesothelial cells, without interfering in IL-1beta, CCL2 and IL-6 levels. Treatment with PDTC significantly inhibited KC and TNF-alfa release. The confocal microscopy analysis showed a prominent increase in HIF-1 and HO-1 expression as well as NF-Kb nuclear translocation in mesothelial cells stimulated with heme. Our results indicate that free heme evokes mesothelial cells activation, which in turn release mediators that may contribute for the onset of pleural inflammatory processes, particularly those associated with pleural efflux. This event is probably laid in heme ability to induce NF-κB activation, which is accompanied by an increase in HO-1 and HIF-1alfa expression. A better knowledge of this process may corroborate to the development of new strategies in order to ameliorate the inflammatory response associated to pleural efflux.
Supported by: CNPq, FAPERJ, SR-2/UERJ

01.016

HABILIDADE DA SURAMINA EM ANTAGONIZAR AS ALTERAÇÕES HEMODINÂMICAS INDUZIDAS PELO VENENO DE *Apis mellifera*

El-Kik, C. Z.[1]; Fernandes, F. F. A.[1]; Fonseca, T. F.[1]; Gaban, G. A.[1]; Borges, P. A.[2]; Melo, P. A.[1] - [1]UFRJ - Farmacologia Básica e Clínica - ICB; [2]UFRJ - Farmacologia

Introdução: Em nosso trabalho avaliamos a habilidade da suramina, um polianionte, em antagonizar as alterações hemodinâmicas causadas pelo veneno de abelha *Apis mellifera* como: letalidade, hematócrito, permeabilidade vascular e edema. **Material and Métodos**: Camundongos suiços adultos (20-25 g) foram utilizados nos experimentos. A letalidade provocada pelo veneno de abelha foi avaliada através da quantificação de animais mortos em 24 horas. Os camundongos receberam injeção i.p. de veneno (6.5 mg/g) ou de veneno com suramin (1-30 mg/g), pré-incubado (30 min.), pré ou pós- tratado por via i.p. 15 minutos antes ou após a injeção do veneno. Duas horas após a injeção do veneno, os animais foram anestesiados e sangue foi coletado para análise do hematócrito. Suramina (30 µg/g) reduziu 75% a mortalidade dos animais quando pre-incubado, pré e pós-tratado. O veneno provoca hemoconcentração que a suramina (30 µg/g) inibiu nos protocolos de pré-incubação e pré-tratamento. O extravasamento de plasma foi avaliado utilizando um marcador visual, o azul de Evans. A injeção intradérmica do veneno de *Apis mellifera* (1 µg/g) induziu intenso extravasamento de plasma na região injetada (690.5±23) e foi comparada com animais controle, que receberam apenas injeção de PSS (448,55±35,34). O efeito do veneno foi reduzido para (499,75±44,35; 500±37; 607,7±37) respecivamente quando pré-incubado,pré-tratado e pós-tratado com 30 µg/g de suramina. O edema de pata induzido por 0,3 µg/g do veneno de abelha foi inibido pelos tratamentos com suramina (10 µg/g). Na pré-incubação e pré-tratamento a inibição foi de 30% e 33% respectivamente. Já no protocolo de pós-tratamento, a suramina administrada 5 minutos após a injeção do veneno, inibiu cerca de 20% a capacidade de indução de edema do veneno de *Apis mellifera.* **Conclusão**: Sendo a suramina uma molécula polianiôntica, seus efeitos podem estar relacionados à interação de suas cargas com os policátions presentes no veneno de abelha, mostrando que a suramina protege contra lesões causadas pelos componentes do veneno bruto de *Apis mellifera* **Apoio Financeiro:** CAPES, FAPERJ, CNPq - PRONEX.

01.017

GERAÇÃO DE METABÓLITOS DE ANGIOTENSINA II POR PROTEÓLISE LIMITADA: UM MECANISMO DE MODULAÇÃO DA ATIVIDADE CA^{2+}-ATPÁSICA DE MEMBRANA PLASMÁTICA DE TÚBULOS PROXIMAIS.

Axelband, F.[1]; Ferrao, F. M.[1]; Dias, J.[1]; Einicker-Lamas, M.[1]; Lara Morcillo, L. S.[2]; Lara Morcillo, L. S.[2]; Vieyra, A.[1] - [1]UFRJ - IBCCF; [2]UFRJ - Farmacologia Básica e Clínica - ICB

Introdução: Recentemente foi observado que Angiotensina II (Ang II) em concentrações picomolares inibe a atividade Ca^{2+}-ATPásica de membrana basolateral (MBL) de túbulo proximal de rim de ovelha, enquanto concentrações superiores a 10^{-10} M revertem esse efeito, sugerindo o envolvimento de metabólitos deste peptídeo. A incubação das membranas com Ang II 30 µM mostra a formação de dois peptídeos, derivados de angiotensina-(1-7) [Ang-(1-7)], com tempo de retenção (em HPLC) de 10,2 min (M_1) e 11,9 min (M_2). Dessa forma, os objetivos deste trabalho são identificar os peptídeos resultantes da proteólise limitada de Ang II, avaliar seu efeito sobre a atividade Ca^{2+}-ATPásica e caracterizar os receptores envolvidos. **Métodos:** A atividade Ca^{2+}-ATPásica é mensurada segundo Taussky & Shorr (1953). Para HPLC, a MBL (1 mg/mL) é incubada com os peptídeos de angiotensina por 30 min a 37 ºC e a reação é paralisada com tampão acetato de sódio 5 mM (pH 4,6). A coluna utilizada é C-18, a detecção é a 214 nm e dois solventes são utilizados: A (água deionizada e 0,1 % de TFA) e B (90% de acetonitrila e 0,1% de TFA). Para a imunoprecipitação, a MBL foi solubilizada em CHAPS 0,01% por 30 min, após o tratamento com os peptídeos. O anticorpo anti-AT_2 (diluição 1:200) é pré-incubado com a proteína A-agarose e em seguida adicionado à MBL. Posteriormente, o sobrenadante é separado do imunoprecipitado e realizado o ensaio de Western blotting. **Resultados:** Sabendo-se que a formação dos metabólitos de Ang II tem como intermediário a Ang-(1-7), três peptídeos foram investigados: Ang-(2-7), Ang-(3-7) e Ang-(1-4). Observou-se que apenas Ang-(1-4) 10^{-14} M estimula a Ca^{2+}-ATPase (40%). A análise por HPLC revelou que Ang-(2-7), Ang-(3-7) e Ang-(1-4) não são os formados pela proteólise de Ang II. Todavia, a incubação da MBL com Ang-(1-4) por 30 min levou ao seu desaparecimento e ao surgimento de um pico com o tempo de retenção semelhante a M_1. Além disso, foi verificado que Ang-(3-4) apresenta o mesmo tempo de retenção de M_2. Posteriormente, foi investigado se o efeito dos metabólitos de Ang II é mediado pelos receptores deste peptídeo. O PD 123319 impediu a reversão do efeito de Ang II 10^{-10} M pelos metabólitos, sendo este efeito independente de AT_1. Através da técnica de imunopreciptação, foi demonstrado que em condições basais estão presentes na MBL, heterodímeros AT_1-AT_2, associados ao efeito inibitório de Ang II sobre a Ca^{2+}-ATPase, porém, concentrações elevadas de Ang II promovem um aumento de monômeros de AT_2 em relação a AT_1. **Conclusão:** Em conjunto, estes dados indicam que em situações que cursam com altos níveis de Ang II, a sua proteólise limitada leva a formação de Ang-(3-4) (M_2) e um metabólito derivado de Ang-(1-4) (M_1). Pode-se concluir que baixas concentrações de Ang II inibem a atividade Ca^{2+}-ATPásica através da sua interação com o heterodímero AT_1-AT_2. Porém, o aumento da concentração de Ang II favorece a formação de metabólitos que revertem seu efeito inibitório através do receptor AT_2. Portanto, o efeito final de Ang II sobre a e o transporte acoplado de Ca^{2+} seria o resultado da interação entre os diferentes receptores de Ang II e do balanço entre os níveis de Ang II e seus derivados. **Apoio Financeiro:** CNPq, CNPq-PIBIC, FAPERJ

01.018

VASCULAR REACTIVITY TO RELAXING AGENTS IS NOT ALTERED IN RAT AORTAS 2 HOURS AFTER INDUCTION OF SEPSIS

Araujo, A. V.[1]; Ferezin, C. Z.[2]; Mello, M. C. C.[3]; Vercesi, J. A.[2]; Bonaventura, D.[4]; Bendhack, L. M.[5] - [1]USP - Farmacologia; [2]FCFRP - USP - Física e Química; [3]USP - Física e Química; [4]FCFRP - USP - Fìsica e Química; [5]USP - FCFRP

Introduction: One characteristic of septic shock is a refractory hypotension that is poorly responsive to routine therapies. Various evidences suggest that the endogenous overproduction of nitric oxide (NO) may be responsible for the decreased vascular responsiveness to vasopressors. Cecal ligation and puncture (CLP) is an experimental model to induce sepsis. It creates a polymicrobial peritonitis which mimics perforated appendicitis and diverticulitis. **Aim:** study the vascular reactivity for endothelium dependent and independent vasorelaxation agents and the effects of the selective inhibitors of NOS isoforms (L-NNA for eNOS; 7-nitroindazole for nNOS and 1400W for iNOS) and non-selective inhibitors of NOS (L-NAME) and COX (indomethacin) in CLP-rats. **Methods:** sepsis was induced by CLP. The arterial pressure was analyzed after the induction of sepsis until rat death. Vascular reactivity was studied in rat aortas 2 h post-CLP. We analyzed the maximum effect (Emax) and potency (pD_2) of the relaxant agents. **Results:** we observed a significant reduction on arterial pressure 5 h and 30 min after CLP (-15 mmHg). This hypotension enhanced until 7 h when it was too intense that caused rat death. Vascular reactivity experiments using standard muscle bath procedures showed that the relaxation induced by the NO donor SNP was not altered by induction of sepsis in aortic rings with or without endothelium when compared to control rats. Similar results were observed to the non-selective inhibition of NOS and COX, as well as in the presence of selective inhibitors of NOS isoforms. Our results showed that the vascular response to the endothelium-dependent agonist acetylcholine (ACh) (Control, Emax: 98.5±1.8%; pD_2: 7.18±0.24, n=6 and CLP, Emax: 102.2±2.7%; pD_2: 7.62±0.07, n=5) was abolished by L-NAME and L-NNA. The effect of 1400W was not different between control and CLP rat aortas (Control, Emax: 99.2±1.5%; pD_2: 7.88±0.22, n=6 and CLP, Emax: 102.1±2.1%; pD_2: 7.70±0.20, n=4). However, the effect of 7-nitroindazole was greater in control (Control, Emax: 69.0±6.61%; pD_2: 6.78±0.07, n=5) than in CLP-rat aorta (CLP, Emax: 89.7±6.4%; pD_2: 7.24±0.10, n=6). In the presence of indomethacin, there was no difference in Emax neither in pD_2 of CLP-rat aortas when compared with their respective controls in absence of the inhibitor (Control, Emax: 85.9±4.6; pD_2: 7.18±0.23 n=6 and CLP, Emax: 100.3±2.0%; pD_2: 7.62±0.07, n=7). Conclusion: Our results show that 2h after the induction of sepsis there was no alteration in vascular reactivity for endothelium-dependent and independent relaxing agents. No changes were observed in the effects of the NOS and COX inhibitors, in CLP-rat aortas when compared with control aortas, except in the effect of the 7-nitroindazole, which suggests that the nNOS is more important in control than in CLP-rat aortas. Furthermore, the involvement of prostanoids seems to be not important for the SNP and ACh-relaxation. **Supported by**: CAPES, CNPq, FAPESP, Pró-Reitoria de Pesquisa da USP

01.019

ESTROGEN ACTION VIA THE G-PROTEIN COUPLED RECEPTOR IN RAT SERTOLI CELLS

Lucas, T. F. G.[1]; Siu, E. R.[1]; Lazari, M. F. M.[1]; Porto, C. S.[1] - [1]UNIFESP - EPM - Farmacologia

17b-estradiol (E2) plays an important role in the development, differentiation and growth of the male reproductive system by binding to estrogen receptors (ERa and ERb) (see for reviews: Hess et al., J Androl. 18:602, 1997; Carreau et al., Mol Cell Endocrinol. 26:246, 2006; Sierens et al., Ann N Y Acad Sci. 1061:65, 2005; Akingbemi Reprod. Biol. Endocrinol. 3:51, 2005). Our previous studies showed that the E2 effects on Sertoli cell (Sc) function involves: translocation of the ERa and ERb to the plasma membrane mediated by the nonreceptor tyrosine kinase Src, activation of the MAPK (Erk1/2) and cell proliferation (Lucas et al., Abstract The Endocrine Society's 88th Annual Meeting., pp 718, 2006). In addition, E2 or antiestrogen ICI 182,780 (ICI) can also rapidly activate Erk1/2 after downregulation of both ERs in Sc, through unidentified ER-mediated mechanisms. The rapid action of estrogen can be mediated by membrane translocation of ERs or through proteins other than ERs, such as G-protein coupled receptor (GPR30), as previously shown in different cells (see for reviews: Filardo, Mol Endocrinol. 16:70,2002; Filardo and Thomas, Trends Endocrinol Metab. 16:362, 2005; Manavathi and Kumar, J Cell Physiol.207:594, 2006). Thus, the aim of the present study was to demonstrate the expression of GPR30 in cultured Sertoli cells from immature rats and the role of E2 and ICI to induce Erk1/2 activation and Sc proliferation. RT-PCR assays detected transcript of the expected size (662 pb) for GPR30. E2 (10^{-10} M, 35°C) induced a rapid and transient increase in the phosphorylation state of Erk1/2. Peak Erk1/2 phosphorylation levels occurred at 10 min (7- to 12-fold increase) with Erk1/2 activity returning to basal levels by 15-30 min. Cells treated with cAMP-dependent protein kinase A inhibitor H89 (20 mM, 2 h) maintained elevated levels of Erk1/2 activity for an extendent period of time (more than 30 min) after E2 stimulation. Erk1/2 activation in Sc could also be achieved using ICI (10^{-9}M). An increase in cell proliferation was observed after these treatments. The activation of Erk1/2 and cell proliferation were blocked by pre-treatment of Sc with pertussis toxin (PTX, 100 mM, 16 h) or Src family tyrosine kinase inhibitor PP2 (5 nM, 30 min), before stimulation with either E2 or ICI. EGF receptor kinase inhibitor AG 1478 (50 μM, 15 min), metalloprotease inhibitor GM 6001 (200 nM, 30 min) and MEK1/2 inhibitor U0126 (100 mM, 30 min) also blocked Erk1/2 activation. Taken together, these data suggest that E2-GPR30 signaling occurs through a PTX-sensitive pathway that requires Src-related tyrosine kinase activity. The activation of Erk1/2 induced by E2 or ICI is dependent upon transactivation of the EGF receptor via release of heparin-bound EGF. Furthermore, the activation of cAMP-dependent PKA is required to restore E2-induced Erk1/2 activity to basal levels. **Supported by**: FAPESP, PRONEX, and CNPq

01.020

CARACTERIZAÇÃO DA TAQUIFILAXIA INDUZIDA PELA OXIMETAZOLINA NO DUCTO DEFERENTE DE RATO

Akinaga, J.[1]; Pupo, A. S.[1] - [1]UNESP - IB - Botucatu - Farmacologia

Introdução: A taquifilaxia é um fenômeno farmacológico caracterizado pela diminuição da resposta de um tecido a estímulos sucessivos. Agonistas de α_1-adrenoceptores (α_1-ARs) são úteis no tratamento da hipotensão, choque e taquicardia atrial paroxística e são bons candidatos no tratamento da incontinência urinária e da enxaqueca. No entanto, relativamente pouco é sabido sobre a taquifilaxia induzida por agonistas α_1-ARs. O objetivo do presente estudo é investigar a capacidade de agonistas de α_1-ARs pertencentes a duas diferentes classes químicas (imidazolinas e feniletilaminas) induzirem taquifilaxia nas contrações mediadas por α_{1A}-ARs no ducto deferente de rato. **Métodos**: Ductos deferentes de ratos Wistar (DDR) foram retirados e mantidos sob tensão ótima de 1.0g, em banhos de tecido com solução nutritiva a 30°C com a seguinte composição (mM): NaCl 138; KCl 5.7, $CaCl_2$ 1.8, NaH_2PO_4 0.36, $NaHCO_3$ 15, dextrose 5.5, aeração constante de mistura carbogênica (95%O_2, 5%CO_2), pH 7.4. A capacidade dos agonistas de α_1-ARs induzirem taquifilaxia nas contrações do DDR foi investigada pela construção de curvas concentração-resposta cumulativas (CCR). Os valores representam a média±o erro padrão da média de 4 a 6 experimentos independentes. **Resultados e Discussão:** Todos os agonistas contraíram o DDR. A potência (pD_2) e eficácia (E_{max}, em gramas de tensão) determinadas na primeira CCR das feniletilaminas foram (pD_2 e E_{max}, respectivamente): noradrenalina (NOR: 6.7±0.1; 1.7±0.1); fenilefrina (FE: 5.8±0.1; 1.7±0.1); metoxamina (MET :5.3±0.1; 1.7±0.1) e das imidazolinas oximetazolina (OXI: 6.2±0.1; 0.6±0.1); nafazolina (NFZ: 5.5±0.1; 0.7±0.1); A61603 (7.5±0.1; 1.6±0.1). Numa segunda CCR, a potência e a eficácia (pD_2 e E_{max}, respectivamente) não diferiram daquelas encontradas na primeira CCR das feniletilaminas NOR (7.0±0.1; 1.8±0.1), FE (5.7±0.1; 1.9±0.1) e MET (5.5±0.1; 1.7±0.1) e imidazolinas NFZ (5.8±0.2; 0.6±0.1) e A61603 (7.8±0.1 e 1.4±0.1), indicando que as contrações induzidas por essas drogas no DDR não apresentam taquifilaxia. Por outro lado, houve intensa taquifilaxia nas contrações induzidas pela OXI uma vez que, quando testada 30 e 60 min após a primeira CCR, essa imidazolina não contraiu o DDR. A taquifilaxia induzida pela OXI também ocorre de forma cruzada para outros agonistas de α_1-ARs, uma vez que o tratamento dos DDR com OXI 10μM/5min promoveu um deslocamento à direita de 30 vezes na CCR de NOR associado a uma depressão de $\cong$40% da resposta máxima. A taquifilaxia cruzada induzida pela OXI foi prevenida pelo prazosin (10nM), indicando que essa taquifilaxia resulta da ativação de α_1-ARs. **Conclusões:** O presente estudo mostra resultados surpreendentes sobre a taquifilaxia mediada por α_1-ARs do DDR: 1) somente as respostas induzidas pela OXI apresentaram taquifilaxia, apesar dessa imidazolina ser um agonista parcial nos α_{1A}-ARs do DDR 2) as outras duas imidazolinas investigadas, NFZ e A61603, apesar de estruturalmente relacionadas a OXI e de uma delas (NFZ) ser um agonista parcial de eficácia semelhante a da OXI, não induziram taquifilaxia. As bases farmacológicas desses surpreendentes resultados ainda precisam ser estabelecidas. **Apoio Financeiro:** FAPESP (05/57569-9)

01.021

CARDIAC FIBROBLASTS OF CAVEOLIN-1 NULL MICE EXHIBIT IMPROVED NA^+/K^+-ATPASE PUMPING BUT IMPAIRED OUABAIN-EVOKED SIGNALING FUNCTION

Quintas, L. E. M.[1]; Xie, Z. J.[2] - [1]UFRJ / University of Toledo - Farmacologia Básica e Clínica / Physiology, Pharmacology, Metabolism and Cardiovascular Sciences; [2]University of Toledo - Physiology, Pharmacology, Metabolism and Cardiovascular Sciences

Introduction: It is now well-established that besides its conventional cation pumping role, the Na^+/K^+-ATPase also acts as a signal transducer after binding to cardiotonic steroids, such as ouabain. The signaling cascade triggered depends upon the interaction of the enzyme with its several partners that appear to be concentrated in caveolae, flask-shaped lipid rafts that present as an intrinsic component the structural protein caveolin. We have shown that *in vitro* disruption of caveolae, by cholesterol depletion or siRNA-induced caveolin-1 knockdown impairs ouabain-induced signaling, and increases Na^+/K^+-ATPase pumping activity. Here we investigate the effect of *in vivo* caveolin-1 gene knockout on Na^+/K^+-ATPase function of cardiac fibroblasts. **Methods:** Primary cardiac fibroblast cultures of cav-1(-/-) and wild type (control) mice were used in experiments to measure ouabain-sensitive $^{86}Rb^+$-uptake. We have also evaluated the effect of different ouabain concentrations on Na^+/K^+-ATPase $\alpha 1$ subunit and pERK1/2 protein levels (by immunoblot) in total fibroblast lysates as well as on cell proliferation and [^{3}H]proline incorporation. **Results:** Compared to controls, cav-1(-/-) cardiac fibroblasts presented a higher ouabain-sensitive Rb^+-uptake activity (increase of 69.6±9.7%, $p<0.001$, n=5), whereas total cellular Na^+/K^+-ATPase $\alpha 1$ content was not changed. Total cholesterol amount was not different between the two groups. On the other hand, relatively low concentrations of ouabain were able to enhance pERK1/2 expression (10 and 100 mM, increase of 19.8±9.1 and 38.8±17.2%, respectively, $p<0.05$, n=5), cell proliferation (1 and 10 mM, increase of 25.6±0.4 and 23.5±0.6%, respectively, $p<0.005$, n=5) and proline incorporation (10 and 100 nM, increase of 22.4±5.5 and 55.3±14.3%, respectively, $p<0.01$, n=4) in controls but not in cav-1(-/-) fibroblasts. **Discussion:** Our data show that complete absence of caveolin-1/caveolae by *in vivo* genetic knockout increments Na^+/K^+-ATPase pumping function and depresses its signaling function, reinforcing the importance of this protein/system to ouabain-induced signalplex. They also support the hypothesis of the existence of two interconverting pools of the enzyme in living cells, one that performs ion transport and other that mediates a signaling cascade through protein-protein interactions. L.E.M.Q. is recipient of postdoctoral fellowship from CNPq (Brazil). This work is supported by NIH Grants HL-36573 and HL-67963.

01.022

EFEITOS DA DESANDROGENIZAÇÃO COM FLUTAMIDA E COM FINASTERIDA NA TRANSMISSÃO SIMPÁTICA DO DUCTO DEFERENTE DE RATO

Barros, J. S.[1]; Souccar, C.[2]; Lima-Landman, M. T. R.[2]; Lapa, A. J.[2] - [1]CBA - Farmacologia e Toxicologia de Medicamentos; [2]UNIFESP - EPM - Farmacologia

Introdução: A desandrogenização é terapia de eleição para câncer de próstata. A castração é simples e efetiva, mas a mutilação tem baixa aceitação. O uso de antiandrógenos, além de menos eficiente, traz efeitos colaterais, às vezes graves, mais freqüentes com bloqueadores do receptor androgênico (Flutamida –FLU) do que com inibidores da 5-alfa-redutase tipo II (Finasterida – Fin). Na ausência da testosterona há atrofia dos órgãos alvos e readaptação da inervação autônoma. O objetivo deste trabalho foi comparar os efeitos da castração e do tratamento com FLU e Fin na transmissão simpática e na contratilidade do ducto deferente de rato. **Métodos**: Ratos machos adultos (N) foram castrados por 7 (C7) dias, tratados com FLU (25 mg/kg/dia, *p.o.*) ou com Fin (5 mg/kg/dia, *p.o.*) por 7 dias. O peso corporal (PC), e o dos órgãos alvo - próstata ventral (PV), vesícula seminal (VS), músculo elevador do ânus (EA), e porções prostática e epididimal (DD_P e DD_E) do ducto deferente (DD) - foram determinados. Os ductos deferentes foram isolados e as DD_P e DD_E adaptadas a cubas de 2ml contendo Krebs modificado sem Mg^{2+}, pH 7.4, carbogenado, a 30°C, sob tensão de 1 g. As contrações isométricas obtidas por estimulação de campo (0,5 ms, 0,1 Hz, 50 - 70V) foram registradas por 1 h. Curvas cumulativas de Noradrenalina (Nor 10^{-9} – 10^{-4} M) foram realizadas sem estimulação elétrica. Os resultados foram expressos como média±erro padrão para os pesos, ou média geométrica e limites de confiança para os valores de EC_{50}. ANOVA seguida pelo teste de Tukey foram usados na comparação dos resultados. (CEP / UNIFESP - 1605/04). **Resultados**: O peso corporal dos ratos não foi alterado com os tratamentos (N = 287,5±16,1 g, n=4). A PV, VS, DD e o EA atrofiaram com a castração de 88%, 57%, 51% e 39%; com o tratamento com FLU a atrofia foi de 48%, 30%, 39% e 26% e com a Fin a atrofia foi de 27%, 16%, 18% e 0%, respectivamente. A tensão de contração (TC) do DD_E (N= 48,9±25,1 mg de tensão/mg de tecido) não foi diferente nos grupos experimentais. No DD_P, a TC (76.6 + 20,1 mg/mg tecido) foi reduzida nos grupos FLU e Fin de 44% e 82%, respectivamente. A CE_{50} da Nor foi 7 vezes maior em DD_P que em DD_E (1,5 µM e 0,2 µM, respectivamente), mas não houve diferença na CE_{50} dos grupos tratados. **Discussão**: A atrofia dos órgãos alvo foi pós-castração > FLU>Fin, confirmando a eficiência relativa da desandrogenização. O EA não foi sensível à inibição da 5-alfa redutase, porque é responsivo à testosterona. A desandrogenização atrofiou o DD_P, mas não alterou o peso ou a resposta contrátil do DD_E. A castração atrofiou o DD_P sem alterar a sua contratilidade, mas o FLU e a Fin, menos eficientes na atrofia, reduziram a contratilidade muscular ao estímulo simpático. Este efeito não foi relacionado a uma menor afinidade da noradrenalina por receptores alfa pós-juncionais. A relação inversa entre atrofia e capacidade contrátil ao estímulo elétrico supramáximo observada após tratamento antiandrogênico, indica que os antiandrógenos exercem uma provável ação inibitória na transmissão simpática. **Apoio financeiro:** CBA, CNPq, Fapesp

01.023

SIGNALING MECHANISMS OF THE MODULATION OF RHODOPSIN EXPRESSION BY ENDOTHELINS IN PIGMENT CELLS

Lopes, G. J. D.[1]; Castro, T. M. P.[1]; Visconti, M. A.[1]; Castrucci, A. M. de L.[1] - [1]USP - Instituto de Biociências

INTRODUCTION: Endothelins (ETs) and sarafotoxins (SFs) are a family of peptides which, besides their well known vaso-active actions, can also regulate pigment migration and/or production in pigment cells. In human melanocytes, endothelins promote proliferation and melanogenesis. These effects are mediated by different signaling mechanisms, such as the PLC pathway, the activation of a PKC and the MAPK pathway. *Carassius auratus* GEM-81 erythrophoroma cells and *Mus musculus* B16 melanocytes express the photo-pigment rhodopsin and endothelin receptors (ET_A and ET_B, respectively). Since endothelins are able to induce responses in pigment cells and GEM-81 and B16 cells express endothelin receptors, we decided to investigate: 1) whether rhodopsin expression could be regulated by endothelins, 2) the signaling mechanisms involved in this modulation. METHODS: GEM-81 cells were treated with SF S6c (10^{-11}-10^{-7}M), under constant darkness, for 12 and 24 hours. B16 cells were treated with ET-1 (10^{-11}-10^{-7}M), under constant darkness, for 12, 24 and 48 hours. RESULTS: Using quantitative PCR, we demonstrated that rhodopsin mRNA expression can be modulated by endothelins in GEM-81 and B16 cells, and that ET/SF-triggered responses are dose-dependent. ETs/SFs also evoke dose and time-dependent desensitization. Treatment with the PLC inhibitor U73122 ($3x10^{-6}$M) inhibited the raise in rhodopsin mRNA expression evoked by ET-1 in B16 cells ($P<0.001$ vs. ET-1). In GEM-81 cells, treatment with the PLC inhibitor U73122 ($3x10^{-6}$M), the calcium chelator BAPTA-AM (10^{-5}M) or the calmodulin antagonist calmidazolium chloride (R24571, 1μM) was not able to inhibit the raise in rhodopsin mRNA expression evoked by SF S6c in GEM-81 cells. CONCLUSIONS: These results demonstrate that rhodopsin mRNA expression can be modulated by endothelins in GEM-81 and B16 cells and suggest the involvement of the PLC pathway in this modulation by ET-1 in B16 melanocytes. **Supported by**: FAPESP and CNPq grants. GJDL is a fellow of FAPESP (process # 06/53291-9), and TMPC is a fellow of CNPq.

01.024

UMA NOVA TECNOLOGIA PARA A ANÁLISE DE COMPOSTOS MODULADORES DE RECEPTORES ACOPLADOS A PROTEÍNA G: ANTICORPOS CONFORMAÇÃO ESPECÍFICA

de Souza, L. L.[1]; Ferro, E. S.[2]; Devi, L. A.[3]; Heimann, A. S.[1] - [1]Proteimax Biotecnologia Ltda. - P&D; [2]USP - ICB; [3]Mount Sinai School of Medicine - Pharmacology and Biological Chemistry

Introdução: Os receptores acoplados à proteína G (GPCRs) compreendem a maior família de receptores transmembrânicos. Eles são responsáveis pela tradução de sinal de uma grande variedade de estímulos, dentre eles os transmitidos por luz, odor, aminoácidos, peptídeos e derivados de ácidos graxos, e que resultam na regulação de diversas funções celulares. Os GPCRs são interessantes alvos terapêuticos, já que 39 das 100 drogas mais utilizadas na clínica atuam, direta ou indiretamente, através da ativação ou bloqueio de receptores do tipo GPCRs. O desenvolvimento e a produção de anticorpos com reconhecimento diferencial entre as formas ativa e inativa dos GPCRs representam uma nova e poderosa metodologia que pode ser usada para determinar a duração e extensão de estímulos fisiológicos e fisiopatológicos (importante para pesquisa básica e clínica; Gupta A., J Biol Chem. 282(8):5116-24. 2007). Estes anticorpos também podem ser utilizados em ensaios de *screening* rápidos e baratos para a identificação de compostos que são moduladores alostéricos dos GPCRs, possibilitando o desenvolvimento de drogas que ativem ou inibem os GPCRs com maior eficácia que as disponíveis no mercado. **Métodos**: Desenvolvemos e utilizamos anticorpos policlonais de coelhos com capacidade para reconhecer alterações conformacionais no receptor canabinoide CB1 (denominado anti-CB1). Fizemos um ensaio simples e rápido utilizando uma placa de ELISA com 96 well adsorvidas com membranas celulares obtidas de cérebro de ratos (região do estriatum), que foram tratadas com 1μM de cada composto, por 2 horas à temperatura ambiente, e incubadas com o anticorpo anti-CB1 (1:500). O anticorpo secundário anti-IgG de coelhos foi diluído 1:500 em tampão salina-fosfato, pH 7.4, e a revelação feita com substrato para fosfatase alcalina. A porcentagem de modulação do receptor foi calculada em relação ao controle, 100% referente às membranas não tratadas. **Resultados:** De acordo com a extensão do reconhecimento do anticorpo anti-CB1 foi possível identificar compostos agonistas e/ou agonistas inversos deste receptor, com destaque para os seguintes (as respectivas porcentagens de alteração do receptor CB1 aparecem entre parênteses): 1) agonistas: Hu210 (113,98±3,3), PROTX23 (114,6±3,6) e PROTX24 (111,1±1,6; 2) agonistas inversos: SR141716A (93,5±6,1), PROTX1 (90,9±1,8) e PROTX 2 (89,1±1,7). **Discussão:** Neste trabalho desenvolvemos anticorpos anti-CB1 com capacidade de detectar mudanças conformacionais do receptor CB1, após tratamento de membranas de cérebro de ratos com agonistas ou agonistas inversos deste receptor. Utilizando esses anticorpos, estabelecemos um ensaio que possibilitou a identificação rápida de quatro novos compostos moduladores do receptor CB1, um importante alvo terapêutico envolvido em processos fisiopatológicos como, dor, inflamação e obesidade. Estes resultados confirmam a viabilidade do uso de anticorpos conformação específica para análise da modulação alostérica de GPCRs, bem como na identificação de novos fármacos. **Apoio Financeiro:** FAPESP

01.025

EFFECT OF THE OVARIECTOMY ON MUSCARINIC ACETYLCHOLINE RECEPTOR SUBTYPES EXPRESSION IN THE RAT HIPPPOCAPUS

Cardoso, C. C.[1]; Porto, C. S.[2]; Abdalla, F. M. F.[1] - [1]Instituto Butantan - Farmacologia; [2]UNIFESP - EPM - Farmacologia

Introduction: Molecular cloning studies have revealed the existence of five distinct mammalian muscarinic acethylcholine receptor (mAChR) subtypes (M_1-M_5) (Caulfield, Pharmacol. Ther., 58: 318, 1993). mAChR subtypes are differently expressed in the rat hippocampus and often more than one subtype is present in one cell (Levey, Life Sci., 52: 441, 1993). Studies have shown that estrogen affect mAChRs in different rat brain areas (McEwen, Rec. Prog. Horm. Res., 57:357, 2002). The mechanism underlying effect of estrogen on cholinergic function of basal forebrain has not been well elucidated, may be related to changes at the mAChRs levels. In our laboratory, we showed that the ovariectomy for 15 days increased the density of mAChRs in rat hippocampus when compared to those obtained from proestrus rat (control) (Cardoso, et al., Neuroendocrinol., 80:379, 2004). The present study was designed to investigate the effect of ovariectomy on M_1, M_2 and M_3 mAChR subtypes expession in rat hippocampus. **Methods:** Hippocampus were obtained from rats in proestrus (control) (CT) and ovariectomized for 15 days (C15). Hippocampus membrane were incubated with [^{3}H]Quinuclidinyl benzilate ([^{3}H]QNB) (20-100 fmols) in the presence of primary M_1, M_2 and M_3 subtype-specific antibodies (H-120, sc-9106, 1:1000; H-170, SC-9107, 1:1000 and H-210 SC-9108,1:1000, respectively, M_1, M_2 and M_3, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) (total) and IgG (inespecific)(4 hr/4°C). Protein levels of M_1, M_2 and M_3 mAChR subtypes were performed by immunoprecipitation assay as previously described (Shiozaki et al., J. Neurol. Neurosurg Psychiatry, 67: 209, 1999). **Results:** C15 rats increased the binding of [^{3}H]QNB when compared with those obtained from CT animals (respectively, 1056.52±115.58, n=4 and 553.88±16.47 fmol, n=7), indicating an increase of density of mAChRs as previous reported (Cardoso, et al., Neuroendocrinol., 80: 379, 2004). The percentage of immunoprecipitation to M_1, M_2 and M_3 were similar between CT and C15 animals (respectively, 61.18±5.75, n=6 and 62.25±3.22 %, n=4 to M_1, 26.67±3.33, n=3 and 20.83±8.56 %, n=6 to M_2 and 9.50±2.50, n=3 and 5.80±1.74 %, n=3 to M_3). **Conclusion:** The results provide evidence that the ovariectomy did not change the M_1, M_2 and M_3 mAChR subtypes expression in rat hippocampus. **Supported by**: Fapesp and CNPq

01.026

CONTRACTILE EFFECTS OF CLONAZEPAM AND 3-METHYLCLONAZEPAM IN ADULT *Schistosoma mansoni* AND THEIR RELATION WITH BENZODIAZEPINE BINDING SITES

Thibaut, J. P. B.[1]; Monteiro, L. M.[1]; Leite, L. C. C.[1]; Noel, F.[1] - [1]UFRJ - Farmacologia Básica e Clínica - ICB

Introduction: Clonazepam (CLO) and 3-methylclonazepam (MeCLO) induce contraction of adult male *Schistosoma mansoni in vitro* and have proven schistosomicidal activity *in vivo* but their mechanism of action is unknown. As we have recently characterized the presence of two classes of benzodiazepine binding sites in this worm (Noël, Parasitology, no prelo), we decided to investigate if these sites could represent the molecular target for the contractile effect of these two benzodiazepines. Methods: Adult male worms freshly recovered from portal veins of infected mice were placed in a glass chamber containing 250 µl of a buffered saline solution. The contractile effect of the drugs was measured through computerized analysis of the body area after capture of the images with a CCD camera. Alternatively, muscle fibers were freshly dissociated from adult worms by a mechanic and enzymatic process for visual observation of contractions of individual muscle fibers in response to microperfusion with test medium via a micropipette. Results: 10 µM CLO and MeCLO contracted the worms in a time-dependent manner: This pattern was similar to the one observed after addition of 1 µM praziquantel, the first choice drug in the treatment of schistosomiasis. Flunitrazepam, zolpidem, diazepam and DMCM were without effect at 10 µM, althought they have a much higher affinity for the worm benzodiazepine binding sites than CLO and MeCLO. The contractile effect of CLO and MeCLO was not inhibited by pre-treatment with 1 µM flumazenil. On the other hand, 100 µM nicardipine altered the pattern of both MeCLO and praziquantel contraction. As praziquantel, MeCLO was not able to induce contraction of worm isolated muscle fibers whereas microperfusion with 30 mM KCl or 5 mM Caffeine contract 85-95% of them. Discussion: the contractile effect of the two schistosomicidal benzodiazepines CLO and MeCLO is neither due to a direct effect on the muscle nor a result of their binding to one of the two benzodiazepine binding sites present in *S. mansoni.* Furthermore, present data indicate that the contractile effect of these drugs is similar to the one of praziquantel which could be partially explained by a certain degree of superposition of their spatial conformations. **Supported by**: CAPES, FAPERJ, CNPq

01.027

EFEITOS DA SEROTONINA E CICLOSPORINA A NA MUSCULATURA LISA DO CORPO DO *Schistosoma mansoni*

Gonçalves, J. P.[1]; Cunha, V. M. N.[1] - [1]UFRJ - Farmacologia Básica e Clínica - ICB

Introdução: A Ciclosporina A (CsA) é uma lactona macrocíclica com propriedades imunossupressoras e um potente agente esquistossomicida. Em trabalho prévio observamos que CsA aumenta o comprimento do corpo dos vermes de um modo semelhante à nicotina, e não altera os movimentos espontâneos destes vermes. Porém, na presença de serotonina (5-HT) 10 mM, um neurotransmissor excitatório, CsA causa um aumento significativo da motilidade, mas não é capaz de alterar o comprimento do corpo dos vermes adultos machos. O objetivo deste trabalho foi investigar a dependência dos efeitos da CsA pela presença de 5- HT. **Métodos:** Camundongos suíços foram sacrificados 45 dias após infecção e os vermes adultos machos foram coletados da veia porta e lavados. Populações de cinco vermes foram colocadas em poços diferentes de uma placa de cultura de células de plástico para a realização da curva de acumulação de diferentes concentrações de 5-HT (0,01 – 30 μM), usando uma mesma população de vermes para cada concentração deste neurotransmissor. As alterações do comprimento do corpo e da motilidade dos vermes adultos machos observadas na ausência ou presença de CsA 100 μM, ou do seu solvente etanol 2% ao longo do tempo (15 – 105 min) foram realizadas de acordo com Silva & Noel (1995). **Resultados:** Após a adição de uma concentração fixa de 5-HT (10 mM) no meio nutridor não observamos alteração do comprimento do corpo dos vermes em função do tempo (até 105 min), quando comparado com seu controle (H_2O; $P>0,05$; n=8). Entretanto, nas mesmas condições experimentais, houve um aumento significativo da motilidade (grau = 2; $P<0,05$; n=8). A adição de concentrações crescentes de 5-HT no meio nutridor aumentou a motilidade (grau = 2; $P<0,01$; n=8), mas não modificou o comprimento do corpo dos vermes ($P>0,05$; n=8). Na ausência de 5-HT, a CsA 100 mM promoveu ligeiro aumento do comprimento dos vermes em relação ao seu controle (etanol 2%) 15 minutos após a sua adição ao meio nutridor. Porém, a partir de 75 min de incubação observamos encurtamento significativo dos vermes (grau = 2). A adição de concentrações crescentes de 5-HT acelerou o desenvolvimento do encurtamento promovido pela CsA, após 15 min de incubação, ocorrendo contração máxima (grau = 2) dos vermes adultos aos 45 minutos, que foi revertida após a lavagem ($P<0,01$; n=8). **Conclusões:** Nossos dados indicam que o aumento da motilidade promovido pela CsA, em presença de 5-HT, é pelo menos em parte dependente do efeito deste neurotransmissor, já que, 5- HT em diferentes concentrações, é capaz de por si só aumentar a motilidade dos vermes. Ao contrário do observado nos tempos iniciais de incubação, CsA promove encurtamento dos vermes, em tempos prolongados, na ausência de 5-HT. Considerando que diferentes concentrações de 5-HT não promovem alteração do comprimento do corpo dos vermes ao longo do tempo, nossos dados sugerem que o efeito contracturante da CsA é independente de 5-HT. **Apoio financeiro:** CAPES, FAPERJ

01.028

ENDOTHELIUM CONTRIBUTES TO THE VASCULAR RELAXATION INDUCED BY SODIUM NITROPRUSSIDE IN THE ISOLATED RAT AORTA

Bonaventura, D.[1]; Neto, M. A.[2]; Rodrigues, G. J.[3]; Lunardi, C. N.[2]; Bendhack, L. M.[4] - [1]USP - Farmacologia; [2]FCFRP - USP - Física e Química; [3]USP - Física e Química; [4]USP - FCFRP

Introduction: nitric oxide (NO) plays important role in the control of vascular tone. In physiological conditions, NO is mainly produced by the endothelial cells by NO-synthases (NOS). The NO-associated intracellular pathway in smooth muscle cells involves the decrease in Ca^{2+} mobilization. Sodium nitroprusside (SNP) is one of the NO donors most widely studied and it has been employed sporadically as a hypotensive drug for over 50 years. SNP is generally thought to be an endothelium-independent relaxant agent and its vasorelaxant effect has been attributed to its direct action on the vascular smooth muscle. We hypothesize that endothelial cells can contribute to the vasorelaxation induced by SNP. Aim: in this study we aimed to investigate the effects of NOS inhibitors on SNP-induced vasorelaxation, NO release and Ca^{2+} mobilization. Results: vascular reactivity experiments, using standard muscle bath procedures, showed that the endothelium potentiates (pD_2: 8.92±0.05) the relaxation induced by SNP in aortic rings when compared to in denuded aortic rings (pD_2: 8.32±0.07). This effect was abolished by a non-selective NOS inhibitor L-NAME (pD_2: 8.40±0.12). The selective NOS inhibitors for the constitutive isoforms NOS, eNOS and nNOS inhibited the effect of endothelium increasing relaxation induced by SNP (pD_2 L-NNA: 8.37±0.05 and 7-NI: 8.22±0.07, respectively). In addition, using a selective dye for NO (DAF-2/DA), we observed that endogenous NO was involved on the effect of this SNP, since L-NAME reduced the production of NO in approximately 45±3.5%. Moreover, on endothelium-intact aorta in presence of FLUO-3, a selective dye for Ca^{2+}, in absence of L-NAME the reduction in Ca^{2+} concentration in vascular smooth muscle cells was higher (25±1.43%) than in presence of this inhibitor (4.62±0.39%). Conclusion: the present findings indicate that in aortic rings the relaxation and $[Ca^{2+}]c$ decrease induced by SNP involves, partially, endothelial-produced NO by constitutive NO- synthases activation. **Supported by**: FAPESP and CNPq

01.029

AÇÃO DE DERIVADOS AMÍDICOS DA ANANDAMIDA SOBRE RECEPTORES DE CAPSAICINA (TRPV1)

Mesquita, C. M.[1]; Santos, M. L. H.[1]; Lima, L. M.[2]; Barreiro, E. J.[2]; Guimaraes, M. Z. P.[1] - [1]UFRJ - Farmacologia Básica e Clínica - ICB; [2]UFRJ - FM - LASSBio

INTRODUÇÃO: A anandamida é um endocanabinóide que promove analgesia através de sua ação sobre receptores canabinóides CB1. Entretanto, sabe-se que também funciona como um agonista parcial em receptores TRPV1, um canal iônico que pode ser ativado por estímulos nocivos, como temperaturas acima de 43ºC, prótons e capsaicina, a substância pungente das pimentas. O mecanismo de sensibilização do TRPV1 já foi elucidado e envolve sua liberação da inibição por fosfatidil inositol bi-fosfato (PIP_2). É possível que parte da ação analgésica da anandamida ocorra através da ação em TRPV1. O objetivo desse trabalho é testar derivados amídicos da anandamida, desenhados para serem resistentes à degradação pela FAAH, em modelo de expressão heteróloga de TRPV1 e de um mutante que encontra-se permanentemente sensibilizado, ou seja, livre da inibição pelo PIP_2. MÉTODOS: Rãs Xenopus foram anestesiadas para realização de ovariectomia parcial, visando a obtenção de ovócitos. Após tratamento enzimático para desfoliculação das células, eram aplicados cRNAs codificando TRPV1 e TRPV1 777-820. Após 4-7 dias de incubação esses ovócitos eram utilizados em registros eletrofisiológicos para detecção de correntes geradas pelas substâncias (LASSBios 794, 850 e 851) e outras já conhecidas. RESULTADOS E DISCUSSÃO: O perfil de ativação foi diferente para cada LASSBio, embora todos apresentassem atividade. O LASSBio 851 foi capaz de ativar tanto o receptor selvagem quanto o mutante, sendo esse último com maior potência. Em comparação, o LASSBio 850 apenas ativou o mutante, ou cooperativamente o selvagem na presença de prótons (pH 5,5). Entretanto, em baixas concentrações ambos 850 e 851 parecem antagonizar a ativação por prótons no TRPV1 selvagem. O LASSBio 794 apresentou um perfil distinto: ativa diretamente o receptor selvagem e mutante, sendo esse último com maior potência e tem efeito aditivo com prótons em ambos os variantes do TRPV1. Além disso provocou o que parecem ser correntes de cloreto ativadas por cálcio, embora esse fenômeno seja independente de cálcio extracelular. O fato de que alguns LASSBios tiveram ação somente no TRPV1 mutante e/ou conjuntamente com pH ácido sugere uma ação preferencial no tecido inflamado. Esses dados corroboram resultados farmacológicos in vivo que indicaram ações analgésicas dessas substâncias possivelmente via dessensibilização do TRPV1. **Apoio Financeiro:** CNPq, FAPERJ e PEW Latin American Program in Biomedical Sciences

01.030

PRODUÇÃO DE RETROVÍRUS RECOMBINANTES PARA O SILENCIAMENTO DA OLIGOPEPTIDASE EP24.15.

Pignatari, G. C.[1]; Ventura, A. M.[2]; Ferro, E. S.[1]; Beltrao-Braga, P. C. B.[3] - [1]USP - ICB; [2]USP - Microbiologia; [3]UNIFESP - EPM - Virologia

Introdução: A EP24.15 é tradicionalmente classificada como enzima processadora de neuropeptídeos, mas alguns trabalhos têm demonstrado sua participação na regulação do sistema imune através de um possível envolvimento com a apresentação de antígenos via MHC-I. Neste caso, dois tipos de envolvimentos controversos surgiram na literatura, um considerando que a enzima protege os peptídeos da degradação (Silva et al., Biochem Biophys Res Commun.255: 591. 1999) e outro sugerindo que ela degrada esses peptídeos (Kim et al., Biochem J. 375: 111. 2003). Além disso, esses estudos foram realizados de formas diferentes impossibilitando uma comparação entre eles. Portanto, a questão sobre o papel da EP24.15 na apresentação de peptídeos pelo MHC-I merece investigação adicional. O vetor utilizado para o silenciamento da EP24.15 em 80% foi gentilmente cedido pelo Prof. Marc Glucksman. Este vetor foi utilizado para produção dos retrovírus e transdução de células alvos. As células que apresentarem o silenciamento da EP24.15 serão utilizadas para o estudo da participação da EP24.15 na apresentação de antígenos. **Métodos:** As células empacotadoras ectotrópicas PE501 foram transfectadas com o vetor de siRNA gentilmente cedido pelo Prof. Marc Glucksman (Kim et al., Biochem J. 375: 111. 2003). Os retrovírus recombinantes produzidos foram utilizados para transduzir as células empacotadoras PA317 para a produção de vírus anfotrópicos. Após seleção com puromicina, vários clones foram selecionados e aqueles apresentando maior titulação viral e maior inibição da EP24.15 em ensaios de atividade enzimática foram utilizados na transdução das células ATt20. Passado o período de seleção com puromicina, estas células foram submetidas a fracionamento celular e dosagem de EP24.15 em ensaios de atividade enzimática e *western blot*. **Resultados:** A fração citosólica das células AtT20 tranduzidas com siRNA apresentou 76% de diminuição da atividade da EP24.15. A mesma diminuição foi encontrada nas frações de núcleo e membrana. Os experimentos de *western blot* também mostraram uma diminuição semelhante da expressão da enzima. **Discussão:** O silenciamento da EP24.15 encontrado nas células AtT20 corrobora os dados de Kim et al., 2003 e mostra a eficiência desse siRNA e do sistema retroviral utilizado. Após padronizações, estas análises de silenciamento serão realizadas nas outras linhagens celulares de macrófagos e fibroblastos para posterior estudo do papel da EP24.15 na apresentação de antígenos. **Agradecimentos:** Prof. Dr. Marc J Glucksman (*Rosalind Franklin University*), pelos vetores retrovirais contendo o siRNA para a EP24.15. Prof. Dr. Sang Won Han (UNIFESP) e Prof. Dr. Willian Osborne (*Washington University*), pelas PE501 e PA317. **Apoio Financeiro:** FAPESP e CNPq.

01.031

O TRATAMENTO DE CÉLULAS HELA COM ACTINOMICINA-D DESMONTA AS ESTRUTURAS SUBNUCLEARES RICAS EM UBIQUITINA LIGASE FBXO25

Manfiolli, A. O.[1]; Maragno, A. L. G. C.[1]; Baqui, M. M. A.[2]; Yokoo, S.[1]; Sakagute, L. H.[1]; Oliveira, E. B.[3]; Gomes, M. D.[1] - [1]FMRP - USP - Bioquímica e Imunologia; [2]FMRP - USP - Biologia Celular; [3]FMRP - USP - Biochemistry and Immunology

O sistema ubiquitina-proteassomo controla a abundância da maioria das proteínas celulares de eucariotos (~80%). As proteínas destinadas à degradação por este sistema são primeiramente ligadas covalentemente a uma cadeia de ubiquitinas (ub) que marca esta proteína para ser degradada pelo complexo multicatalítico proteassomo 26S. As enzimas críticas para o processo de ubiquitinação são denominadas E3 ub-ligases, uma vez que são as responsáveis pelo reconhecimento do substrato. SCF^{FBXO25} é um complexo com atividade de ub-ligase E3 composto por Skp1, Cul1, Roc1 e a proteína FBXO25. O presente estudo examinou a localização celular e a distribuição tecidual da FBXO25, assim como analisou os efeitos da inibição da transcrição na distribuição celular dessa enzima. Desenvolvemos um anticorpo contra um fragmento N-terminal da proteína FBXO25 recombinante (resíduos 2 a 62), que foi posteriormente purificado por cromatografia de afinidade. Este anticorpo foi capaz de reconhecer a proteína FBXO25 em western-blots preparados com lisados dos principais tecidos de camundongos, exceto em músculo estriado. Experimentos de imunocitoquímica e bioquímica (fracionamento celular) mostraram que a FBXO25 endógena é predominantemente nuclear, com uma distribuição peculiar na forma de “corpos” subnucleares. Verificamos por experimentos de dupla-marcação em microscopia confocal que esses corpos ricos em FBXO25 são diferentes de outros domínios subnucleares conhecidos, incluindo os speckles, corpos de cajal, gems, clastossomos e corpos de PML. Sendo assim nomeamos os corpos de FBXO25 como FANDs, *FBXO25 Associated Nuclear Domains*. Através de incorporação de BrUTP mostramos que os FANDs não são sítios nucleares transcricionalmente ativos. Interessantemente, vimos que os FANDs estão associados ao ciclo celular, umas vez que aparecem no final da telófase, atingem o pico máximo em G1, e desaparecem nas fases S, G2 e M em células HeLa sincronizadas (método do duplo bloqueio com timidina). Essa distribuição se correlaciona com a atividade transcricional do núcleo que é regulada durante o ciclo celular. Sabe-se que o remodelamento dos corpos nucleares e a redistribuição das proteínas nucleoplasmáticas ocorrem em determinadas circunstâncias fisiológicas e em algumas doenças que envolvem um *shut down* transcricional. Tais circunstâncias podem ser mimetizadas pela utilização de drogas que bloqueiam a transcrição, como actinomicina-D (ActD). O tratamento de células HeLa com 0.05 µg/mL de ActD por 2 horas, suficiente para inibir somente a atividade da RNA polimerase I, desmontou completamente os FANDs. Inibição da RNA polimerase II (α-amanitina e DRB) não alterou a localização de FBXO25 no núcleo de células HeLa. Em conjunto os nossos dados demonstram que a presença dos FANDs está relacionada com a atividade transcricional celular dependente da RNA polimerase I. O bloqueio da transcrição de genes para RNA ribossômico provoca a desmontagem dos ribossomos e a liberação de proteínas ribossomais que neste caso parecem estar modulando tanto a localização subnuclear da FBXO25 quanto a interação dessa enzima com os seus alvos de ubiquitinação no núcleo. **Apoio Financeiro:** FAPESP & FAEPA

01.032

CHANGES IN THE NEURONAL NICOTINIC ACETYLCHOLINE RECEPTORS (NACHR) AND POSSIBLE INFLUENCE ON THE COGNITIVE BEHAVIOR IN DYSTROPHIC MICE.

Ghedini, P. C.[1]; Calixto, A. V.[2]; De Lima, T. C. M.[2]; Lapa, A. J.[1]; Souccar, C.[1] - [1]UNIFESP - EPM - Farmacologia; [2]UFSC - Farmacologia

Introduction: Duchenne's muscle dystrophy (DMD) is a recessive and progressive muscle disease caused by mutation of the dystrophin gene and lack of the protein. Dystrophin is expressed in the smooth and striated muscles, and in the brain. Its deficiency in the central nervous system (CNS) has been related to the cognitive deficit observed in most of DMD patients. Considering the relevance of the cholinergic system in cognitive functions, it seems feasible that alterations of NAChR can be related to the cognitive deficiency observed in DMD patients. This study examined the number of NAChR and their involvement in the cognitive changes observed in a murine model of DMD, the dystrophic (*mdx*) mouse. Methods: Male $C_{57}Bl_{10}$ control and *mdx* mice, 4-5 months old (n=10) were used. Specific [^{125}I]a-bungarotoxin and [^{3}H]-cytisine binding, specific ligands for a7 and a4b2 NAChR subtypes respectively, were determined using membrane preparations of mice cortex (CT), hippocampus (HP) and cerebellum (CB). For the cognitive test, the animals were submitted to an elevated T-maze (ETM) avoidance training paradigm and were treated with selective antagonists of NAChR a7 and a4b2, methyllycaconitine (30 mg; i.c.v.), and dihydro-b-eritroidine (5 mg; i.c.v.), respectively. Locomotor activity of all animals was evaluated in open-field (OF) and rota-rod (RR) tests. Results: Maximal toxin binding (10 nM, 120 min, 25^{0}C) in CT and CB did not differ among control (38.1±2.3 and 25.6±4.0 fmol/mg protein, respectively) and *mdx* mice, but in hippocampus it was 53% lower in control (54.2±3.9 fmol/mg protein) than in *mdx* mice. Maximal [^{3}H]-cytisine binding (10 nM, 75 min, 4^{0}C) did not differ among *mdx* and control (CT: 74.7±5.1, HP: 60.8±6.4, and CB: 29.3±5.3 fmol/mg protein) mice. Treatment with methyllycaconitine did not significantly change the avoidance 1, 2 or 3 in *mdx* mice when compared to the untreated group in a same strain. Control mice, however, presented a significant decrease in all avoidance tasks when compared to their respective untreated group (109.8±33.1, 163.3±16.7, and 54.0±23.5 s, respectively). Similarly, treatment with dihydro-b-eritroidine did not significantly alter the avoidances in *mdx* mice, but presented a significant reduction of avoidance 3 (9.43±1.3 s) in control mice when compared to the respective non-treated group (54.0±23.5 s). In the OF test, *mdx* mice presented a significant reduction in crossings (52.3±6.4) and rearings (13.7±2.0) when compared to the control animals (80.3±4.3, and 20.5±1.7, respectively). In the RR test, when compared to control mice, the latency to the first fall (40.9±4.6 s) and the time spent (56.5±0.7 s) in the rotatory bar were reduced, and the number of falls (1.2±0.3) was increased in *mdx.* Discussion: The increase of the a7 NAChR subtype in the hippocampus suggests alterations in the CNS cholinergic neurotransmission in *mdx* mice, probably secondary to dystrophin absence since the effect was not detected in CT and CB. The memory and learning were not affected by nicotinic antagonists in *mdx* mice. However, it is plausible that the motor impairment observed had interfered with the cognitive evaluation in the used test. **Supported by**: FAPESP, CNPq, CAPES

01.033

EFFECT OF ATL-1, A 15 EPI-LIPOXIN ANALOG, ON HUMAN MELANOMA CELLS

Zamith-Miranda, D.[1]; Villela, C. G.[1]; Fierro, I. M.[2] - [1]UERJ - Farmacologia e Psicobiologia; [2]UERJ - Farmacologia

Introduction: Lipoxins (LX) are eicosanoids generated from the arachidonic acid metabolism through lipoxigenases action. Their biological effects are related with the resolution of inflammation, including inhibition of neutrophil chemotaxis, and the stimulation of apoptotic neutrophil phagocytosis by macrophages. We have previously described that LX inhibit the activation of endothelial cells induced by vascular endothelial growth factor (VEGF), a crucial step for tumor growth. In this work we investigated a direct action of LX on human melanoma cells. **Material and Methods:** The human melanoma cell line MV3 was cultured using DMEM 10% FBS, and the experiments were performed using 1% FBS. We used Reverse Transcriptase (RT)-PCR analysis and specific primers to verify the presence of the LX receptor on the cells. The cellular viability was assessed using the MTT assay. After 48h of treatment with ATL-1 (1–1000 nM), the cells were incubated with MTT for 4h. Cell proliferation was measured using thymidine (H^3) incorporation assay. Thymidine (1µCi/mL) was added after 24h of incubation of the cells with ATL-1 (1-1000 nM). Expression and activity of metalloproteinase-2 (MMP-2) were analyzed by western blot and zymography respectively after the treatment with ATL-1 for 24h. **Results:** We characterized for the first time the presence of the LX receptor (ALX) on control and IL-1b- (10ng/mL) treated cells. Treatment with the LX analog did not significantly alter neither the viability nor the proliferation of the cells at any concentration used. Both basal activity and expression of MMP-2 were unchanged after the use of ATL-1, even at high concentrations. **Conclusion:** The primary steps of tumor cell development, including cell growth and MMP activity appear not to be modulated by lipoxins, although the presence of the LX receptor on the cell surface and its biological significance require further investigation. **Supported by**: CNPq, FAPERJ, CAPES, UERJ/SR-2

01.034

REDUCED EXPRESSION OF IL-3 MEDIATES INTESTINAL MAST CELL DEPLETION IN DIABETIC RATS: ROLE OF GLUCOCORTICOIDS.

Carvalho, V.[1]; Barreto, E.[2]; Farias-Filho, F. A.[1]; Gomes, L. H. F.[3]; Cordeiro, R. S. B.[1]; Martins, M. A.[1]; Silva, P. M. R. e[1] - [1]FIOCRUZ - IOC - Fisiologia e Farmacodinâmica; [2]UFAL - Genética e Biologia Molecular; [3]FIOCRUZ - IOC - Biologia Molecular e Doenças Infecciosas

Introduction: Rats turned diabetic by treatment with alloxan were shown to be refractory to systemic anaphylaxis, in a clear association with intestinal matocytopenia. Moreover, the systemic hyporeactivity to allergen challenge presented by diabetic rats was close correlated with over-production of endogenous glucocorticoids. In this study, we investigated the putative involvement of endogenous glucocorticoids in the intestinal mast cell alterations under diabetic conditions. **Methods:** Diabetes was induced by means of a single i.v. injection of alloxan (40 mg/kg) into Wistar rats and the analyses made 21 days later. Mast cell evaluation was performed by histological techniques and expression of IL-3 by immunohistochemistry and RT-PCR. We also tested the effect of the steroid receptor antagonist RU 486 (20 mg/kg, p.o.), which orally once a day during 7 consecutive days before antigenic challenge. **Results:** We found that staining of ileum fragments with PAS-alcian blue revealed a significant reduction in mast cell numbers in the ileum from diabetic rats as compared to those from controls. The immunohistochemical analysis showed an intense labeling for IL-3, which was distributed more or less along the smooth muscle layer and from crypts to villus. Diabetic animals exhibited a marked reduction in IL-3 labelling in the ileum tissue. In addition, the administration of steroid antagonist RU 486 (20 mg/kg, p.o.) impaired the drop in intestinal mast cell counts as well as the expression of the normal pattern of IL-3. The expression of mRNA for IL-13 was shown to reduced in diabetic rats and that RU 486 significantly restores basal conditions. **Conclusion:** Our findings show that alloxan-induced diabetes caused a significant reduction of mast cell population and IL-3 in the intestine and that RU486 restores basal levels of both parameters. They also indicate that there is a causative relationship between increased levels of glucocorticoids and down-regulation of mast cell numbers and cytokine expression associated with the diabetic state. **Supported by**: FIOCRUZ and CNPq.

01.035

UNUSUAL INTERACTIONS OF SIBUTRAMINE WITH ALPHA-1 ADRENOCEPTORS

Nojimoto, F. D.[1]; Pupo, A. S.[1] - [1]UNESP - IB - Botucatu - Farmacologia

Introduction: Sibutramine is a serotonin and norepinephrine (NE) uptake inhibitor acurrently used in anti-obesity therapy, since it enhances satiety and thermogenesis. Interestingly, a study investigating the vascular effects of sibutramine showed that this drug was unable to increase the potency of NE at the alpha-1 adrenoceptors (α_1-ARs) of the mesenteric artery *in vitro*, as it would be expected for an uptake inhibitor (Woolard, *JPET*, **308**, 1102, 2004). This suggests that sibutramine has self-canceling actions, in which the increase in the potency of NE resultant from the block of neuronal uptake is canceled by the inhibition of α_1-ARs (Pupo, *BJP*, **127**, 1832, 1999). **Objective:** The present study investigates this hypothesis by determining the effects of sibutramine at the α_1-ARs subtypes of the rat vas deferens (α_{1A}), spleen (α_{1B}) and aorta (α_{1D}). **Methods:** Male Wistar rats (16-20 weeks) were killed by decapitation. The vas deferens (RVD), spleen (RS) and thoracic aorta (RTA) were excised, cleaned and maintained in organ baths with appropriate nutrient solution bubbled with carbogenic mix (95% O_2 5% CO_2) for digital recording of isometric contractions in response to NE in the absence and presence of increasing concentrations of sibutramine (3 to 100 μM) incubated for 45 min. **Results and Discussion:** In the RVD, sibutramine 10 and 30 μM induced a 4.6- and 10-fold leftward shift in the concentration-response curves to NE, respectively, and depressed the maximal contractions by 60 and 78%, respectively ($p<0.05$, $n = 4$). Sibutramine 100 μM completely inhibited the contractions induced by NE ($n = 4$). When the effects of sibutramine 10 and 30 μM were investigated in the presence of cocaine 6 μM, included to block the neuronal uptake, no leftward shift was observed, but there was a 15% and 40% reduction in the maximal contraction induced by NE, respectively ($p<0.05$; $n = 4$). This result indicates that sibutramine blocks neuronal uptake in the RVD and is a non-competitive antagonist of the α_{1A}-AR. In the RS, sibutramine (10 to 100 μM) was unable to affect the contractions induced by NE, suggesting that it is inactive at α_{1B}-ARs ($n = 4$). In RTA, sibutramine 10 and 30 μM induced 5- and 15-fold rightward shifts in the concentration-response curves to NE respectively, behaving as a simple competitive antagonist. However, sibutramine 100 μM depressed the maximal contractions by 32% ($p<0.05$; $n = 4$). Schild plots for sibutramine in the RTA were constructed in despite of the depression of maximal contractions found with sibutramine 100 μM. The pA_2 was 5.5±0.1 and the slope of the regression line was 1.02±0.16 (n=4). These results show that sibutramine up to 30 μM is a competitive antagonist of the α_{1D}-ARs of the RTA. **Conclusion:** Our results show different and complex interactions of sibutramine with each of the α_1-ARs subtypes and these interactions may be relevant for the therapeutic actions of this drug since it occurred in a concentration range similar to that in which it blocks neuronal uptake.

Supported by: FAPESP (06/58828-0 and 02/10315-4)

01.036

ESTUDO DOS EFEITOS DA ANFETAMINA E SEUS DERIVADOS NA MUSCULATURA LISA DE RATOS INFANTIS

Mendes, C. S.[1]; Jurkiewicz, N. H.[1]; Verde, L. F.[1]; Jurkiewicz, A.[1] - [1]UNIFESP - EPM - Farmacologia

Introdução e objetivos Anfetamina (Af), Metanfetamina (Maf) e Anfepramona (Afm) são potentes agentes simpatomimeticos conhecidos predominantemente por suas importantes ações em adrenoceptores centrais. Nosso objetivo consistiu em estudar sua ação sobre adrenoceptores periféricos *in vitro,* em animais que receberam tratamento crônico *in vivo* com esses agentes. Para isso estudamos o efeito contrátil de agonistas simpatomiméticos e serotonina no Ducto Deferente (DD) de Ratos Infantis. Material e Metodos Para cada uma das três drogas foram realizados tratamentos crônico com 2mg/kg/dia por 15 dias (T2), ou 5mg/kg/dia por 7dias (T5). Ao término do tratamento, os animais (em geral, 5 por grupo) eram sacrificados e tinham o DD retirado e montado para medida de contração. Os ductos de animais tratados (T) e controle (C) foram comparados através de curvas concentração-efeito de Bário, Noradrenalina (NA), Dopamina e Fenilefrina e 5HT. Doses únicas do agonista indireto Tiramina foram também usadas para analisar o papel dos estoques de noradrenalina endógena. Os parâmetros farmacológicos utilizados a partir das curvas foram a Afinidade aparente dos Agonistas (pD_2) e o Efeito Máximo (Emax). A significância estatística foi determinada pelo teste t de Student para $p < 0,05$. Resultados Observamos diferenças estatisticamente significativas em todos os dados apresentados abaixo (médias±epm), sendo que as diferenças não significativas não foram mostradas, para simplificar a exibição dos resultados. (a) Tiramina - Comparando o grupo T5 com o controle: Af (C=33,8±3,6 mm; T=20,8±1,6 mm), Maf (C=35±2,4 mm; T=15,4±3,0 mm), Afm (C= 38,4±2,4 mm; T=16,4±4,2 mm). Comparando os grupos T5 e T2 entre si, para Af, Maf e Afm: Af (T2=42,2±3,1 mm; T5=20,8±1,6 mm), Maf (T2=36,4±3,4 mm; T5=15,4±3,0 mm), Afm (T2=34,4±5,9 mm; T5=16,4±4,2 mm). (b) Para o parâmetro pD_2, na comparação entre T2 e T5 com Af: Bário (T2=3,1±0,2 mm; T5=3,8±0,1 mm), NA (T2=6,1±0,1 mm; T5=7,1±0,2 mm), Fenilefrina (T2=6,6±0,3 mm; T5=5,7±0,1 mm). com Maf: 5HT (T2=5,6±0,2 mm; T5=4,6±0,1 mm), NA T2=6,2±0,2 mm; T5=5,2±0,1 mm), Dopamina (T2=4,6±0,1 mm; T5=4,2±0,1 mm). com Afm: 5HT (T2=5,4±0,2 mm; T5=4,3±0,2 mm), NA (T2=6,8±0,3 mm; T5=5,7±0,2 mm), Dopamina (T2=4,6±0,1 mm; T5=4,2±0,1 mm), Fenilefrina (TC2=5,2±0,2 mm; TC5=4,6±0,1 mm). (c) Efeito Máximo - Comparando os grupos T5 e T2 com Af: Bário (T2=76,2±4,7 mm; T5=39,5±5,0 mm), NA (T2=41,1±2,5 mm; T5=28,3±2,3 mm), Fenilefrina (T2=40,9±4,8 mm; T5=26,2±2,0 mm), 5HT (T2=24,8±5,3 mm; T5=13,0±1,0 mm). Com Maf: Bário (T2=69,4±4,9 mm; T5=34,8±2,6 mm), NA (T2=43,4±3,8 mm; T5=22,8±4,0 mm), 5HT (T2=32,6±2,6 mm; T5=14,6±1,8 mm). Com Afm: Bário (T2=66,1±5,4 mm; T5=24,2±3,5 mm), NA (T2=47,7±4,7 mm; T5=22,6±4,1 mm), 5HT (T2=35,9±4,0 mm; T5=16,4±2,2 mm). Discussão e conclusões Pelos dados da Tiramina, podemos concluir que há diminuição nos estoques endógenos de NA nos animais do grupo T5 o que não ocorreu no caso dos animais do grupo T2. Isso pode indicar que o deslocamento de NA das vesículas, provocado pelos derivados da Anfetamina, pode ser corrigido em longo prazo no grupo T2 pela produção endógena de NA numa velocidade suficiente para cobrir a depleção produzida. Em relação ao pD_2 e E_{max}, os dados indicam que pode haver modulação, dependente da dose, dos sistemas de receptores adrenérgicos e serotonérgicos pelos derivados da Anfetamina.

Apoio Financeiro: CNPq

01.037

INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO COM INIBIDORES DA MONOAMINO OXIDASE (MAO) NO SISTEMA NERVOSO PERIFÉRICO DE RATOS

Zanuto, J. G. C.[1]; Verde, L. F.[1]; Reuter, H. R.[1]; Jurkiewicz, N. H.[1]; Jurkiewicz, A.[1] - [1]UNIFESP - EPM - Farmacologia

Introdução: O presente estudo tem por objetivo verificar os possíveis efeitos do tratamento crônico e semi-agudo *in vivo* com inibidores da MAO (pargilina, clorgilina e iproniazida), que atuariam como perturbadores sobre a reatividade farmacológica da musculatura lisa de ratos. Para tal utilizamos o ducto deferente (DD) de rato. Métodos: Estudamos a contração muscular induzida *in vitro* por drogas adrenérgicas (noradrenalina), na presença e na ausência de antagonistas (prazosin, fentolamina, WB4101). Através destas curvas, foram medidos a potencialização (DR) da curva de noradrenalina em relacão a uma curva padrão, após bloqueio de fatores (captação neuronal e extraneuronal e adrenoceptores beta) que poderiam interferir no resultado. Além disso, também analisamos parâmetros de afinidade como pA_2 (para antagonistas) e pD_2 (para agonistas), alem do efeito contratil produzido pelo agonista indireto tiramina. Utilizamos ratos de 90 dias, que foram tratados por via intraperitonial com doses que variam de acordo com o tratamento: (1) Tratamento crônico, com animais tratados por 21 dias com uma dose de 1mg/kg/dia de pargilina (IMAO B) ou clorgilina (IMAO A). (2) Tratamento semi-agudo de animais tratados por três dias com dose de 2mg/kg/dia de pargilina (IMAO B) ou iproniazida (IMAO A). Todos os grupos controle foram tratados com solução salina. Os animais do tratamento 1 foram sacrificados no dia seguinte à interrupção do tratamento e os animais do tratamento 2 foram sacrificados duas horas após a última dose. Resultados: O tratamento crônico (1) não revelou nenhuma diferença estatisticamente significante nos parâmetros pA_2, pD_2, DR para nenhuma das drogas e para o efeito da tiramina entre os grupos controle e tratado. O tratamento semi-agudo (2) com pargilina também não revelou diferenças significantes entre os grupos tratado e controle nos parâmetros pA_2 e DR. Somente a tiramina apresentou diferenças entre os dois grupos (controle: 54,1±3,02 e tratado: 63,83±2,39, $p < 0,05$). Ainda no tratamento semi-agudo (2), com iproniazida, houve diferenças para a contração por tiramina (controle 45,3±3,38 mm, tratado 60,7±2,54mm, $p < 0,05$), e pD_2 de noradrenalina (controle 6,43±0,20, tratado 7,49±0,22, $p< 0,05$). Dentre os antagonistas competitivos (fentolamina, prazosin e WB4101) a fentolamina apresentou diferenças significativas de pA_2 (controle 8,05±0,03, tratado 7,65±0,11, $p< 0,05$) e DR (controle 1,98±0,26, tratado 0,73±0,38, $p<0,05$). O prazosim apresentou diferenças apenas no DR (controle 1,85±0,44, tratado 0,40±0,10, $p< 0,05$). Os dados com WB4101 não apresentaram diferenças significantes. Discussão: Concluímos que o tratamento com IMAO, por diminuir a degradação das catecolaminas, aumenta a quantidade desses neurotransmissores na vesícula pre-sinaptica resultando em uma resposta maior de um agonista indireto. Assim, a tiramina estimularia a liberação de mais noradrenalina, produzindo maior efeito nos animais tratados com IMAO. Da mesma forma, o pD_2 da noradrenalina esta aumentado, devido à menor metabolização da droga. Já em relação à diminuição de pA_2, pretendemos, se possível, usar outras metodologias, como por exemplo “binding” de radioligantes, para detectar possíveis alterações de afinidade do adrenoceptor.

Apoio Financeiro: CNPq

01.038

PHARMACOLOGICAL CHARACTERIZATION OF ENDOTHELIN RECEPTORS, IN THE AORTA OF THE POISONING AND NON-POISONING SNAKES

Frias, F. T.[1]; Mesquita, L. S. M.[1]; Borgheresi, R. A. M. B.[1] - [1]Instituto Butantan - Farmacologia

Introduction. The endothelins (ETs = ET-1, ET-2 e ET-3) are isopeptides with strong vasoconstriction action; occur physiologically in all vertebrate mammals and in some invertebrates, exerting important functions as regulation of vascular tone and growth of the smooth muscle among a wide variety of functions. The sarafotoxins (SRTXs = SRTX-a, SRTX-b, SRTX-c, SRTX-d/e) are isoforms of the endothelins and exert its activity acting in the same receptors of ETs. In mammals, the ETs receptors belong to the family of protein receptors heptatransmembrane connected to proteins G and are classified in type ET_A and type ET_B. The ET_A mediates contraction and is localized in the vascular smooth muscle cells. The receptor ET_B can mediate contraction or relaxant effect, depending on its localization. When located in endothelial cells it is called ET_{B1} and it presents relaxant effect, however, when located in the smooth muscle is called ET_{B2} and mediates contraction effect. In non-mammals, there are few studies about the ETs receptors. Its known that in aorta of the poisoning terrestrial serpent, *Bothrops jararaca* (Bj) the contraction effect is mediated by receptors type ET_A and ET_B, and that the ET_A sequence has high homology with the mammals ET_A (BORGHERESI *et al*., Biol. Med. Exp., 231(6): 729-35, 2006). **Objective.** We aimed to characterize functional relaxants ETs receptors, located in endothelial cells (ET_{B1}), in isolated aorta of Bj. We also aimed to characterize ETs receptors, type ET_A and ET_B in the non- poisoning serpent *Oxyrhopus guibei* (Og). **Methods.** On intact aorta of Bj, pre-contracted, was added the IRL1620 (selective agonist of receptors ET_B), in concentrations 0,01; 0,03 and 0,06µM to verify presence of relaxants receptors. The same assay was repeated in presence of selective antagonists ET_B, BQ788 and IRL1038 and, in the presence of L-NAME (NO sintetase inhibitor) and indometacina (prostaglandins inhibitor). Cumulative concentration response curve (CCCR) was constructed on isolated aorta of Og for ET-1 (non-selective agonist) and SRTX-c (selective ET_B agonist) in absence and presence of BQ788 (selective ET_B antagonist). **Results.** The IRL1620 relaxed pre-contracted aorta of the Bj suggesting the presence of receptors ET_{B1}. The ET-1 contracted Og isolated aorta (**pD_2**= 8.2±0.1; **$E_{máx}$**= 0.57±0.28; **EC_{50}** = 6,57 e-9±2.6 e-9; n=3) and BQ788 was incapable to antagonize this response. The aorta of this non-poisoning snake was not contracted by SRTX-c (CCCR 10^{-10} to 10^{-7} M). These results are indicating of the inexistence of receptors ET_{B2} in the Og aorta. **Discussion.** Our data suggest the presence of functional endothelin relaxant receptors (ET_{B1}) in aorta of the Bj snake, and indicating that in Og the contractile effect is mediated only by ET_A receptors. So, we can speculate that the control of the vasculature tonus in poisoning and non-poisoning snakes, is controlled with different influence of ET receptors. **Supported by**: Fapesp, Fundação Butantan e FUNDAP.

01.039

HIPPOCAMPAL GENE EXPRESSION CHANGES INDUCED BY NEURONAL NITRIC OXIDE SYNTHASE INHIBITION.

Ferreira, F. R.[1]; Joca, S. R. L.[1]; Dinarte, A. R.[2]; Silva Jr., W. A.[3]; Guimarães, F. S.[1] - [1]FMRP - USP - Farmacologia; [2]Fundação Hemocentro - Genética Molecular; [3]FMRP - USP - Genética

The hippocampus is a limbic structure that contains a high density of glucocorticoid receptors. It has been linked to behavioral responses to stress. Systemic or intra-hippocampal administration of 7-nitroindazole (7-NI), a preferential inhibitor of the neuronal nitric oxide (NO) synthase enzyme, decreases immobility time in rodents submitted to the forced swimming test (FST), an animal model predictive of antidepressant activity. Therefore, the aim of this study was to evaluate the effect of chronic treatment with 7-NI on gene expression pattern in the hippocampus of rats submitted to FST using Serial Analyses of Gene Expression (SAGE). Male rats were treated with 7-NI (60mg/kg/daily) or vehicle (DMSO:saline, 1:1) for 14 days. One h after the last injection they were submitted to the FST and two hours later total hippocampal mRNA was extracted for SAGE analyses. 7-NI treatment significantly decreased the immobility time (7-NI: 111.80±60.08, n=5, vehicle: 222.12±17.96s, n=8, $p<0.05$). With 19,072 gene tags expressed in the hippocampus of animals treated with 7-NI and 19,270 gene tags of animals treated with vehicle, both submitted to the FST, there was a three time increase in the expression of 292 (1.53%) genes and a three time decrease of 269 (1.39%) genes in 7-NI treated group. These genes belong to a variety of functional classes, including basic metabolism, transcription regulation, synaptic plasticity and genes of unknown identity of function. Our data confirm that systemic inhibition of NO synthesis induces antidepressant-like effects and indicate that this effect is associated with modulation of gene expression in the hippocampus. **Supported by**: FAPESP, CNPq, FAEPA.

01.040

EFFECT OF MELATONIN ON NITRIC OXIDE PRODUCTION INDUCED BY LIPOPOLYSACCHARIDE (LPS) IN CULTURED ENDOTHELIAL CELLS

Tamura, E. K.[1]; Silva, C. L. M.[2]; Markus, R. P.[1] - [1]IB - USP - Fisiologia; [2]UFRJ - Farmacologia Básica e Clínica - ICB

Introduction: Melatonin, in the nM range, inhibits bradykinin-induced nitric oxide (NO) production in primary culture of rat endothelial cells (Tamura et al., 2006) by reducing the release of calcium from intracellular compartments (Silva et al., 2007). This calcium-dependent effect is mediated by constitutive nitric oxide synthase (NOS). However, after an injury, the transcription of the inducible NOS (iNOS) in endothelial cells leads to the synthesis of high amounts of NO. This production, necessary for the defense response needs to be stopped in order to avoid tissue damage. Here we investigated if melatonin could contribute to the body effort to reduce the high NO production induced by lipopolysaccharide (LPS), a major component of the outer membrane of Gram-negative bacteria. **Methods:** Primary cultures of endothelial cells were obtained from cremaster muscle of rats according to our previous description (Tamura et al., 2006). Endothelial cells were loaded for 50 min with DAF-FM (5 uM) for determination of NO by confocal microscopy. The effect of LPS (1 ug/ml) was determined in the presence or absence of L-NAME (1 uM) pre-incubated for 10 min, or melatonin (1 nM, 1 and 10 uM) pre-incubated for 1 min. Alternatively, luzindol (10 uM) was incubated for 1 hour previously to melatonin. The indicated numbers (n) represent experiments that were performed with 3-6 cultures obtained from different animals. **Results:** The increase of intracellular NO induced by LPS (1 ug/ml), was maximal after 2-h (203.57±19.92% n = 6), and was totally blocked by L-NAME. Melatonin inhibited in a concentration-dependent manner the LPS-induced NO increase. No inhibition was observed with 1 nM (229.12±63.68% n=3), while 1 uM and 10 uM reduced NO production to 27.13% (±22% n= 3) and 2.4% (±11.3% n=3) of basal values, respectively. The nonselective antagonist of MT_1 and MT_2 receptors, luzindol (10 uM) did not prevent the effect of 1 uM melatonin (31.6±32.18% n=3), suggesting no involvement of melatonin G-coupled receptors. **Discussion:** Melatonin, known as the pineal hormone, is also synthesized in high amounts by activated immune competent cells (Pontes et al., 2006), but not by endothelial cells (Silva et al., 2007). In order to characterize the role of the pineal hormone, and the paracrine produced melatonin, it is important to determine the concentration range of action of this indolamine in isolated systems. We already know that concentrations compatible to nocturnal melatonin surge impairs neutrophil migration (Lotufo et al., 2001), as well as the activation of constitutive NOS (Tamura et al., 2006). Here we show that at this concentration range (nM) melatonin did not interfere on the activity of iNOS. Indeed, 1000-10000 fold higher concentrations are needed to block the inducible enzyme. Therefore, the effect of melatonin in protecting tissues against an exacerbate response to an injury is not related to pineal production. **References:** (1) Lotufo, C.M.C. et al., Eur. J. Pharmacol. **430**:351 (2001). (2) Pontes, G.N. et al., J. Pineal Res. **41**:136 (2006). (3) Silva, C.L.M. et al., Brit. J. Pharmacol. **151:** 195 (2007). (4) Tamura, E.K. et al., J. Pineal Res. **41**:267 (2006). **Supported by**: CAPES, CNPq and FAPESP.

01.041

ESTUDO DO EFEITO MIOTÓXICO DO VENENO DE *Agkistrodon contortrix laticinctus* NA PREPARAÇÃO FRÊNICO-DIAFRAGMA DE CAMUNDONGO: INIBIÇÃO PELA SURAMINA

Serafim, A. D.[1]; Arruda, E. Z.[2]; Calil-Elias, S.[3]; Strauch, M. A.[1]; Cons, B. L.[1]; Fernandes, F. F. A.[1]; Melo, P. A.[1] - [1]UFRJ - Farmacologia Básica e Clínica - ICB; [2]ICB - USP - Farmacologia Básica e Clínica; [3]UFF - Faculdade de Farmácia - Farmácia e Adm. Farmacêutica

Introdução: Avaliamos o efeito miotóxico do veneno de *A. c. laticinctus* na preparação frênico-diafragma de camundongos e os efeitos da suramina tanto *in vitro* de forma aguda, e também após exposição crônica *in vivo.* **Métodos:** Camundongos suiços machos (30±5g), em grupos (n= 4-8), foram sacrificados sob anestesia com éter etílico, retirados o frênico-diafragma continuamente banhados em solução nutridora apropriada a 34°C. As preparações foram acopladas a um transdutor de tensão e polígrafo GRASS, com estímulos de 4-8 V; 2 ms; 0,5 Hz. Após ajude da tensão muscular, foi registrado a amplitude do abalo e do tétano nos tempos zero (To), 30 (T30) e 60 (T60) min, este procedimento isolado foi denominado procedimento *in vitro*, onde a preparação foi testada com estímulos elétricos supramaximais indiretos (frênico) ou diretos (músculo diafragma). Após 30 min. de estabilização adicionou-se o veneno bruto de *A. c. laticinctus* (12,5 - 50 µg/ml) ou o veneno associado a suramina (1-50 mM). No estudo da miotoxicidade *in vivo* os animais foram anestesiados com éter etílico-pentobarbital laparotomizados e exposta a superfície direita da hemicúpula diafragmatica, onde aplicou-se localmente 10 µl da solução nutridora fisiológica ou a solução com o veneno (1, 3 e 10 µg/ml) ou solução contendo o veneno pré-incubado com suramina (1-5 µM) durante 15 min. A hemicúpula esquerda foi protegida de soluções neste procedimento e foi tomada como controle negativo. Após a cirurgia e aplicação das soluções nos dias 01, 07 e 60 os animais foram sacrificados sob anestesia e a preparação frênico-diafragma isolada para análise funcional como descrito anteriormente. **Resultados**: A adição do veneno inibe de forma tempo e concentração-dependente a amplitude do abalo produzido tanto por estímulos diretos quanto indiretos, ocorrendo 100% de inibição do abalo aos 90 min com 25 µg/ml. A adição da suramina à solução contendo o veneno inibiu este efeito na estimulação da preparação de forma indireta (100%), como na direta (80%) de forma dependente de concentração *in vitro*. O registros de abalos das preparações frênico-diafragma dos animais previamente expostos *in vivo*, ao veneno *A.c. laticinctus* observou-se redução dos abalos também de forma dependente de concentração nos diferentes dias após aplicação do veneno. Em todos os dias os animais expostos às concentrações de 1, 3 e 10 mg/mL apresentaram redução de 50%, 75% e 80%, do abalo, respectivamente, quando comparados com o hemidiafrágma contra-lateral. A suramina associada ao veneno, protegeu do efeito miotóxico *in vivo*. **Conclusões:** Estes dados demonstram inicialmente, o efeito miotóxico do veneno de Acl na preparação frênico-difragma e também confirmam que a suramina protege a função *in vivo* e *in vitro* do efeito depressor deste veneno viperídeo. **Apoio Financeiro:** CNPq; CAPES, FUJB-UFRJ, FAPERJ, PRONEX.

01.042

MODULATION BY MELATONIN OF THE EXPRESSION OF MELANOPSIN (OPN4), *CLOCK* AND *PER* GENES IN *Xenopus laevis* MELANOPHORES

Bluhm, A. P. C.[1]; Obeid, N. N.[1]; Castrucci, A. M. de L.[1]; Visconti, M. A.[1] - [1]IB - USP - Fisiologia

Introduction: Most circadian rhythms are related to a light/dark cycle, and are maintained by a pacemaker or clock. This time-related system seems to rely on very similar physiological processes in most organisms, with positive and negative feedbacks involving mainly the genes *clock, Bmal, per* and *cry*. Cultured embryonic melanophores of the amphibian *Xenopus laevis* respond to light by dispersing their pigment granules via IP_3/DAG signaling pathway. An opsin-like photo-pigment was discovered in these pigment cells, the so-called melanopsin (MOP), which triggers the photo-dispersion. The melanophores of *Xenopus laevis* also hold a position of special importance in the history of research of the pineal gland, since studies with a bovine pineal extract, applied on the frog skin, lead to the discovery of the hormone melatonin. Later, this hormone was isolated from frog skin and the first high-affinity melatonin receptor was isolated from a *Xenopus laevis* dermal melanophores library, triggering an interest of the potencial physiological roles of melatonin. Our aim was to investigate whether melatonin interferes in the pattern of melanopsin (OPN4) and the clock genes, *clock* and *per*, expression in *Xenopus laevis* cultured embryonic melanophores.

Methods: Cultured embryonic melanophores of the amphibian *Xenopus laevis* were submitted to a constant darkness regimen, in all-trans-retinal-supplemented culture medium, during 4 days. Melatonin (10^{-9} M) was added, in the dark, and, after one hour, the cells were washed twice with saline solution, and a fresh medium was added. Total RNA was extracted every 3h, throughout the 5th day, and cDNA was prepared by RT-PCR. Determination of gene expression was performed with PCR and Real-Time PCR with SybrGreen (Biorad).

Results and discussion: Previous results indicate a tendency for a decrease in OPN4 expression at 15ZT in 14L:10D (n=4). *Clock* and *per1* expressions were rhythmic under this photoperiod regimen, the highest *Clock* expression observed between 21/0, and 9/12ZT. On the other hand, *Per1* expression was significantly higher only at 6/9ZT. In constant darkness (n=3), there is a decrease in the expression for these three genes, throughout a 24 hour period. In contrast, after addiction of melatonin, in constant darkness, OPN4 presents an increase of expression at 3, 6, 15 and 21 ZT. These preliminary data suggest that OPN4, present in *Xenopus laevis* melanophores, and which depends on light/dark cycle to be expressed, was modulated by melatonin. These are the first evidences of clock genes expression and their oscillation in a vertebrate pigment cell.

Supported by: FAPESP and CNPq; APCB and NNO are fellows of CNPq

01.043

EFEITO DA FUROSEMIDA NO RELAXAMENTO NEUROGÊNICO NÃO-ADRENÉRGICO-NÃO-COLINÉRGICO (NANC) INDUZIDO PELO ÁCIDO GAMA-AMINO-BUTÍRICO NO DUODENO PROXIMAL DE RATO

Silva, J. D. P.[1]; Fernandes, H. B.[1]; Cavalcanti, P. M. da S.[2] - [1]UFPI - Núcleo de Pesquisas em Plantas Medicinais; [2]UFPI - Bioquímica e Farmacologia

Introdução: O ácido γ-amino-butírico (GABA) é o maior neurotransmissor inibitório do Sistema nervoso Central (SNC) (Bloom e Iversen, Nature 229:628, 1971). Existem evidências que a ativação de receptores $GABA_A$ inibitórios promove despolarização e excitação neuronal em células dendríticas de hipocampo de rato (Staley e cols, Science 269: 977, 1995) e que o co-transportador Na^+-K^+-$2Cl^-$ (NKCC1), sensível à Furosemida, é responsável por este efeito excitatório, ao promover acúmulo de Cl^- no citoplasma neuronal (Dzhala e cols, Nat Med 11:1205, 2005). Na musculatura longitudinal do duodeno de rato o GABA é capaz de ativar nervos inibitórios não-adrenérgicos-não-colinérgicos (NANC), ao se ligar ao subtipo de receptor $GABA_A$, promovendo resposta relaxante de forma similar à estimulação elétrica de campo (EEc) (Maggi e cols, J Auton Pharm 4: 77, 1984). Há evidências que o relaxamento neuronal NANC no duodeno de rato induzido pela EEc a baixas freqüências é revertido pelos inibidores da óxido-nítrico-sintetase (NOS), como a L-NAME; sugerindo que a via L-Arginina-Óxido Nítrico participa da inibição neurogênica da musculatura proximal do duodeno de rato (Martins e cols, Braz J Med Biol Res 26: 1325, 1993) e que o GABA ativa nervos nitrérgicos (Kaputlu e cols, J Auton Pharm 16 (4): 177, 1996) e não-nitrérgicos neste tecido (Correia e cols, J Auton Pharm 19: 233, 1999). No presente estudo tivemos como objetivo determinar como o GABA ativa uma via NANC inibitória na porção proximal de duodeno de rato, analisando a influência da Furosemida (bloqueador seletivo do cotransportador NKCC1) nos relaxamentos induzidos pelo GABA e pelo Óxido Nítrico (NO). **Material e métodos:** Segmentos da porção proximal da musculatura longitudinal do duodeno de rato (1,5-2,0 cm) foram suspensos em cuba para órgão isolado (5ml; 1g de tensão; 32ºC; pH 7,4; sob aeração), para registro da contração isotônica, contendo solução nutritiva de Tyrode livre de cálcio e na presença de Atropina (1μM), Fentolamina (1μM) e Propanolol (1μM). Após 2 horas induziu-se um tônus estável e reprodutível com a adição de $CaCl_2$ (1mM). Obteve-se então respostas para GABA (100 μM) e para NO (10μM) preparado a partir de solução acidificada de Nitrito de Sódio ($NaNO_2$) (pH 2 com HCl) (Cocks e cols, Naunyn-Schim Arch Pharmac 341: 364, 1990), na ausência e na presença de Furosemida (3-30μM). **Resultados:** A adição do GABA (100 μM) e do NO (10 μM) produziram relaxamento na musculatura longitudinal da porção proximal do duodeno de rato. O NO diminuiu o tônus em 12,85±2,97% (n = 4); esse relaxamento não foi afetado pela prévia incubação de Furosemida (3μM) (14,53±4,38, n = 4). O relaxamento induzido pela adição de GABA (100μM) (32,17±4,31%, n = 11) foi reduzido na presença de Furosemida (3-30μM) para 16.830±4.380% (n = 4), 13.470±5.697%* (n = 4), 11.580±5.260%* (n = 5), respectivamente (IC_{50} = 0,36 μM). **Conclusão:** Essas observações sugerem que o cotransportador NKCC1 participa no relaxamento neuronal NANC produzido pelo GABA no duodeno de rato. **Apoio financeiro:** UFPI

01.044

INFLUENCE OF INNERVATION ON MUSCARINIC RECEPTOR AND G PROTEIN EXPRESSION AND COUPLING

Andrade-Lopes, A. L.[1]; Pires-Oliveira, M.[1]; Chiavegatti, T.[1]; Godinho, R. O.[1] - [1]UNIFESP - EPM - Farmacologia

Introduction: Trophic influence of motoneuron on muscle fiber involves release of myotrophic substances, including acetylcholine and other agonists of G protein-coupled receptors (GPCR). Some of them act through activation of adenylyl cyclase and generation of cAMP, indicating a correlation between Gs protein/AC/cAMP signaling pathways and the maintenance of muscle mass. Taking into account that denervation of rat diaphragm (DIAPH) induces the expression of muscarinic acetylcholine receptors (mAChRs), in the present study, we evaluated the ability of these receptors to activate G proteins in innervated and denervated DIAPH and extensor digitorum longus (EDL) muscles. **Methods:** Adult male Wistar rats (n=5) DIAPH and EDL were denervated for 7 (D7) or 15 (D15) days. Binding of 0,1 nM [^{35}S]GTPgS to muscle membranes (100 µg/mL) were performed for 60 minutes, at 37ºC, in the absence or presence of 50 µM GDP. In the absence of the nucleotide, [^{35}S]GTPgS binding sites was taken as the total G protein amount. [^{35}S]GTPgS binding performed in the presence of GDP was used to evaluate 10 µM oxotremorine-M-mediated G protein activation. Nonspecific [^{35}S]GTPγS binding was obtained in the presence of 50 µM unlabelled GTPγS. **Results:** Denervation of DIAPH induced an initial hypertrophy detected on the 7th day (40%) that was followed by a reduction of weight to control values on the 15th day (control = 236,0±28,0 mg). 15-day denervation reduced by 41% the EDL weight (control = 114.6±12.3 mg). Denervation also affected the amount of DIAPH G Protein. Seven-day denervation increased by 42% the number of [^{35}S]GTPgS binding sites to DIAPH membranes as compared to innervated muscle (314±1 fmol/mg protein). This initial increase in [^{35}S]GTPgS binding was attenuated by 38% in D15. Conversely, denervation of EDL for 7 or 15 days did not change [^{35}S]GTPgS binding (control = 115±10 fmol/mg protein). Muscarinic agonist Oxotremorine-M induced a 300% G protein activation in both D7 and D15 DIAPH. Oxotremorine-M doubled the [^{35}S]GTPgS binding to D15 EDL membranes. **Discussion:** Our results show the expression of functional muscarinic receptors in denervated rat EDL and DIAPH muscles. In denervated DIAPH muscle, the amount of G proteins changed in parallel to muscle mass whereas the expression of mAChR was detected in both atrophied and hypertrophied denervated muscles. These data suggest that innervation influences the expression of both mAChRs and G proteins. The appearance of mAChRs at either atrophied or hypertrophied denervated muscle suggests that it is caused by the withdrawal of a specific trophic factor that is not related to regulation of general metabolic balance. **Supported by**: FAPESP, CNPq

01.045

EXPRESSION OF GLUCOCORTICOID RECEPTORS IN THE RAT EPIDIDYMIS: IMPACT OF ENDOGENOUS AND SYNTHETIC GLUCOCORTICOIDS AND CO-LOCALIZATION WITH MICROTUBULE ASSOCIATED PROTEIN 1B

Silva, E. J. R.[1]; Queiroz, D. B. C.[1]; Honda, L.[1]; Avellar, M. C. W.[1] - [1]UNIFESP - EPM - Farmacologia

Introduction: Glucocorticoids (GCs) are stress-induced steroid hormones that regulate several physiological functions in vertebrates such as reproduction. Clinically, natural and synthetic GCs are widely used for treatment of immune and inflammatory diseases. Curiously, the role of GCs in the epididymis, an androgen dependent organ that plays a vital role on sperm maturation, is still poorly understood. Previously, we have demonstrated that adrenalectomy (ADX) changes the dynamic of the expression and cellular distribution of glucocorticoid (GR) and androgen (AR) receptors in the rat epididymis. In the this study, we have evaluated the effect of ADX and dexamethasone (Dex) on the expression of GR and AR in the rat epididymis. The expression of two known glucocorticoid-dependent genes (IκBa and IL-1β) was also analysed. Co-localization of GR with a neuronal cytoskeleton marker (Microtubule-associated protein 1B, MAP 1B) in the rat epididymis was also evaluated. **Methods:** Wistar rats (90 days) were sham-operated (S) or submitted to bilateral ADX (1, 2, 7, 15 days). Rats were also submitted to ADX for 7 days and immediately treated with Dex (Acute - AcDex, 7 mg/kg, i.p., 6 h or Chronic - CrDex, 5 µg/kg, i.p., 7 days). Plasma corticosterone levels were monitored by RIA. Caput (CP) and cauda (CD) epididymis from all groups were used in semi-quantitative RT-PCR assays using GR, AR, IκBa and IL1-b specific primers. Primers against the housekeeping gene GAPDH were used as internal control. Western blot (total protein extracts), immunohistochemistry and immunofluorescence (cryosections, 8mm) assays with samples from S, ADX 7 days, AcDex and CrDex rats were performed with antibodies against GR, AR and MAP 1B (negative controls with specific blocking peptides). Results were analyzed by ANOVA followed by Newman-Keuls test ($p<0.05$). **Results and Discussion:** RIA confirmed the significant reduction on corticosterone plasma levels in all ADX groups. Densitometric data of RT-PCR assays indicated that GR, AR, IκBa and IL1-b mRNA levels were not altered by ADX in CP and CD. However, AcDex and CrDex treatments caused a down-regulation on GR, AR and IL1-b and an up-regulation on IκBa mRNA levels in both CP and CD when compared to S and ADX 7 day groups. Western blot assays showed no difference when GR and AR protein levels from ADX 7 days, AcDex and CrDex groups were compared. On the other hand, immunohistochemical studies revealed that the loss of GR staining in the nuclei of epithelial cells from CP and CD caused by ADX 7 days was reversed in AcDex and CrDex tissues. AR immunostaining pattern was similar among all tested groups. Curiously, GR-positive interstitial fibers were observed mainly in the CD of all tested groups. Co-localization studies revealed that all GR-positive fibers were also immunostained by MAP 1B antibody, confirming the expression of GR on epididymal nerve fibers. In conclusion, our results suggest that endogenous and synthetic GCs can differently regulate GR and AR genes at transcriptional and post-transcriptional levels in the rat epididymis. The presence of GR in nerve fibers also suggests that GCs might have a role in the neuronal modulation of epididymal fuctions. **Supported by**: FAPESP, CAPES, CNPq, Fogarty International Center

01.046

EXPRESSION OF EPIDERMAL GROWTH FACTOR (EGF) AND ITS RECEPTOR (EGFR) ALONG RAT EPIDIDYMIS WITH SEXUAL MATURATION.

Patrao, M. T. C. C.[1]; Silveira-Neto, A. P.[1]; Avellar, M. C. W.[1] - [1]UNIFESP - EPM - Farmacologia

Introduction: Epidermal growth factor (EGF) is a polypeptide found in a variety of mammalian species. The biological actions of EGF include stimulation of cellular proliferation, growth and differentiation of mammalian organs. EGF also plays a role in the androgen-dependent male sexual differentiation and proliferation, suggesting that the stimulatory pathways activated by this growth factor and androgens are closely related. In fact, there is evidence that steroid hormones may control cell proliferation by modulating the affinity or expression levels of growth factor receptors in the developing rat male reproductive tract. However, the presence, function and androgen regulation of EGF and its receptor (EGFR) in the rat epididymis have not been determined. Thus, the aim of the present work was to characterize the expression of EGF and EGFR (mRNA and protein) along epididymis of rats in different stages of sexual maturation. **Methods:** Epididymis from adult (120 days) Wistar rats were used for RT-PCR studies, while tissues from immature (40 days), young adult (60 days) and adult rats were used for immunohistochemistry. Ages were based on differences of plasma testosterone levels (Queiróz et al., Biol. Reprod., 66:508, 2002). For RT-PCR, epididymis (n=2) were dissected and divided into caput (CP), corpus (CO) and cauda (CD). Total RNA (5 µg) was extracted and used with specific primers against rat *Egf* and *Egfr* transcripts, as well as the housekeeping gene *Gapdh* (used as internal control). For protein assays, longitudinal paraffin sections (6 µm) of the entire epididymis (n=3 from each age) were used in immunohistochemistry with the following antibodies: (1) *anti-EGF*, against the precursor and mature forms of rat EGF; (2) *anti-EGFR,* against rat EGFR and (3) *anti-pEGFR*, against the active conformation of rat EGFR (pEGFR, phosphorylated receptor). **Results:** Specific PCR products for *Egf* and *Egfr* were detected in CP, CO and CD epididymis from adult rats. Densitometric analysis of PCR products indicated *Egf* mRNA levels approximately 2 fold lower in CP when compared to CO and CD, as well as similar *Egfr* mRNA levels in all segments. Immunohistochemistry confirmed EGF and EGFR expression along rat epididymis. In adult rats, specific immunostaining for both proteins was differentially detected in epithelial cells (cytoplasm, apical membrane and nuclei) and interstitial cells, depending on the epididymal region analyzed. When compared to EGFR, immunostaining of pEGFR was predominantly detected in epithelial cells. Qualitative differences in the distribution of EGF, EGFR and pEGFR immunostainings along the epididymis from 40- and 60-day old rats was also observed when compared to adult tissues. All immunostainings were significantly decreased when experiments were performed with primary antibody preadsorbed with blocking peptide. **Discussion:** The results indicate that EGF and EGFR are expressed along epididymis of rats in different stages of sexual maturation. The immunodetection of pEGFR also reveals basal levels of activated EGFR in epididymal cells from developing rats, suggesting a role for EGF in the regulation and maintenance of epididymal function. Further Western blot assays will be performed to analyze changes in EGF, EGFR and pEGFR protein levels along rat epididymis with sexual maturation. **Supported by**: CNPq, FAPESP, CAPES, Fogarty International Center

01.047

NEW INSIGHTS ABOUT THE EXPRESSION AND REGULATION OF THE SPERM ASSOCIATED ANTIGEN 11 C ISOFORM (SPAG11C) IN ADULT RAT EPIDIDYMIS.

Queiroz, D. B. C.[1]; Silva, E. J. R.[1]; Honda, L.[1]; Avellar, M. C. W.[1] - [1]UNIFESP - EPM - Farmacologia

Introduction: The epididymis promotes maturation, storage and transport of the sperm from testis to the vas deferens. The Sperm Associated Antigen 11 (SPAG11) protein family was recently found to play an important role in epididymal innate immunity in addition to its role in sperm maturation. One of isoforms of this protein family, SPAG11C, is highly secreted by epididymal epithelial cells in human and other species and acts as a potent antibacterial agent *in vitro*. In order to gain insights about the regulation of this protein, in the present study the expression of SPAG11C (mRNA and protein) was studied in the epididymis from rats surgically castrated or challenged *in vivo* with an infectious agent (lipopolysaccharide, LPS). **Methods:** 90-day old Wistar rats were sham operated (control) or surgically castrated for 7 or 15 days. In another set of experiments, rats were injected with LPS from *E. coli* (1 mg/kg, i.v.) or sterile saline (control) and sacrificed after 2 h or 24 h. For RT-PCR studies epididymis was removed, divided into caput (CP) and cauda (CD) regions and frozen. Total RNA was extracted and used in RT-PCR with specific primers against *Spag11c* transcritps and housekeeping gene *Gapdh* (used as internal control). Immunohistochemistry was performed in cryostat sections from CP and CA epididymis (8 mm), using an antibody against rat SPAG11C. Co-localization of SPAG11C with the neuronal cytoskeleton marker microtubule-associated protein 1B (MAP 1B) was also performed by immunofluorescence studies with specific antibodies. **Results and Discussion:** RT-PCR revealed specific *Spag11c* DNA products in CP and CD. LPS treatment (2 h and 24 h) did not change *Spag11c* mRNA levels in both CP and CD when compared to control group (n=2). Surgical castration for 7 and 15 days induced a significant decrease in *Spag11c* mRNA levels in CD, but not in CP where the levels were similar to control tissues (n=4). In control tissues, immunohistochemistry (n=3) indicated SPAG11C immunostaining in the nuclear and cytoplasmic compartments of epithelial cells from both CP and CD regions. The results also indicated immunostaining in smooth muscle cells from the epididymal tubules and blood vessels, as well as in few interstitial nerve fibers in both epididymal regions. These SPAG11C-positive fibers were also co-localized with MAP 1B-positive fibers. LPS treatment for 2 h (n=3) decreased the staining in the nuclei of epithelial cells in CP, an effect reverted after 24 h of treatment to the immunostaining pattern observed in control tissue. In CD, 2 h LPS significantly decreased the staining detected in smooth muscle cells, an effect still observed after 24 h of treatment. While surgical castration for 7 and 15 days (n=3) induced a significant decrease in the smooth muscle staining in both CP and CD, the staining in the nuclei of epithelial cells was only decreased in CD 15 days postcastration. All immunostainings were significantly decreased when experiments were performed with the antibody previously incubated with specific blocking peptide. The results reveal a segment-specific transcriptional and post-transcriptional regulation of SPAG11C expression in the rat epididymis by androgen and LPS treatment. We also show evidence that the expression of this protein is not restricted to epididymal epithelial cells, suggesting additional functions besides antibacterial activity. **Supported by**: CAPES, Fapesp, CNPq, TW Fogarty International.

01.048

TEMPORAL MRNA EXPRESSION OF *OPN4X, OPN4M, CLOCK, N-ACETYLTRANSFERASE* AND *Tyrosine hydroxilase* GENES IN CHICKEN EMBRYONIC RETINAL CELLS

Lima, L. H. R. G.[1]; Santos, I. S.[1]; Visconti, M. A.[2]; Castrucci, A. M. de L.[2] - [1]IB - USP - Fisiologia; [2]USP - IB

INTRODUCTION: The avian circadian system is composed by the retina, the mammalian homolog region of the supra-chiasmatic nucleus (SNC) and the pineal gland. The retina itself shows many rhythmic physiological events, such as movements of photoreceptor cells, opsin expression, retinaldehyde re-isomerization, melatonin and dopamine production and release among others. Altogether these rhythmic events are coordinated to predict environmental changes in light conditions during the day, optimizing retina function. In this work we investigated the expression of the two melanopsin genes, as well as the Clock, N-Acetyltransferase and Tyrosine Hidroxylase genes in chick embryo retinal cells in constant dark. These genes represent key components of a circadian system regarding photoreception, an oscillator and neurochemical outputs. Herein we also demonstrate the presence of the protein Opn4x in the cultured cells by immunocytochemistry analysis. MATERIAL AND METHODS: Primary cultures of chicken retina from 8-day-old embryos were prepared at ZT0 according to De Mello. Proc. Natl. Acad. Sci. 79 (18): 5708-5712. 1982., and seeded at 10^7 density cells in a $25cm^2$ culture flask. The cells were kept in a humidified incubator in a 5% CO_2 atmosphere at 40^oC in constant dark for 6 days. The medium was exchanged every 72 hours at ZT0. Total RNA extraction was performed along 24 hours every three hours starting at ZT0 of the sixth day. The samples were submitted to RT-PCR followed by quantitative PCR for mRNA quantification. To analyze the Opn4x expression in these cells we performed an imunocitochemistry analysis with antibodies anti-chicken melanopsin (immunopurified, Bethyl Laboratories, USA) developed in rabbit and conjugated with the antigenic keyhole limpet hemocyanin. At ZT0 of the sixth day in culture the cells were fixed in 4% paraformaldehyde (Electron Microscopy Sciences, USA) in PBS at 4°C for 1h and the slides were incubated with the primary antibody anti-*G. gallus* melanopsin 1:4000 for 1h at room temperature. After several washes and secondary antibody incubation (1:500, Cy3-conjugated donkey anti-rabbit, Jackson ImmunoResearch, USA), the images were digitalized in a Zeiss fluorescence microscope. RESULTS: The mRNA quantification showed no rhythm of transcription for the Opn4x, Opn4m or Tyrosine Hidroxylase genes in constant dark. However Clock and N-Acetyltransferase mRNA presented higher levels during the subjective day. By immunocytochemistry, the presence of immunopositive cells for *G. gallus* Opn4x antibody in the culture was demonstrated. DISCUSSION: The present data show no robust rhythms of mRNA transcription in chicken embryonic retinal cells under constant dark. However the mRNA transcripts of Clock and NAT genes indicate circadian variations. Studies of mRNA transcription patterns in cells exposed to 12L:12D or glutamate are in progress to test their ability to entrain endogenous rhythms. The confirmed melanopsin expression in these cells suggests the ability of light entrainment. We are thankful to Dr. Arjun Natesan (NIH, Bethesda, USA) for the gift of anti-chicken melanopsin antibodies **Supported by**: FAPESP and CNPq

01.049

EXPRESSION OF ADENYLYL CYCLASE 2 AND 9 IN RAT FAST-TWITCH AND MIXED-FIBER SKELETAL MUSCLE: EFFECT OF DENERVATION

Chiavegatti, T.[1]; Andrade-Lopes, A. L.[1]; Rodrigues, F. S. M.[1]; Avellar, M. C. W.[1]; Godinho, R. O.[1] - [1]UNIFESP - EPM - Farmacologia

Introduction: cAMP signaling cascade modulates several physiological processes of skeletal muscle and neuromuscular synapse, such as muscle metabolism, contraction, neurotransmitter release, and expression of key synaptic proteins like nicotinic acetylcholine receptors and acetylcholinesterase. Signaling initiated by agonists of receptors coupled to stimulatory G protein could involve activation of distinct isoforms of adenylyl cyclase (AC). Until now, ten different AC isoforms with distinct regulatory profiles and enzymatic properties have been described: nine membrane-bound (AC1-AC9) and one soluble (sAC). It is well known that activation of AC potentiates skeletal muscle contraction. However, we have previously shown that continuous stimulation of AC for 24h causes downregulation of the enzyme (Chiavegatti, SBFTE p. 69, 2003). Considering that disuse induced by denervation of the mice slow-twitch muscle gastrocnemius reduces AC2 and AC9 mRNA levels (Suzuki, Am J Physiol 274:C1674, 1998), this work intended to determine the profile of rat AC mRNA expression and to analyze the trophic influence of innervation on AC2 and AC9 gene transcription in the fast-twitch extensor digitorum longus (EDL) and mixed fiber type diaphragm (DIAPH) muscles. **Methods:** 3-month-old male Wistar rats were anesthetized and the anterior tibial or phrenic nerves were sectioned. After 15 days, RNA was extracted from control and denervated EDL and DIAPH (n=3) using TRIzol and screened by RT-PCR with primers designed to amplify nucleotide sequences of the different genes coding for AC2, AC3, AC4, AC5, AC6, AC8 and AC9. The size of the DNA products was compared with the expected PCR product size for each set of primers. **Results:** Denervation for 15 days reduced by 40% EDL muscle mass, compared to control (114.6±12.3 mg) but did not modify DIAPH weight (control = 235.1±27.4 mg). Transcripts for AC3, AC4, AC5, AC6 and AC9 isoforms were detected in both EDL and DIAPH from control rats. AC2 mRNA level, however, was 7-fold higher in DIAPH than in EDL. AC9 transcripts were found with similar abundance in both muscles. Denervation did not change AC2 or AC9 mRNA levels either in atrophied EDL or normal-weighted DIAPH. **Conclusions:** Our results confirm previous findings showing the expression of AC2, AC6, AC8 and AC9 transcripts in rat skeletal muscle. Besides, we demonstrate here the additional presence of isoforms AC3, AC4 and AC5 that had not been previously reported in rodents. While AC9 transcript level is similar in DIAPH and EDL, AC2 mRNA is markedly higher in DIAPH, suggesting a muscle-specific regulation of cAMP production. Although 15 day denervation induced atrophy of EDL muscle, muscle mass remained unchanged in denervated DIAPH. Furthermore, in contrast to what is described in mice, AC2 and AC9 expression at rat skeletal muscle does not correlate to muscle atrophy. **Supported by**: CNPq, FAPESP

01.050

CHARACTERIZATION OF INTERACTIONS BETWEEN NA,K-ATPASE INHIBITORS: SYNERGYSM, ANTAGONISM OR ADDITIVITY?

Poças, E. S.[1]; Touza, N.[2]; Noel, F.[2] - [1]CEFETEQ Nilópolis / UFRJ - Farmacologia Básica e Clínica; [2]UFRJ - Farmacologia Básica e Clínica - ICB

Introduction: The combination of drugs is very common in therapeutics, in particular for the treatment of infectious diseases, cancer and heart failure. The most classical approach to measure how a drug can interfere with the effect of a second drug is the isobolographic analysis, a graphical method introduced by Loewe in 1928. However, few works deal with drugs acting at the same molecular target. The aim of the present work was to characterize the interaction between two cardiac glycosides with very similar structure (ouabain and ouabagenin) and to compare it with the interaction between ouabain and a new synthetic coumestan (LQB96), previously shown to inhibit the Na,K-ATPase through a different mechanism of action. We also intended to perform a quantitative analysis of these interactions through two different experimental approaches and analyses. Methods: Inhibition of the enzymatic activity was measured using the Fiske and Subbarow method using rat kidney fractions enriched in Na,K-ATPase. Inhibition curves were constructed by increasing concentrations of the drugs alone or in a fixed combination (1:4) of either ouabain:ouabagenin or LQB93:ouabain, corresponding to the ratio of their IC_{50}. Non-linear regression analysis (Graph Pad Prism) using the "sigmoidal dose-response" equation was used for determination of the IC_{50}. Statistical comparison between the theoretical curve ("composite additive") and the experimental curve ("mixture") was based on the covariance approach. For the isobolographic analysis the inhibition level of 50% was selected, and the confidence limits of IC_{50} for theoretical and experimental combinations were calculated and compared. Results: The IC_{50} for the experimental curve of ouabain:ouabagenin mixture (240 mM) was not significantly different from the calculated theoretical curve (254 mM) demonstrating that these cardiac glycosides act additively, as expected. The same conclusion was obtained from the isobologram where the empirical mixture point was not statistically different from the theoretical additive point. When the combination LQB96:ouabain was tested, the experimental IC_{50} value (10.6 mM) was significantly smaller than the theoretical one calculated for a simple additive effect (27.3 mM) ($p< 0.05$), indicating synergism (combination index = 0.325). This result was confirmed by the isobolographic analysis, where the experimental point was significantly below the additive line ($p< 0.05$). Discussion: We concluded that LQB93 and ouabain interact synergistically for Na,K-ATPase inhibition further supporting our hypothesis of a different molecular mechanism of action. **Supported by**: CAPES, FAPERJ, CNPq

01.051

ASPIRIN-TRIGGERED LXA_4: A HIGHLY POTENT INHIBITOR OF VEGF-INDUCED MULTIPLE STEPS OF ANGIOGENESIS

Cezar-de-Mello, P. F. T.[1]; Vieira, A. M.[2]; Fierro, I. M.[3] - [1]UERJ - Farmacologia e Psicobiologia; [2]UERJ - DFP; [3]UERJ - Farmacologia

Introduction: The formation of new capillaries from pre-existing ones occurs through dynamic functions of endothelial cells (EC), including migration and proliferation. Vascular endothelial growth factor (VEGF) is considered the most important protein that positively regulates this process. We have previously demonstrated that ATL-1 (15-epi-16-(*para*-fluoro)-phenoxy-lipoxin A_4), an aspirin-triggered lipoxin A_4 synthetic analog, inhibits VEGF-induced EC migration and proliferation. In the present work, we investigated the effects of ATL-1 in several VEGF-stimulated actions. **Methods**: Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) were cultured using M199 medium supplemented with FBS. The cells were treated with ATL-1 (100nM) for 30 minutes before further stimulation with VEGF (10ng/ml). Cell proliferation was measured using thymidine (H^3) incorporation assay. Adherent cells were determined by fluorescence intensity using a Multilabel counter. Expression and activity of metalloproteinases (MMP) were analyzed by western blot and zymography respectively. **Results**: ATL-1 inhibited EC adhesion to fibronectin via interaction with its specific receptor, ALX. Furthermore, VEGF-induced matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) activity and expression were reduced by the previous treatment with the analog. Because the transcription factor NFkB has been implicated in VEGF-mediated MMP expression and EC proliferation, we postulated that ATL-1 might be modulating the NFkB pathway and, indeed, ATL-1 inhibited NFkB nuclear translocation. Pretreatment of EC with ATL-1 strongly decreased VEGF-dependent phosphorylation of PI3-K and ERK-2, signaling routes involved in EC proliferation. The ability of ATL-1 to impair VEGF-induced EC proliferation was antagonized by sodium orthovanadate, suggesting that the inhibitory activity of the analog is mediated by a protein-tyrosine phosphatase. This result was confirmed by showing that ATL-1 inhibition of VEGF receptor-2 (VEGFR-2) phosphorylation was correlated with SHP-1 association with VEGFR-2. **Conclusion**: Taken together, these findings indicate that this 15-epi-lipoxin analog is a highly potent anti-angiogenic molecule that exerts its effects on multiple steps of the VEGF-driven angiogenic process. **Supported by**: CNPq, FAPERJ, CAPES, UERJ/SR-2

01.052

ATL-1, A SYNTHETIC ANALOG OF 15-EPI-LIPOXIN A_4, INDUCES ALVEOLAR MACROPHAGE PHAGOCYTOSIS IN A PI3-KINASE-DEPENDENT MANNER

Simões, R. L.[1]; Da-Fe, A. R.[1]; Canetti, C.[2]; Fierro, I. M.[1] - [1]UERJ - Farmacologia e Psicobiologia; [2]UFRJ - IBCCF

Introduction: Mononuclear cells play a central role in the initiation, development and outcome of the immune response. In the lung periphery, the alveolar macrophage (AM) is the resident defender of mucosal sterility, patrolling the alveolar epithelial surface and clearing organisms by phagocytosis and intracellular killing. The antimicrobial activities of this sentinel of innate immunity are regulated by a number of factors including cytokines, chemokines and lipids. Lipoxins are generated during cell-cell interactions under a variety of conditions, such as infection and inflammation. LXA_4 was recovered in the bronchoalveolar and nasal lavage fluids of patients with various respiratory diseases and might be a potential mediator or modulator of inflammation in the lung. In the present study, we sought to assess the effect of ATL-1, a synthetic analog of 15-epi-lipoxin A_4, on FcR-mediated AM phagocytosis of IgG-opsonized erythrocytes, as well the signaling pathways involved in this process. Methods: Rat resident alveolar macrophages were obtained by lung lavage and cultured overnight in a 96-wells plate before stimulation. Sheep red blood cells were opsonized with a subagglutinating concentration of anti-sheep erythrocyte IgG antibody. Phagocytosis was determined by a microcolorimetric assay. AM were stimulated with different concentrations of ATL-1 (1-100 nM) for 15 minutes at 37º C. In some experiments, the cells were treated with wortmanin (100 nM), a PI3-kinase inhibitor, to evaluate the signaling pathways involved in this process. A western blot assay was used to investigate Akt and ERK-2 phosphorylation. Results: ATL-1 concentration-dependently induced FcR-mediated AM phagocytosis. The PI3-kinase/Akt is a well-known pathway involved in AM phagocytosis. The pre-treatment of the AM with wortmanin for 10 minutes significantly reduced the ATL-1-induced phagocytosis. However, phosphorylation of Akt, a downstream protein in the PI3-K pathway, was not observed. In addition, ATL-1 stimulated significant ERK-2 phosphorylation in these cells, which was obvious within 10 and 100 nM, indicating the involvement of the ERK-2 pathway in the analog effect. Conclusions: These data suggest that ATL-1 rapidly promotes AM phagocytosis *in vitro* and support a role for LX as potential mediators of inflammation and infectious processes in the lung. **Supported by**: FAPERJ, CNPq, SR-2/UERJ.

01.053

FOSFOETANOLAMINA: FOSFOLIPIDEO SINTETICO INDUZ INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO DO MELANOMA B16F10

Kleber, F. A.[2]; Meneguelo, R.[1]; Chierice, G.[1]; Pieri, R. G. N.[3]; Azevedo, R. A.[3]; Maria, D. A.[3] - [1]USP - São Carlos - Bioengenharia; [2]Instituto Butantan / USP - São Carlos - Bioquímica e Biofísica / Bioengenharia; [3]Instituto Butantan - Bioquímica e Biofísica

Introdução: A fosfoetanolamina sintética é uma molécula lipofílica fosforilada artificialmente, obtida através do processo de latenciação molecular pelo grupo do Prof. Gilberto Chierice do Departamento de Química Analítica da USP São Carlos, diferindo das moléculas atuais, pelo seu nível de absorção de aproximadamente 90%, com propriedades antiinflamatórias e pró apoptóticas. **Objetivo:** Avaliar os efeitos antitumorais *in vitro* e *in vivo* da fosfoetanolamina sintética em linhagens de células tumorais e em animais portadores do melanoma B16F10. **Metodologia:** Foram utilizados grupos de 40 camundongos Balb-c, fêmeas, pesando em média de 20g, mantidos no biotério da Divisão de Desenvolvimento Científico do Instituto Butantan, SP. A atividade citotóxica do composto foi testada em diversas concentrações, em linhagens tumorais pelo método colorimétrico MTT, e em linfócitos T normais, pela determinação da capacidade proliferativa, quando estimulados por mitógenos. Nos experimentos *in vivo,* camundongos portadores de tumores dorsais melanoma B16F10 foram tratados após o 14º dia de implante com 1,6; 3,3; 6,6 e 9,9 ug de fosfoetanolamina sintética pela via intraperitoneal e o grupo controle recebeu solução salina, pela mesma via administração. Os animais foram tratados diariamente por 14 dias, e avaliados os seguintes parâmetros: carga tumoral ("*burden*"), volume tumoral, área e número de metástases em órgãos internos. As análises histológicas foram realizadas após a necropsia e coradas pelos seguintes métodos histoquímicos: Verloff, para a avaliação da neovascularização, Picrosirius-Sirus Red, para a determinação da síntese de colágeno tipo I e conteúdo fibrilar do estroma. **Resultados:** Nossos resultados mostraram que o composto sintetizado é citotóxico para as células tumorais, com concentração inibitória 50% de 1,69ug/mL, sem efeitos tóxicos em células normais. Observamos uma significativa redução na carga tumoral dos animais tratados com a fosfoetanolamina sintética (p=0.0067), nas concentrações testadas (2,9 ± 1,4 volume tumoral) em comparação ao grupo controle (13,8 ± 6,6 volume tumoral), como também foi capaz de inibir a disseminação tumoral. As análises histoquímicas e histopatológicas dos tumores dorsais dos animais tratados com a fosfoetanolamina sintética, comparadas aos tumores dos grupos controles mostraram aumento significativo nas áreas necróticas, redução da densidade celular do tumor, com a presença de células em degeneração, redução da vascularização, vasos neoformados infuncionais e extensas áreas hemorrágicas. **Conclusões:** A fosfoetanolamina sintética é citotóxica e seletiva para células tumorais, dose dependente com IC50% = 1,69 ug/mL, sem afetar a resposta proliferativa de linfócitos T ativados. No modelo *in vivo* do melanoma B16F10 em todas as concentrações testadas a fosfoetanolamina sintética inibiu significativamente a progressão e disseminação das células tumorais. Alterações histopatológicas características da regressão tumoral foram encontradas nos tumores primários, como extensas áreas de necrose, formação de fibrose, deposição de colágeno na matriz extracelular e a inibição da formação neovascular.

Apoio Financeiro: FAPESP

01.054

POSSÍVEL PARTICIPAÇÃO DE PEPTÍDEOS INTRACELULARES NA SINALIZAÇÃO DA INSULINA

Berti, D. A.[1]; Klitzke, C. F.[2]; Ferro, E. S.[1] - [1]ICB - USP - Biologia Celular e do Desenvolvimento; [2]Instituto Butantan - CAT / CEPID

Introdução: A obesidade é um problema de saúde pública associado ao desenvolvimento doenças coronarianas, hipertensão, diabetes e aumento da resistência à insulina, cujas bases moleculares ainda não estão totalmente definidas. Estudos anteriores sugerem que peptídeos intracelulares, assim como oligopeptidases citoplasmáticas, poderiam estar relacionados à resistência à insulina induzida por dieta hipercalórica. Nosso grupo demonstrou recentemente que 75% dos 35 peptídeos derivados de proteínas intracelulares possuem sítios de modificação pós-traducional. Estes dados nos levaram à formulação da hipótese de que peptídeos intracelulares poderiam participar da regulação de cascatas de sinalização, como por exemplo, a da insulina, através de sítios de modificação pós-traducional. Assim, o objetivo do presente trabalho foi caracterizar o conteúdo peptídico nos tecidos adiposo e muscular de ratos resistentes à insulina, avaliando paralelamente a atividade das oligopeptidases EP24.15 e EP 24.16. **Métodos:** A resistência à insulina foi induzida em ratos Wistar alimentados com dieta hipercalórica. Para confirmação da resistência à insulina foram determinadas a insulinemia e a glicemia destes animais. A atividade enzimática das EP24.15 e EP24.16 foi quantificada por fluorimetria. Para caracterização diferencial do conteúdo peptídico do tecido adiposo foi utilizada a marcação isotópica. Para isso, peptídeos extraídos de animais controle foram ligados à forma pesada (D9), enquanto peptídeos extraídos dos animais experimentais foram marcados com a forma leve (H9) do marcador TMAB. Os peptídeos marcados foram analisados por espectrometria de massa (LC/MS/MS) em um aparelho Q-TOF. Devido à diferença de massa entre os dois marcadores, os peptídeos pertencentes à amostra controle foram distinguidos daqueles pertencentes à amostra experimental pela diferença de 9 Da. **Resultados:** Os ratos submetidos à dieta hipercalórica apresentaram maiores valores de insulinemia e glicemia em relação ao grupo controle. A dieta hipercalórica não alterou de forma estatisticamente significante a atividade das EP24.15 e EP24.16 nos tecidos analisados. As análises por LC/MS/MS das amostras de peptídeos marcados com os isótopos de TMAB revelaram um grupo de quinze peptídeos presentes tanto na amostra experimental como na amostra controle. Seis destes peptídeos encontravam-se em menor concentração no grupo submetido à dieta hipercalórica. A análise dos espectros de MS/MS permitiu a identificação de três peptídeos, dentre os seis que se apresentaram alterados. Interessante, estes peptídeos também possuem sítios de modificação pós-traducional, mantendo o mesmo padrão dos peptídeos identificados em nossos estudos anteriores (Machado MF, BBRC 339:520 - 2006). **Discussão:** Os resultados do presente trabalho demonstram que a resistência à insulina induz uma alteração no conteúdo peptídico do tecido adiposo de ratos Wistar. A detecção dos sítios de modificação pós-traducional nos três peptídeos identificados como alterados no grupo submetido à dieta hipercalórica, sugere que peptídeos intracelulares podem modular a cascata de sinalização intracelular da insulina. Agradecimento ao Laboratório Nacional de Luz Síncrotron - Campinas. **Apoio Financeiro:** FAPESP e CNPq.

01.055

SIGNALING PATHWAYS INVOLVED IN THE INDUCTION OF HEME OXYGENASE-1 BY LIPOXINS

Vieira, A. M.[1]; Nascimento da Silva, V.[2]; Arruda, M. A.[2]; Barja Fidalgo, T. C.[2]; Fierro, I. M.[2] - [1]UERJ - DFP; [2]UERJ - Farmacologia

Introduction: Lipoxins (LX) and aspirin-triggered LX (ATL) are eicosanoids generated via transcellular biosynthetic routes during inflammation, that elicit distinct anti-inflammatory and proresolution bioactions. Heme oxygenase-1 (HO-1) is an enzyme responsible for the catabolism of heme generating metabolites that lead to anti-inflammatory, antiapoptotic and antiproliferative effects. We have previously reported that ATL induce HO-1 expression in endothelial cells (EC), what confers cell protection against pro-oxidant insults. However, the cellular mechanisms underlying this effect are not well known. Therefore, the aim of this study was to investigate the signaling pathways involved in the induction of HO-1 in EC using an aspirin-triggered lipoxin A_4 stable analog, *15-epi-16-(para-fluoro)-phenoxy-lipoxin A_4* (ATL-1). **Materials and Methods:** HUVEC or ECV 304 were cultured on glass coverslips overnight. Cells were pre-incubated in the absence or in the presence of ATL-1 (3-300nM). In some experiments, the cells were pre-treated with LY294002 (3mM), a PI3-Kinase inhibitor; PD98059 (10mM), an ERK-2 inhibitor or SB203580 (1mM), a p38 MAPKinase inhibitor for 30 min and exposed to ATL-1 (100nM). Protein levels were detected by western blot analysis. **Results**: ATL-1 increased HO-1 expression in EC in a concentration and time-dependent manner. The pre-treatment of the cells with LY, PD or SB did not affect the enzyme expression by the lipoxin analog, suggesting that this effect is probably independent of the MAPKinases or PI3-Kinase pathways. Other signaling pathways that could be modulating HO-1 expression induced by ATL in EC, including JNK, AP-1 and NF-kB are under investigation. **Conclusion**: Taken together, our results address another mechanism of action for ATL that could be a promising strategy for the treatment of various diseases and resolution of inflammation. **Supported by**: FAPERJ, CNPq, SR-2/UERJ

01.056

DIFFERENT PATTERN OF MAP-KINASE ACTIVATION INDUCED BY ASPIRIN-TRIGGERED LIPOXINS IN MONONUCLEAR CELLS

Da-Fe, A. R.[1]; Cezar-de-Mello, P. F. T.[1]; Villela, C. G.[1]; Fierro, I. M.[2] - [1]UERJ - Farmacologia e Psicobiologia; [2]UERJ - Farmacologia

Introduction: Monocytes are circulating peripheral blood cells involved in a wide range of patophysiological events including the inflammatory response, cardiovascular diseases and atherosclerosis. Lipoxins (LX) are arachidonic acid metabolites generated during cell-cell interactions under a variety of conditions. These lipids and their stable analogs bind to a specific receptor named ALX displaying potent inhibitory actions in several key events in inflammation. Previous studies have shown that ATL-1, a stable 15-epi-LXA_4 analog, induces monocyte chemotaxis *in vitro*. In this work, we investigated the effects of ATL-1 in different processes of monocyte activation. **Methods:** Human monocytes were isolated by density centrifugation method with a purity of >90%. U937 cells, a monocytic cell line, were cultured in RPMI-1640 medium with 10% FBS, and maintained in growth by passage every 2-3 days. The viability of the cells (97-98%) was tested by trypan blue exclusion procedure. Cultured cells were incubated with ATL-1 (1-100 nM) for 15 min. A western blot assay was used to investigate ERK-2 and p38 MAPK phosphorylation as well as HO-1 induction. RT-PCR analysis was performed to investigate ALX expression. **Results:** In this work, we show for the first time the presence of a functional LX receptor in U937 cells. ATL-1, in a concentration manner, stimulated ERK-2 phosphorylation, a MAPK involved in the proliferation and cell survival. Cell migration induced by ATL-1 appeared to be independent of the p38 MAPK pathway. **Conclusion:** Recruitment of monocytes into atherogenic foci is required for the onset and progression of atherosclerosis. A better knowledge of the intracellular mechanisms modulating the activation of these cells can lead to new approaches to control this pathological condition. **Supported by**: FAPERJ, CNPq, SR-2/UERJ

01.057

MOLECULAR MECHANISMS GOVERNING THE ANTI-APOPTOTIC EFFECT ON NEUTROPHILS OF VLO5, A HETERODIMERIC VGD/MLD-DISINTEGRIN

Saldanha-Gama, R. F.[1]; Moraes, J. A. de[1]; Mariano de Oliveira, A.[1]; Coelho, A. L.[1]; Marcinkiewicz, C.[2]; Zingali, R.[3]; Barja Fidalgo, T. C.[1] - [1]UERJ - Farmacologia; [2]Temple University - Center for Neurovirology and Cancer Biology; [3]UFRJ - Bioquímica Médica

Neutrophils adhere on vascular endothelium and directly migrate toward inflamed tissue to exert their primary defense function. Integrin are receptors that drive cell adhesion and motility and interfere with cell activation, functions and survival. Acting as both anchoring molecules and signaling receptor, transducing signals outside-in and inside-out, integrins are potential targets for therapeutic and diagnostic opportunities. Disintegrins are a family of cystein-rich low-molecular weight peptides that usually contain an RGD sequence, a cell attachment site of ECM and cell surface proteins recognized by integrins. They are considered selective and competitive antagonists of integrins, being potent inhibitors of platelet aggregation and cell-cell/cell-ECM interactions. We reported that RGD-disintegrins, selectively interact with integrin (a_Mb_2; a_5b_1 and/or a_Vb3) on human neutrophils, interfering with cell functions through the activation of integrin-coupled intracellular signaling pathways. Recently showed that, a selective ligand of a_9/a_4b_1 integrin. VLO5, induces neutrophil chemotaxis, cytoskeleton mobilization and potently inhibiting neutrophil spontaneous apoptosis. These effects are mediated VLO5 interaction with a9b1 integrin, activating the focal adhesion cascade. VLO5 effects on the delay of neutrophil is modulated by PI3K, ERK-2 MAPK and NFkB pathways that seems to interfere with the balance between anti- and pro-apoptotic Bcl-2 family members and with mitochondrial membrane potential. Data emphasize mechanistic details of the role of a9b1 integrins interactions on human neutrophils and support the use of disintegrins as prototypes to develop logical combinations of drugs to optimize or minimize the susceptibility of a selected target cell population to apoptosis during therapeutic interventions. **Supported by**: FAPERJ, CNPq, IFS-Sweeden

01.058

PULCHELLIN, A RIBOSOME-INACTIVATING PROTEIN, INDUCES NEUTROPHIL APOPTOSIS

Santos-Oliveira, L.[1]; Saldanha-Gama, R. F.[1]; Castilho, V. P.[2]; Moraes, J. A. de[1]; Mariano de Oliveira, A.[1]; Araujo, A. P.[2]; Barja Fidalgo, T. C.[1] - [1]UERJ - Farmacologia; [2]USP - Centro de Biotecnologia Molecular Estrutural

Introduction: Pulchellin is a type-2 ribosome-inactivating protein (RIP) family member isolated from *Abrus pulchellus tenuiflorus* seeds. These chimerolectins, like all type-2 RIPs, are high toxic proteins with enzimatic and lectinic properties perfomed by two separate polypeptide subunits. Recently, different RIPs have been described as immunomodulatory agents with potential therapeutic aplication. During autoimmune diseases, as rheumatoid arthritis, polymorphonuclear neutrophil (PMN) life span is extended. Delayed PMN apoptosis induces proteolytic enzymes release and reactive oxygen intermediates production leading to tissue injury. In this study, we investgated the effect of pulchellin on neutrophil spontaneous apoptosis and the signaling pathways involved in these process. **Methods:** Human neutrophils were isolated by discontinous Percoll gradient and incubated with pulchellin (1-1000ng/mL). Apoptosis was evaluated morphologically at 5 and 18 h by optical microscopy and by FACS analysis of annexin-V stainig. The effect of pulchellin on mitochondrial membrane potential dissipation was evaluated at 5h using the cationic dye JC-1. Cleavage and activation of caspase 3 by pulchellin treatment of human neutrophils was tested by westernblotting. This assay was also used to verify the expression of anti- and pro-apoptotic proteins in neutrophils induced by pulchellin. **Results:** Pulchellin induced neutrophil apoptosis in a concentration dependent fashion with significant effect being detected at 5 hours. After 18 h pulchellin induced 100% neutrophil apoptosis as accessed by morpholgy and annexin V staining. These effects were paralelled by mitochondrial membrane potential dissipation as evaluated by JC-1 staining. Finally, pulchellin was able to trigger cleavage and activation of caspase 3 and reduce the expression of the anti-apoptotic protein Bcl-xL. **Conclusions:** These findings suggest that pulchellin is a potent inducer of neutrophil apoptosis and that this effect involves the mitochondrial apoptotic pathway. In the future pulchellin may thus be used as a prototype for design of new drugs with therapeutic potential for the treatment of diseases where neutrophils play a major pathological role. **Supported by**: CNPq, FAPERJ, CAPES and SR-2/UERJ

01.059

HEME, A PROINFLAMMATORY MOLECULE, INHIBITS NEUTROPHIL APOPTOSIS: INVOLVEMENT OF A CLASSICAL PKC ISOFORM.

Barcellos-de-Souza, P.[1]; Serezani, C. H.[2]; Barja Fidalgo, T. C.[1]; Arruda, M. A.[1] - [1]UERJ - Farmacologia; [2]USP - Imunologia

Introduction: Previous studies from our group have characterized free heme as a proinflammatory molecule able to delay neutrophil spontaneous apoptosis. This quality implies that free heme has a key role throughout acute and chronic inflammation associated to hemolytic episodes. PKC pathway activity showed to be critical in controlling this aspect, once most of the heme-evoked proinflammatory responses, as well as the up-regulation of the pro-survival PI3K/Akt pathway, was due this kinase activity. However, the use of pan-PKC inhibitors had no effect on heme antiapoptotic effect. This scenario points to a differential role of distinct PKC isoenzymes on the regulation of heme-induced delay of neutrophil spontaneous apoptosis. Materials and Methods: Human neutrophils from peripheral blood (PMN) were obtained by Ficoll separation followed by Dextran sedimentation. After remaining erythrocytes were removed by hypotonic lysis, PMN (5 x 10^6 cells/mL) were incubated in DMEM supplemented with FBS 10% in the absence or presence of heme (1-10 μM) and treated or not with selective PKC isoforms inhibitors. PMN cytospins were stained with Diff Quick™ and counted under light microscopy for morphological analysis of apoptotic cells. Total extract were obtained for immunoblotting. Results: Inhibition of the classical PKC-α isoform with the selective inhibitor RO32-0432 (10 nM) significantly inhibited the delay of neutrophil apoptosis evoked by heme (33, 35 %±0, 95 versus 60, 23 %±12, 68; n = 5). However, Rotlerin (6 μM), a selective inhibitor of the novel PKC-□ isoform, as previously described, inhibited neutrophils spontaneous apoptosis by itself, what was not affected by heme treatment. Heme was able to induce PKC-α phosphorylation, a parameter of activation of this kinase. PKC-α activity is also involved in the degradation of the pro-apoptotic Bcl-2 protein Bad. The involvement of PKC-α isoform on the pro-survival signaling cascades as well as on mitochondrial transmembrane potential preservation and Bcl-2 members activity in heme-stimulated neutrophils are under investigation. Conclusion: Our results indicate that PKC isoforms have a complex, hierarchical role on neutrophil stimulation, a phenomenon which may corroborate to the understanding of the signaling events that rule neutrophil activation and survival evoked by heme. **Supported by**: CAPES, CNPq, SR-2/UERJ.

01.060

EFFECT OF LEUKOTRIENE B4 ON SMOOTH MUSCLE CELL MIGRATION AND PROLIFERATION: ROLE OF PI3K, ERK AND ALPHAVBETA3 INTEGRIN

Moraes, J. A. de[1]; Canetti, C.[2]; Assreuy, J.[3]; Barja Fidalgo, T. C.[4] - [1]UERJ - Farmacologia Bioquímica e Celular; [2]UFRJ - IBCCF; [3]UFSC - Farmacologia; [4]UERJ - Farmacologia

Introduction and goals A local vascular injury can lead to local inflammation, with lesion of endothelial cells, extracellular matrix exposition and aggregation/adhesion of platelets and circulating leukocytes. The release of inflammatory mediators amplifies the process, and induces smooth muscle cells (SMC) adhesion and proliferation, that can form a neointima, leading to vessel occlusion (restenosis). SMC is also of paramount importance in atherosclerosis. In an atheromatous plaque is observed a large amount of SMC, that is responsible for the plaque stability. Thus, in atherosclerosis, as in restenosis, is necessary SMC migration and proliferation. An important inflammatory mediator released by leukocytes is leukotriene B4 (LTB4), that can represent relevant importance in vascular injury, because leads to a reactive oxygen species production and is a strong chemoattractant to SMC. Actually is a challenge to elucidate the molecular mechanisms that leads to restenosis/atherosclerosis and the development of new therapeutic strategies to the treatment/prevention. To elucidate the molecular mechanisms involved in restenosis/atherosclerosis, we have studied the mechanisms involved in SMC migration and proliferation induced by LTB4, the role of PI3K, MAPK and integrins. **Methods** Chemotaxis assay was accomplished in a Boyden chamber. SMC was pre-treated for 30min with different antagonists and then incubated for 4 hours to migration. Cell viability was observed after 48h of treatment with LTB4 and SMC was incubated with MTT for 4h. Cell proliferation was measured using thymidine (H3) incorporation assay. Thymidine (1 µCi/mL) was added after last 24h of incubation of LTB4. Expression of proteins were analysed by immunoblotting. **Results** LTB4 was chemotactic for SMC murine cell line (A7R5) as evaluated in Boyden chambers, after 4 hours incubation *in vitro*, and CP-105696 (BLT1 antagonist) abrogated the LTB4 effect. In agreement, LTB4 promoted actin cytoskeletal rearrange. LTB4 stimulated integrin-related signaling pathways, inducing focal adhesion kinase (FAK) phosphorylation, its association to PI3K, as well as the Erk-2 phosphorylation and nuclear translocation of Erk-2 and NFKB, as evaluated by western blotting. Confirming the involvement of PI3K and Erk-2, LY294002 and Wortmaninn, inhibitors of PI3K, and PD98059, an inhibitor of Erk-2 pathway, inhibited SMC chemotaxis induced by LTB4. Pre-treatment of SMC with kistrin, a selective ligand of alphavbeta3 integrin, prevented the effect of LTB4 on SMC chemotaxis, actin cytoskeletal rearrange, FAK phosphorylation, its association to PI3K, Erk-2 phosphorylation and Erk-2 and NFkB nuclear translocation. LTB4 also stimulated SMC proliferation, as evaluated by MTT and timidine incorporation assay, and its effect was blocked by kistrin. The data suggest that the effect of LTB4 on migration and proliferation of SMC could be modulated by integrin signaling activation, suggesting that these adhesion molecules may be important target for therapeutic intervention in restenosis/atherosclerosis. **Supported by**: FAPERJ, CAPES, CNPq, IFS-Sweden

01.061

MAPK AND PI3-KINASE MODULATE LIPOXIN A_4 INHIBITION OF HUMAN MONOCYTE APOPTOSIS

Niconi-De-Almeida, Y.[1]; Simões, R. L.[1]; Da-Fe, A. R.[1]; Fierro, I. M.[1] - [1]UERJ - Farmacologia e Psicobiologia

Introduction: Mononuclear cells play a central role in the initiation, development and outcome of the immune response. Produced in the bone marrow, these cells circulate in the blood stream for 24-48 h before undergoing spontaneous apoptosis, a form of programmed cell death. Monocyte apoptosis may be a central regulatory event in the resolution phase of the inflammatory process. Lipoxins are generated during cell-cell interactions under a variety of conditions, such as infection and inflammation and have powerful inhibitory effects in key events of the inflammatory response. However, in monocytes, LX show specific stimulatory activities, without activating toxic properties of these cells. In this study, we investigated the effects of ATL-1, a synthetic analog of 15-epi-lipoxin A_4, in human monocyte survival and apoptosis. Methods: Human monocytes were isolated by density centrifugation method with a purity of >90%. Cultured cells were incubated with ATL-1 (1-100 nM) in the presence or absence of serum for 1, 24 or 48h. In some experiments, the cells were treated with LY294002 (3 mM), a PI3-kinase inhibitor, to evaluate the signaling pathways involved in this process. A western blot assay was used to investigate Akt phosphorylation and ERK nuclear translocation. Results: We have previously demonstrated that ATL-1 increased human monocyte survival through monocyte apoptosis reduction. Moreover, this effect appeared to involve both ERK-2 and PI3K, two pathways associated with cell survival. In this study, we show an increase in ERK-2 nuclear translocation, a crucial step in the MAPK activation. Furthermore, the phosphorylation of Akt, a downstream protein in the PI3-K pathway, was also observed. These results indicate that ATL-1-promoted apoptosis inhibition depends on the activation of ERK-2 and PI3-K pathways. Conclusion: These results demonstrate a cytoprotective effect of ATL-1 in monocytes, acting via MAPK and PI3-K pathways, and might contribute to the elucidation of the mechanisms associated with the resolution phase of the inflammatory process. **Supported by**: FAPERJ, CNPq, SR-2/UERJ

01.062

ROLE OF THE GLUCOCORTICOID CYTOSOLIC RECEPTOR (GCR) ON EVENTS INVOLVED IN NEUTROPHIL MOBILIZATIONS

Cavalcanti, D. M. H.[1]; Borelli, P.[1]; Ferreira, Z. S.[2]; Markus, R. P.[3]; Farsky, S.[1] - [1]USP - Análises Clínicas e Toxicológicas; [2]USP - Fisiologia; [3]IB - USP - Fisiologia

Introduction: We have shown that endogenous glucocorticoids (EG) control neutrophil mobilizations from the bone marrow and peripheral compartment by modulating the expression of L-selectin on segmented cells (Cavalcanti et al, Mol Cell Endocrinol, vol 249, p.32,2006) and immunoglobulins on endothelial cells (EC) (Cavalcanti et al., Br. J. Pharmacol, submitted). **Aim:** Now we evaluated the molecular mechanisms responsible for hormonal actions in neutrophils and EC using RU 38486, an antagonist of glucocorticoid cytosolic receptor (GCR). **Methods**: Male Wistar rats (180-220g) were treated with RU 38486 (10 mg/kg, i.p., once a day, seven days) or vehicle. Number of femoral bone marrow or circulating segmented cells were morphologically determined; expression of adhesion molecules on bone marrow or circulating leukocytes were quantified by flow cytometer; adhesion molecules expression on EC from postcapillary venules of cremaster muscle were quantified by immunohistochemistry; gene expression of adhesion molecules were quantified by PCR reaction in primary cultured EC (obtained from cremaster muscle); NF kappa B translocation into nucleus of neutrophils or EC was detected by electromobility gel shift assay (EMSA). **Results**: RU 38486 treated rats presented alterations on maturation of segmented leukocytes, resulting in higher mobilization of neutrophils to peripheral blood. These effects may be related to hormonal effects on L-selectin expression, as bone marrow segmented cells or circulating neutrophils from RU 38486 presented lower (75% vs control) or higher (50% vs control) expression of the molecule, respectively. Blockage of GCR increased the gene and membrane expression of ICAM-1 (33% vs control), VCAM-1(40% vs control), and PECAM-1 (30% vs control) on EC. NF kappa B translocation in neutrophils was equivalent in vehicle or RU 38486- treated animals, but it was enhanced in EC from RU 38486-treated rats. **Conclusions**: Data here presented clearly show the participation of the GCR on endogenous control of glucocorticoids on neutrophil mobilization, and indicate differences on molecular mechanism of actions in neutrophils and EC. **Supported by**: FAPESP (grants 03/09410-5 and 05/59753-1)

01.063

AVALIAÇÃO DA POSSÍVEL HERANÇA GENÉTICA NA ATIVIDADE DA ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA I (ECA) PLASMÁTICA DE RATOS DA COLÔNIA 2 BAW

De Oliveira, S. S.[1]; Yasuta, M. K.[2]; Ferreira, D. B.[2]; Lapchik, V.[2]; Souccar, C.[2]; Lapa, A. J.[2]; Lima-Landman, M. T. R.[2] - [1]CBA - Farmacologia e Toxicologia de Medicamentos; [2]UNIFESP - EPM - Farmacologia

Introdução: A hipertensão é uma patologia multifatorial e poligênica. O sistema renina-angiotensina é de particular importância nesta patologia, o que permitiu a introdução de medicamentos inovadores no controle da PA, como os inibidores da ECA e os bloqueadores dos receptores de angiotensina II do tipo AT1. Em trabalhos anteriores foi verificado que em ratas fêmeas da colônia 2-BAW, a atividade plasmática da ECA apresentou-se dispersa, possibilitando a divisão destes animais em três grupos de acordo com a atividade enzimática: animais com atividade ECA alta (ECAa: 48,8±2,3 nmol/min/mL), com atividade ECA intermediária (ECAi: 39,4±1,4 nmol/min/mL) e com atividade ECA baixa (ECAb: 23,5±0,6 nmol/min/mL) (Ninahuaman e cols., Phytomedicine 14: 314, 2007). O objetivo deste trabalho foi: 1) Monitorar a atividade da ECA plasmática de ratos machos e fêmeas, adultos, da colônia 2-BAW; 2) Realizar o acasalamento direcionado de animais com as diferentes atividades de ECA plasmática e 3) Verificar uma possível herança genética desta característica visando a obtenção de modelos animais com diferentes atividades de ECA plasmática. **Método:** A atividade da ECA plasmática foi determinada em 40 ratos adultos, normotensos, 20 machos e 20 fêmeas (geração F0). Amostras (5) de sangue (500 ml) foram coletadas em tubos heparinizados por punção da artéria caudal, a intervalos de 1 semana. O sangue foi centrifugado (2500 rpm, 4ºC, 10 min), o plasma separado e armazenado a -20°C. A atividade da ECA foi determinada, pelo método da fluorescência apagada (Chagas e cols., Anal. Biochem. 192: 419, 1991). Os resultados foram expressos em nmol/min/ml como média±desvio padrão das médias e comparadas pelo teste t de Student com $p<0,05$. De acordo com os valores de ECA foi feito o acasalamento direcionado dos ratos da geração F0: animais ECAa x ECAa, ECAi x ECAi e ECAb x ECAb. Após o nascimento da geração F1, a atividade plasmática da ECA dos filhotes foi determinada aos 30, 60 e 120 dias de vida pelo método descrito acima (CEP 0186/06). **Resultados:** A ECA plasmática de ratos machos e fêmeas F0 mostrou-se dispersa e possibilitou a sua divisão em 3 grupos experimentais. Os acasalamentos de 6 casais com ECAa (Machos: 43,0±3,7; Fêmeas: 42,2±5,2), 6 casais com ECAb (Machos: 30,7±3,2 Fêmeas: 28,1±3,0) e 8 casais com ECAi (Machos: 36,7±1,6 Fêmeas: 36,3±1,7) da geração F0 foi realizado e os valores de ECA avaliados na geração F1. Na geração F1, a ECA plasmática manteve-se constante nos mesmos animais aos 30, 60 e 120 dias de idade. Aos 120 dias, os valores da ECA segundo o par acasalado foram: ECAa x ECAa, (64 filhotes, ECA = 45,1±7,4 e 44,3±6,8), ECAb x ECAb (62 filhotes, ECA = 34,5±7,8 e 29,0±8,6) e ECAi x ECAi (89 filhotes, ECA = 44,0±9 e 35,2±8,0) nos machos e fêmeas, respectivamente. **Discussão:** Os resultados obtidos indicaram um provável fator hereditário controlando a atividade da ECA plasmática, uma vez que o valor da ECA dos filhotes acompanhou a dos pais. A continuação do monitoramento e divisão dos animais de acordo com os níveis de ECA plasmática, acasalamentos direcionados sucessivos e a confirmação deste padrão hereditário mostram-se promissores para o entendimento da participação da ECA em processos fisiopatológicos. **Apoio financeiro:** Fapesp, CNPq, CBA, FADA-UNIFESP

01.064

REGULATION OF CASPASE-3 ACTIVITY IN DENERVATED AND ANDROGEN-DEPRIVED ATROPHIED SKELETAL MUSCLE

Pires-Oliveira, M.[1]; Andrade-Lopes, A. L.[1]; Godinho, R. O.[1] - [1]UNIFESP - EPM - Pharmacology

Introduction: Loss of skeletal muscle mass during atrophy occurs mainly through ubiquitin-proteasome system-mediated proteolysis. However, other processes, such as myonuclear loss through apoptotic phenomena, also contribute to atrophied muscle metabolic and transcriptional adaptation. Denervation (DEN) leads to atrophy through removal of nerve-derived trophic factors, which maintain muscle mass through anabolic stimuli, but also repress catabolic cascades leading to activation of apoptosis effectors, mainly caspase-3. These actions might partially explain the trophic effects of those substances. Androgens, on the other hand, display marked anabolic properties at skeletal muscle by mechanisms not yet fully known. In this work, we aimed to investigate the effects of androgen deprivation on apoptosis and caspase-3 activity in the androgen-dependent levator ani muscle (LA), while comparing these effects with those seen in denervated rat diaphragm (DIAPH), extensor digitorum longus (EDL) and soleus (SOL). **Methods:** Muscles from adult male Wistar rats (n = 3) gonadectomized for 0, 2, 7, 15 or 30 days, or denervated for 15 days were collected and subjected to confocal microscopy or cytosolic fractioning. Apoptotic myonuclei were detected through Hoechst 33258 histofluorescence and caspase-3 activity was determined through a fluorometric assay with Ac-DEVD-AMC substrate. **Results:** Gonadectomy (GDX) induced a progressive LA atrophy, up to 59% after 30 days, as compared to control group (328.6±12.5 mg, mean±SEM), with no effect on DIAPH, EDL and SOL weight. DIAPH suffers a transient hypertrophy (40%) after 7-day DEN followed by atrophy to control weight values (250.0±6.3 mg) after 15 day. DEN also reduced EDL and SOL weight by 41% and 55%, respectively, as compared to controls (EDL = 114.6±12.3 mg; SOL = 128.4±12.2 mg). Apoptotic myonuclei appeared from the 2nd to the 7th day of androgen deprivation in LA muscle fibers, but not in EDL fibers. Interestingly, caspase-3 activity was not changed by GDX in LA, as compared to controls (52.8±6.8 AU/mg protein). No effect on caspase-3 was also seen following denervation of SOL (196.2±22.0 AU/mg protein) and EDL (154.4±36.1 AU/mg protein), thus indicating that apoptotic phenomena in atrophied skeletal muscles might be largely mediated by caspase-3-independent pathways. However, there was a 100% increase in caspase-3 activity after 15-day DEN in DIAPH as compared to controls (191.8±8.9 AU/mg protein), which might be due to this muscle's particular physiology and atrophy time course. **Discussion:** Muscle atrophy, induced either by androgen deprivation or denervation, is paralleled by myonuclear loss, which might contribute to maintenance of adequate transcriptional status in atrophied myofibers. Our results show that these phenomena are mediated by caspase-3-independent mechanisms. Apoptotic myonuclei appear early and transiently in LA fibers following GDX, which contrasts with their known continuous presence, for up to 4 months, in denervated muscle. Remarkably in diaphragm, atrophy is delayed following denervation, when compared to EDL and SOL, indicating that continued mechanical activity of contralateral innervated diaphragm is a trophic stimulus to the denervated muscle. It remains to be investigated how muscle contraction might affect the full time-course of atrophy-related signals, such as caspase-3 activity. **Supported by**: CNPq and FAPESP