

- Neuroquímica

03.001

INERVAÇÃO DE CÉLULAS MCH NA ÁREA HIPOTALÂMICA LATERAL POR FIBRAS UROCORTINÉRGICAS DO NÚCLEO ACESSÓRIO DO OCULOMOTOR. Santos Júnior, E. D.; Bittencourt, J. C.; Elias C. F. Anatomia ICB III-USP

Objetivo:

O núcleo Acessório do Oculomotor, chamado também de núcleo de Edinger-Westphal (EW) foi relacionado, por ocasião da sua descoberta, ao controle do diâmetro pupilar. No entanto, estudos recentes têm demonstrado que esse núcleo está associado também às respostas fisiológicas que ocorrem em situações de estresse, mediadas principalmente pelo neuropeptídeo urocortina 1 (Ucn-1), cujo principal sítio de expressão no sistema nervoso é o EW. O estudo da distribuição das eferências do EW revelou moderada quantidade de fibras alcançando a área hipotalâmica lateral (AHL), região onde se encontra grande quantidade de células que expressam o hormônio concentrador de melanina (MCH).

Uma das principais atribuições dadas às células MCH na AHL é o controle do comportamento alimentar. Nosso objetivo é investigar se fibras urocortinérgicas originárias do EW inervam células MCH na AHL.

Métodos e Resultados:

Foram usados ratos adultos jovens da espécie Long-Evans (n=14) pesando entre 300 – 330g. Cirurgias para injeção de traçador neuronal anterógrado BDA 10% (n=6) no EW foram realizadas para estudo das eferências. Realizamos reações de dupla marcação usando histoquímica para demonstrar fibras originárias do EW e imunistoquímica para demonstrar células MCH na AHL (n=4). Realizamos também em animais normais (n=4) dupla imunistoquímica anti-Ucn-1 e anti-MCH para investigar a ocorrência de possível contato sináptico entre células MCH e fibras Ucn-1. As reações foram feitas utilizando o somente DAB e DAB e níquel. Observamos fibras urocortinérgicas provenientes do EW fazendo possíveis contatos sinápticos com células MCH na AHL.

Conclusões: Esses resultados sugerem que a Ucn-1 pode modular o comportamento alimentar através de projeções diretas para células MCH da AHL.

03.002

EFEITO DO METANOL NAS ATIVIDADES ECTONUCLETIDÁSICAS EM MEMBRANAS CEREBRAIS DE ZEBRAFISH (DANIO RERIO). ¹Rico, E.P.; ¹Senger, M. R.*; ²Arizi, M. B.*; ³Bernardi, G. F.*; ³Rosemberg, D. B.*; ²Bogo, M. R.; ³Bonan, C. D. ¹Bioquímica ICBS-UFRGS; ²Fisiologia PUC-RS; ³Ciências Fisiológicas, PUC-RS; .

Objetivo:

O metanol é uma substância utilizada no preparo de soluções crioprotetoras, visando a conservação de embriões de zebrafish em diversos estágios do seu desenvolvimento embrionário. Estudos demonstram que sua toxicidade ocorre pela injúria celular e alteração de algumas atividades enzimáticas. Entretanto, não existem evidências sobre os possíveis efeitos do metanol no sistema purinérgico desta espécie, onde o ATP atua como um neurotransmissor. Esta molécula é inativada pelas enzimas NTPDase (nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase) e ecto-5'-nucleotidase, produzindo o neuromodulador adenosina. Estas enzimas foram caracterizadas em SNC de zebrafish em nosso laboratório. O objetivo deste estudo é avaliar o efeito *in vitro* e *in vivo* do metanol sobre as atividades ectonucleotidásicas em membranas cerebrais de zebrafish.

Métodos e Resultados:

As membranas cerebrais de zebrafish foram preparadas como descrito previamente (J. Neurochem. 61:1685-1691, 1993) e os ensaios enzimáticos foram realizados. A atividade do grupo controle foi $580 \pm 26,4$, 134 ± 12 , $19,2 \pm 3,5$ nmol de Pi.min⁻¹.mg⁻¹ de proteína. Nos experimentos *in vitro*, o efeito do metanol foi testado nas concentrações de 0,25% a 3%, sendo observadas alterações significativas para a hidrólise do ATP nas concentrações 1,5% (inibição de 20±3%; n=5) e 3% (inibição de 35±11,8%; n=5). Com relação à hidrólise do ADP, houve uma inibição de 18±11,1%, 21±11,8% e 30±5,54% nas concentrações 1,0, 1,5, e 3,0% de metanol (n=5), respectivamente. Não foi observado efeito significativo do metanol na hidrólise do AMP. Nos

experimentos *in vivo*, os peixes foram expostos ao metanol nas concentrações 0,25, 0,5 e 1,0% durante 60 minutos. Os resultados mostraram uma inibição na hidrólise do ATP (26,2±8,12% e 55,1±7,9%, n=5) e ADP (26,4±13,9% e 30,1±15,54%, n=5) para as concentrações 0,5% e 1%, respectivamente. Não foram observadas alterações significativas na hidrólise do AMP nas concentrações de metanol testadas.

Conclusões:

Estes resultados sugerem que um dos possíveis alvos do metanol é o sistema purinérgico, exercendo uma modulação nos níveis de ATP e adenosina. Tais resultados serão importantes no sentido de avaliar os efeitos neurotóxicos do metanol no SNC, além de servir como uma ferramenta fundamental em protocolos de vitrificação.

03.003

REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO DE SUBUNIDADES DE RECEPTORES NMDA EM CULTURAS DE RETINA. ¹Caversan, O. M.; ²Ferreira, J. M.*; ¹Paes-de-Carvalho, R. ¹Neurobiologia UFF; ²Biofísica UFRJ

Objetivo:

O receptor NMDA tem papel fundamental no desenvolvimento e manutenção da atividade do Sistema Nervoso Central (SNC) sendo formado por subunidades NR1, NR2 e NR3. As subunidades NR2 são regulatórias da atividade do receptor e o estudo dos mecanismos envolvidos na sua expressão é de fundamental importância. Neste trabalho estudamos a presença da subunidade NR2B em culturas de retina e o efeito do seu bloqueio crônico na expressão das subunidades NR1 e NR2A.

Métodos e Resultados:

Células da retina de embrião de galinha foram cultivadas na forma de culturas purificadas de neurônios ou mistas. A técnica de ligação do ³(H) MK-801 ao receptor NMDA foi aplicada às culturas mistas. Enquanto que a ligação do ³(H) MK-801 a culturas tratadas com ifenprodil (10µM), um ligante da subunidade NR2B, decrescia a ligação para 5,2±5,2% (n=2) do controle, o tratamento crônico com este composto evidenciou um aumento na ligação de 17,2±0,6% (n=2) do controle. O tratamento agudo das células com ifenprodil (10µM) promoveu uma inibição de 28±1,12% (n=2) do influxo de ⁴⁵Ca⁺² estimulado por NMDA (1mM) + glicina (1mM). Em culturas tratadas por 48 horas o influxo de ⁴⁵Ca⁺² apresentou um discreto aumento não significativo de 11,5± 9,6% (n=2). A análise por Western Blot de amostras de células tratadas com ifenprodil (100nM) por 72 horas mostrou diminuição da expressão da subunidade NR2A para 49,5±4,6% do controle e da subunidade NR1 para 14,1±1,24% do controle.

Conclusões:

Os resultados sugerem a expressão da subunidade NR2B no canal do receptor NMDA em culturas de células de retina, tendo em vista o efeito do ifenprodil agudo (10µM) no bloqueio do influxo de ⁴⁵Ca⁺². Além disso, o tratamento crônico com ifenprodil diminuiu a expressão de NR2A e aumentou a de NR1, sugerindo que o bloqueio de NR2B promova um atraso no aparecimento de NR2A na composição do receptor NMDA.

03.004

FOSFORILAÇÃO DA AKT/PKB POR ÓXIDO NÍTRICO EM NEURÔNIOS DE RETINA EM CULTURA. Mejia-Garcia, T. A.; Socodato, R. E. S.*; Paes-de-Carvalho, R. Neurobiologia UFF

Objetivo:

Trabalhos anteriores do laboratório mostram que o Óxido Nítrico (NO) inibe a apoptose produzida pela troca de meio em culturas de neurônios de retina através de um processo envolvendo proteínas cinases como a CaMKII e AKT. Sabe-se que o NO e a cascata de sinalização da PI3K/AKT apresentam funções similares na regulação da sobrevivência em vários tipos celulares. AKT é uma proteína serina-treonina cinase que é recrutada para a membrana através da ligação de fosfoinosítídeos produzidos pela PI3K e por sua vez dependente de fatores tróficos. O propósito do presente estudo foi determinar o mecanismo pelo qual o NO produz fosforilação da AKT na serina-473 (AKT-S⁴⁷³) e determinar de que maneira o influxo de cálcio modularia a AKT em células neuronais de retina de embrião de pinto.

Métodos e Resultados:

Culturas mistas e purificadas de neurônios de retina de embrião de 8 dias (E8) eram plaqueadas e mantidas até E8C3. Após 72 horas "in vitro" era adicionado SNAP (doador de NO) ou L-arginina (L-ARG) em concentrações e tempos diferentes. Em seguida, era medida a fosforilação da AKT pela técnica de Western Blot. Em cultura purificada de neurônios mantidas até E8C3 foi determinada a captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ após 3 minutos da adição de SNAP (100 μM) e quantificada por cintilação líquida. Os resultados mostram que tanto o NO como L-ARG induzem a fosforilação da AKT-S⁴⁷³ de uma maneira tempo e dose-dependente. Por sua vez, NO produz também aumento do influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ de 3 vezes (602.3 \pm 95.4 CPM/placa) comparado com o controle (159.8 \pm 42.6 CPM/placa) (n=3).

Conclusões:

Nossos dados sugerem que o NO e a ativação da enzima NOS-neuronal pela L-ARG promove a fosforilação da AKT-S⁴⁷³, um sinal importante na regulação da sobrevivência celular. O aumento do influxo de cálcio induzido pelo NO pode ser fundamental para ativação da AKT em nossas culturas.

03.005

INIBIÇÃO DA VIA ALTERNATIVA DE SÍNTESE DE CATECOLAMINAS, EM RETINAS EMBRIONÁRIAS DE AVES, AUMENTA A COMUNICAÇÃO DOPAMINÉRGICA NO TECIDO RETINIANO ADULTO. ¹Serra, G. C. F.; ²Kubrusly, R. C. C. ^{*}; ³Ventura, A. L. M.; ⁴Yamasaki, E.N.; ¹Neuhaus-Oliveira, A. ^{*}; ⁴da Silva, R. T. ^{**}; ⁴Gardino, P. F.; ⁴de Mello, M. C. F. ^{*}; ⁴de Mello, F. G.; ¹Fisiologia e Farmacologia, UFF; ²Fisiologia e Farmacologia UFRJ; ³IB-UFF; ⁴IBCCF-UFRJ

Objetivo:

Objetivos: A síntese de Dopamina (DA) em retinas embrionárias depende da produção de L-dopa pelo epitélio pigmentado (J. Neurochem. 2003 Jul;86(1):45-54) que é convertida em DA pela Dopa-D Descarboxilase (DDC) retiniana. No período de pós-eclosão (PE), receptores dopaminérgicos (D1) estão dessensibilizados, com os altos níveis de AMPc induzidos por DA endógena sintetizada durante o desenvolvimento. Neste trabalho verificamos se bloqueio da síntese de DA a partir de embriões de 8 dias (E8) impediria a dessensibilização de receptores (D1) no período (PE).

Métodos e Resultados:

Métodos:Ovos de galinha de E8 ou E15 dias foram injetados com dose única de 0,1mM de HBH (inibidor da DDC) ou PBS (controle). As retinas em PE foram dissecadas e processadas para quantificação de receptores D1, expressão de DDC por imuno-histoquímica, de receptores (Western blot /WB) e acúmulo de AMPc. Resultados: Retinas (PE) tratadas com HBH apresentaram um aumento no número de sítios D1 de 2.7 vezes (496,9 +/-25 fmoles/ng ptn; n=2) em relação ao controle (185,2 +/-17 fmoles/ng ptn; n=2). A expressão dos receptores D1-A por WB mostrou-se inalterada. Os níveis de AMPc basais (70 +/-5.0 pMoles/ptn; n=5) e estimulados por 0.1mM DA (216 +/- 15 pMolesAMPc/mg ptn; n=5) em retinas tratadas com HBH foram 30% maiores do que no controle (basal- 54 +/- 4 pMolesAMPc e estimulado 163 +/- 7pMolesAMPc; n=5). A imuno-histoquímica para DDC, em retinas tratadas com HBH, revelou um aumento no número de células DDC positivas de aproximadamente 70% (3,07 +/- 0,12 cél./ mm linear) em relação às retinas controle (1,8 +/- 0,09 cél./mm linear; n=2 animais).

Conclusões:

Conclusão: Estes resultados indicam que a síntese de DA nos estágios precoces do desenvolvimento retiniano induz uma plasticidade funcional do sistema dopaminérgico ao longo da formação da retina.

03.006

CONDITIONED MEDIUM OF CULTURED SCHWANN CELLS STIMULATES THE TROPHISM OF NEONATAL BRAINSTEM CELLS IN VITRO, AN EFFECT WHICH IS NOT POTENTIATED BY THE PRESENCE OF INFLAMMATORY CYTOKINES. ¹Taneda, M; ²Guzen, F.P. ^{**}; ³Carrettiero, D. C. ^{**}; ⁴Fior-Chadi, D. R.; ²Chadi, G.; ¹Anatomia ICB III-USP; ²ICB III-USP; ³Neuroquímica USP; ⁴Neuroquímica IB

Objective: Schwann cells (SC) produce and release neurotrophic factors that induce the survival and regeneration of neurons following nerve injury, a process that may be influenced by the local release of inflammatory cytokines. The present study examined the effect of SC conditioned

medium (SCCM) cultured in the presence of transforming growth factor beta 1 (TGF- β 1) or tumor necrosis factor alpha (TNF- α) on fiber growth of brainstem neurons in vitro.

Material and Methods: Primary neuronal cultures were established from neonatal Wistar rats while SC cultures were obtained from sciatic nerves explants of adult rats. SC were treated or not with TGF- β 1 or TNF- α for 24 hours. Neuronal cells received the SCCM every 12 hours during 96 hours. As controls, neurons received neuronal or SC culture medium. The areal fraction (AA) of neuronal fibers per neuron was quantified by means of stereological method at 24, 48 and 72/96 hours after treatment under contrast-phase microscopy.

Results: The SC medium (control) induced fiber sprouting through out periods of analysis. However, the SCCM induced further sprouting only at 72/96 hours compared to SC medium. At the time, the effect of SCCM was not altered when SC cultures were pre-treated with TNF- α or TGF- β 1.

Conclusion: The results showed that SCCM may stimulate the neurite outgrowth of brainstem neurons, a phenomenon that is not potentiated by TNF- α or TGF- β 1.

03.007

PROPOSIÇÃO DE REGRAS PARA A DISSOCIAÇÃO DE PEPTÍDEOS AGREGANTES DE IMPORTÂNCIA FISIOLÓGICA EM SOLUÇÃO OU LIGADAS A RESINAS. Malavolta, L.; Cuvero, J. H.*; Nakaie, C. R. Biofísica UNIFESP

Objetivo:

Seguindo trabalho recente onde comparamos a dissociação de peptídeos ligados em polímeros durante as suas sínteses ou livres em solução (Tetrahedron 60:9417, 2004), estendemos agora este estudo para os agregantes, mas de relevância fisiológica. Avaliou-se o peptídeo β -amilóide, de 42 aminoácidos, envolvido na formação de placas amiloidais no mal de Alzheimer, uma seqüência hidrofóbica transmembranar de 32 aminoácidos do receptor B2 da BK, além de outras com diferentes características.

Métodos e Resultados:

Quantificou-se o grau de solubilização de peptídeos por centrifugação ou estimou-se o grau de solvatação de peptidil-resinas, por microscopia dos grãos. O parâmetro de polaridade usado foi o proposto por nós (Tetrahedron 58:4383, 2002) e que considera o somatório das características ácidas e básicas da molécula do solvente.

Conclusões:

Ao contrário de peptidil-resinas que solvatam melhor em solventes com polaridades equivalentes às suas, a solubilização de peptídeos em solução dependeu principalmente das propriedades eletrofílicas e nucleofílicas do solvente. Quanto maior a diferença entre estas propriedades e o seu potencial de formação de ligações de van der Waals com o soluto, maior a capacidade do solvente de solubilizar peptídeos, mesmo os mais fortemente agregados. Solventes com valores de acidez e basicidade equivalentes não dissolvem peptídeos nem tampouco solvatam peptidil-resinas (autoneutralização intramolecular). O efeito solubilizante favorável ou não, do solvente fortemente eletrofílico água na mistura é muito dependente da natureza e da quantidade do cosolvente, principalmente no caso dos muito ácidos (HFIP e TFE) ou básicos (DMSO). As figuras 1 e 2 destacam alguns resultados obtidos com o peptídeo β -amilóide. No geral, espectros de CD indicaram forte correlação entre solubilidade e a conformação dos peptídeos, dependente do sistema de solvente utilizado.

03.008

ADMINISTRAÇÃO AGUDA DE METILFENIDATO ALTERA A ATIVIDADE DA SUCCINATO DESIDROGENASE E DO COMPLEXO IV DA CADEIA RESPIRATÓRIA EM HIPOCAMPO DE RATOS ADULTOS. ¹Rezin, G. T.; ¹Zanette, F.*; ²Martins, M. R.*; ³Pinho, R. A.; ²Dal Pizzol, F.; ²Quevedo, J. L.; ²Streck, E. L.; ¹Departamento de Farmácia UNESC; ²Medicina, UNESC; ³UNESC

Objetivo:

O metilfenidato (MP) é utilizado no tratamento do transtorno de déficit de atenção/hiperatividade, causado por uma deficiência de dopamina nos centros de controle motor dos gânglios da base, particularmente no estriado. Apesar do uso freqüente desse fármaco, atualmente existem poucas informações sobre os possíveis efeitos do uso continuado do MP, na infância e na idade adulta. Estudos demonstraram que o MP alterou a atividade metabólica em várias regiões do SNC,

medida pela taxa de utilização cerebral de glicose (Biol Psychiatry 1987, 22:126). Além disso, sabe-se que deficiências no funcionamento normal da cadeia respiratória mitocondrial levam a uma rápida queda na produção de energia e à morte celular. O objetivo desse trabalho foi investigar o efeito da administração aguda de MP sobre as atividades de enzimas da cadeia respiratória mitocondrial em hipocampo de ratos adultos.

Métodos e Resultados:

Ratos de 60 dias de idade receberam administrações diárias de solução salina por 13 dias, seguida por uma administração única de solução salina (grupo controle) ou metilfenidato (1, 2, 5, 10 ou 20 mg/kg), no 14^o dia (Neuroreport 2002, 14:769). O hipocampo foi isolado e as atividades da succinato desidrogenase (SDH) e dos complexos II (Clin Chim Acta 1994, 228:35) e IV da cadeia respiratória (Clin Chim Acta 1985, 153:23) foram medidas. Os resultados mostraram que o MP não alterou a atividade do complexo II (Salina: 6.72 ± 1.27 , 1mg/kg: 5.79 ± 0.36 , 2mg/kg: 6.52 ± 0.49 , 5mg/kg: 6.57 ± 1.29 , 10mg/kg: 5.49 ± 0.50 , 20mg/kg: 5.50 ± 1.57 , $p=0.14$, $n=6$). Além disso, verificamos que o MP inibiu a atividade da SDH (Salina: 20.7 ± 3.4 , 1mg/kg: 17.8 ± 2.3 , 2mg/kg: 19.2 ± 2.8 , 5mg/kg: 21.2 ± 3.5 , 10mg/kg: 16.7 ± 1.7 , 20mg/kg: 17.2 ± 2.2 , $p<0.05$, $n=6$) e aumentou a atividade do complexo IV (Salina: 151.4 ± 25.3 , 1mg/kg: 123.3 ± 19.3 , 2mg/kg: 165.3 ± 10.5 , 5mg/kg: 148.8 ± 17.9 , 10mg/kg: 210.0 ± 40.8 , 20mg/kg: 161.8 ± 22.8 , $p<0.01$, $n=4$).

Conclusões:

Os resultados sugerem que o tratamento agudo com MP causou alterações no metabolismo energético no hipocampo de ratos. Mais estudos, em outras estruturas cerebrais e em ratos jovens, são necessários para melhor compreender as alterações neuroquímicas causadas pelo uso desse fármaco.

03.009

EFFECTS OF AVTX 8 ISOLATED FROM *AGELAIA VICINA* WASP VENOM ON GABA NEUROTRANSMISSION IN RAT CEREBRAL CORTEX. ¹Pizzo A. B.; ²Beleboni, R. D. O.**; ²Carolino, R. D. O. G.**; ³Oliveira, L. de**; ⁴Miranda, A.; ²Coutinho-Netto, J.; ⁵Santos, W. F. d.; ¹Departamento de Farmácia e Farmacologia Columbia University; ²Bioquímica FMRP-USP; ³Psicobiologia USP; ⁴Biofísica UNIFESP; ⁵Biologia USP

Objetivo:

Insect venoms are composed of several molecules, highly selective in their action on targets in the central nervous system. It has been shown that they affect neurotransmitter release and/or uptake, and interact with ion channels and receptors. These molecules may provide tools to obtain a better understanding of the function of several neurotransmitter systems. Previously we showed that the denatured crude extract of *Agelaia vicina* wasp venom inhibits glutamate and GABA uptake in rat cerebral cortex synaptosomes.

Here we report the isolation and neurochemical characterization of a new neurotoxin from *A. vicina* wasp venom referred to as AvTx 8, and its effects on GABA neurotransmission using synaptosomes and synaptic membranes from rat cerebral cortex.

Métodos e Resultados:

AvTx 8 was purified by a single-step reverse-phase chromatography procedure. The peptide is composed of 14 amino acid residues with a molecular weight of 1567. Isolated AvTx 8 increased GABA release in synaptosomes by $220 \pm 15\%$, with an effective concentration dose (EC_{50}) of $1.4 \pm 0.13 \mu M$. It also increased GABA release even in the presence of the channel blockers $CdCl_2$, TTX, 4-AP, and TEA. GABA uptake was inhibited by $97 \pm 5\%$ in a dose-dependent manner, with an EC_{50} of $90 \pm 40 nM$ AvTx 8. Detailed kinetic analyses indicate that AvTx 8 is not competing with GABA at the substrate binding site(s) of the GABA transporter. In addition, AvTx 8 decreased GABA binding by $92.6 \pm 1\%$ in synaptic membranes (EC_{50} of $20 \pm 5 nM$).

Conclusões:

AvTx 8 is a novel molecule isolated from the *A. vicina* wasp venom with broad-spectrum effects on the GABA neurotransmission system. Like mastoparan, another major component of wasp venoms, AvTx 8 consists of 14 amino acid residues. Mastoparan has been reported to induce a variety of cellular actions by activating G proteins in several cell types, in particular by inducing calcium release from intracellular stores, probably via activation of PLC and IP3. Our results indicate that

AvTx 8 has a mastoparan-like, high-affinity mode of action on the GABA-neuronic system. We suggest that AvTx 8 may be a useful tool for the investigation of G protein-mediated cell signaling pathways in a wide range of cell types.

03.010

CAPTAÇÃO DE GLUTAMATO EM FATIAS DE CÓRTEX E HIPOCAMPO DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS À CONVULSÃO INDUZIDA PELO METOTREXATO. Leke, R.; Schmidt, A. P.^{**}; Oliveira, D. L. de^{**}; Ávila, T.T.*; Souza, D. O. G.; Wofchuk, S. T.; Portela, L. V. C. Bioquímica ICBS-UFRGS

Objetivo:

O Metotrexato (MTX) é um fármaco utilizado no tratamento de doenças neoplásicas e não neoplásicas. O uso terapêutico do MTX pode levar a diversas reações adversas, inclusive à neurotoxicidade que pode se manifestar através de crises convulsivas. Uma das hipóteses que explicaria este efeito seria o estímulo excessivo de receptores ionotrópicos glutamatérgicos. O objetivo deste trabalho foi verificar se existem alterações na captação do glutamato em fatias de córtex e hipocampo de camundongos após um único episódio convulsivo induzido pelo MTX.

Métodos e Resultados:

Foram utilizados camundongos Swiss machos de 60 dias que receberam uma injeção i.c.v. de 90mg de MTX. Observou-se a ocorrência de convulsões tônico-clônicas durante 10min. Como controle foram utilizados camundongos naive e camundongos nos quais foi injetada solução salina i.c.v. As fatias de córtex e hipocampo foram incubadas por 5min e 7min, respectivamente, a 35°C em meio HBSS contendo [³H] glutamato. A radioatividade foi quantificada por cintilação e a dosagem de proteína foi realizada de acordo com o método de Petersen. Foi constatada a diminuição significativa de 34,13±7,09% da captação de glutamato apenas nas fatias de córtex em relação ao grupo controle (P< 0.01, pelo teste t de Student; n=7).

Conclusões:

Sabe-se que alterações no metabolismo do glutamato podem desequilibrar a homeostasia cerebral e, uma vez estando em altas concentrações na fenda sináptica, este neurotransmissor pode agir como uma excitotoxina. Dessa forma, a diminuição da atividade dos transportadores glutamatérgicos poderia estar relacionada com o desenvolvimento dos episódios convulsivos. Para o melhor entendimento do mecanismo pelo qual o MTX induz as convulsões mais estudos devem ser realizados.

03.011

AÇÃO NEUROPROTETORA DO 17 B-ESTRADIOL: POSSÍVEL ENVOLVIMENTO DOS RECEPTORES ESTROGÊNICOS (ERS) A E B. ¹Frezza, R. L.; ²Cimarosti, H. I.^{**}; ²O'Shea, R.; ²Jones, N.; ¹Horn, A. P.^{**}; ¹Zamin, L. L.^{**}; ¹Nassif, M. C.^{**}; ¹Simão, F.^{**}; ²Beart P.; ¹Salbego, C. G. ¹Bioquímica ICBS-UFRGS ²Howard Florey Institute of Physiology University of Melbourne

Objetivo:

Episódios isquêmicos são caracterizados pela redução total ou parcial do fluxo sanguíneo ao cérebro, resultando em degeneração celular. Estudos ressaltam uma potencial atividade neuroprotetora dos estrógenos. O estradiol pode ativar os receptores estrogênicos nucleares e alterar a atividade do sistema glutamatérgico. Este trabalho tem como objetivo avaliar a expressão de receptores de estrogênio (ERs) α e β e dos transportadores de aminoácidos excitatórios (EAATs)1 e 2 em culturas organotípicas de hipocampo de rato expostas à privação de oxigênio e glicose (POG).

Métodos e Resultados:

Para investigar o efeito neuroprotetor do 17 β -estradiol (E₂) foram utilizadas culturas organotípicas de hipocampo de ratos (Wistar machos 6-8 dias), cultivadas por 14 dias, expostas à POG. O tratamento consistiu na adição de E₂ (10nM) a partir do sétimo dia de cultura, sendo mantido durante a POG (60 min) e durante o tempo de recuperação (24h). O dano celular foi medido pela análise da captação de Iodeto de Propídeo (IP). Foi observado um aumento significativo na incorporação do IP na região de CA1 nas fatias POG (69%±3) em relação às controles (5%±2). As fatias tratadas com E₂ tiveram uma diminuição para 23%±3 na incorporação de IP indicando uma ação neuroprotetora. Análise por *Western Blotting* mostrou que a POG diminuiu a expressão de

ER α (C100 \pm 0; CE₂ 96 \pm 5; POG 81 \pm 5; POGE₂ 79 \pm 5), enquanto que o E₂ aumentou a expressão de ER β (C 100 \pm 0; CE₂ 126 \pm 10; POG 94 \pm 5; POGE₂ 122 \pm 10) em culturas expostas ou não à POG. Nenhuma alteração significativa no imunoconteúdo dos EAAT1 (C 100 \pm 0; CE₂ 111 \pm 8; POG 101 \pm 6; POGE₂ 110 \pm 11) e EAAT2 (C 100 \pm 0; CE₂ 100 \pm 2; POG 101 \pm 5; POGE₂ 102 \pm 4) foi observada em resposta ao tratamento com o E₂ e/ou exposição à POG. (Dados expressos em %Controle \pm EP. ANOVA de uma via e teste de Duncam; n=8, p<0,05).

Conclusões:

Esses resultados sugerem que o 17 β -estradiol, *in vitro*, pode exercer seu efeito neuroprotetor na isquemia através da regulação da expressão de ERs e, conseqüentemente, dos genes transcritos por estes receptores.

03.012

INVESTIGAÇÃO DA NEUROPROTEÇÃO MEDIADA PELA ARCAÍNA E DO POSSÍVEL MECANISMO DE AÇÃO DA ESPERMINA SOBRE ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS INDUZIDAS POR ÁCIDO QUINOLÍNICO. ¹Bellé, N. A. V.; ¹Dalmolin, G. D. ^{**}; ¹Fonini, G. ^{*}; ¹Sinhorin, V. D. G. ^{**}; ¹Rubin, M. A.; ²Mello, C. F. D. ¹Química UFSM; ²Fisiologia UFSM;

Objetivo:

Arcaína (ARC) e espermina (SPM) são poliaminas encontradas em todas as células eucarióticas, inclusive no sistema nervoso central. Uma das funções da SPM é a modulação do receptor glutamatérgico do subtipo NMDA no encéfalo. A ARC, por sua vez, atua como antagonista deste mesmo receptor. Assim sendo, o objetivo deste trabalho foi testar a capacidade neuroprotetora da arcaína, além de investigar um possível mecanismo de ação para o efeito neuroprotetor da espermina sobre as alterações comportamentais induzidas por injeção intraestriatal de ácido quinolínico (AQ), o modelo clássico da doença de Huntington.

Métodos e Resultados:

Ratos wistar machos adultos canulados unilateralmente no estriado dorsal receberam uma injeção de 1 μ L de salina 0,9% ou SPM 10 nmol ou ARC 10 nmol ou 0,5 μ L de SPM 20 nmol + 0,5 μ L de ARC 20 nmol. Quinze minutos após foi realizada uma segunda injeção de 1 μ L de salina 0,9% ou AQ 180 nmol. Os animais foram imediatamente transferidos para um campo aberto para a observação de alterações comportamentais. Os parâmetros utilizados foram número de cruzamentos, respostas de levantar, tempo de limpeza e número de rotações contralaterais. O AQ induziu o aparecimento de rotações contralaterais [20,1 \pm 3,5; F(1,48) = 112,34; P<0,001; n=7] as quais foram significativamente reduzidas pela ARC [12,6 \pm 2,1] e SPM [6,0 \pm 1,2; F(1,48) = 16,43; P<0,001; n=7] per se. Contudo, a co-administração de ARC e SPM não afetou o número de rotações contralaterais induzidas pelo AQ [21,4 \pm 3,7]. Não houveram alterações significativas nos demais parâmetros comportamentais.

Conclusões:

Ambas poliaminas, SPM e ARC, foram capazes de reduzir o número de rotações contralaterais induzidas pela injeção intraestriatal de AQ. No entanto, a co-administração da SPM com a ARC, antagonista do receptor NMDA, mostrou não afetar o número de rotações, sugerindo que o mecanismo de ação da SPM seja através da inibição da condutância dos receptores NMDA.

03.013

CORRELATOS NEUROQUÍMICOS EM ESTRUTURAS LÍMBICAS DO COMPORTAMENTO EXPLORATÓRIO DE RATOS SUBMETIDOS À EXPOSIÇÃO ÚNICA E REPETIDA AO TESTE DO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO. Carvalho, M. C.; Brandão, M. L. Psicologia e Educação FFCLRP-USP

Objetivo:

Analisar os correlatos neuroquímicos em estruturas límbicas de animais expostos uma vez ou duas vezes no labirinto em cruz elevado (LCE) através da análise dos conteúdos das aminas biogênicas, serotonina (5-HT), dopamina (DA) e noradrenalina (NA), por meio da técnica de Cromatografia Líquida de Alta Pressão (HPLC).

Métodos e Resultados:

Grupos independentes de ratos *Wistar* tratados com midazolam (0,5 mg/kg) (M) ou salina (S) expostos uma (S; M) e duas vezes (SS; SM) no LCE foram comparados com um grupo não

exposto (controle-C). Após as sessões, o córtex pré-frontal (CPfr), a amígdala (AM), o hipocampo (HP) e o núcleo *accumbens* (NAc) foram removidos, processados e analisados por HPLC. Os resultados comportamentais confirmam a ausência do efeito ansiolítico do midazolam na 2ª sessão (*one-trial tolerance* – OTT). A análise neuroquímica revelou redução nos conteúdos de 5-HT no CPfr (S:0,69±0,11; M:0,66±0,11; SS:0,70±0,07; SM:0,63±0,11), na AM (S:1,05±0,09; M:1,18±0,14; SS:1,45±0,45; SM:1,46±0,49), no HP (S:0,54±0,07; M:0,54±0,08; SS:0,48±0,04; SM:0,50±0,03) e no NAc (S:1,07±0,12; M:0,87±0,15; SS:2,02±0,62; SM:2,75±0,51), assim como nos conteúdos de DA na AM (S:0,87±0,19; M:1,11±0,12; SS:0,89±0,12; SM:0,74±0,17) em relação ao C. Em todas estruturas analisadas, as taxas de renovação das monoaminas não mostraram-se diferente do grupo C.

Conclusões:

As exposições ao LCE causaram redução do conteúdo de 5-HT em todas estruturas estudadas. Apenas na AM houve redução do conteúdo de DA. Os efeitos neuroquímicos foram mais evidentes na AM, reforçando sua importância na detecção e avaliação de estímulos e na expressão de comportamentos defensivos induzidos por estímulos aversivos do LCE. O midazolam não reverteu as alterações no conteúdo monoaminérgico. Os efeitos dos benzodiazepínicos não parecem relacionados com a transmissão destas aminas nestas estruturas.

03.014

DISTRIBUIÇÃO HETEROGÊNEA DE RECEPTORES A1 DE ADENOSINA NO NÚCLEO DO TRATO SOLITÁRIO DE RATOS HIPERTENSOS DURANTE O DESENVOLVIMENTO. RELAÇÃO COM O APARECIMENTO DA HIPERTENSÃO? Carrettiero, D. C.; Fior-Chadi, D.R.; Fisiologia IB-USP

Objetivo:

O presente trabalho tem como objetivo avaliar a distribuição dos receptores A1 de adenosina (A1REC) no núcleo do trato solitário (NTS) de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e Wistar Kyoto (WKY) durante o desenvolvimento.

Métodos e Resultados:

Ratos machos SHR e WKY de 1, 15, 30 e 90 dias (d) foram decapitados, seus encéfalos congelados e seccionados em criostato. Foram retiradas secções de 5 níveis rostro-caudal do bulbo, submetidas a radioautografia (ligante [³H]DPCPX), expostas a filme radiosensível e analisadas quantitativamente. No NTS de ambas as linhagens os subnúcleos subpostremal (SubPM) e dorsolateral (SolDL) apresentaram marcação mais intensa dos A1REC. Os animais apresentaram aumento na intensidade de marcação durante o desenvolvimento em ambos os subnúcleos em todos os níveis analisados (dos 5 níveis analisados, representaremos aqui, somente o nível de bregma intermediário, -13.80mm, de ratos de 1 e 90 d) SolDL, 174,0±8,6 (1d) e 412,8±15,4 (90d) para SHR e 174,8±12,4 (1d) e 365,8±15,3 (90d) para WKY; SubPM, 156,2±9,3 (1d) e 325,9±9,2 (90 d) para SHR e 149,0±11,5 (1d) e 274,1±12,1 (90d) para WKY. A marcação diminui em SolDL e aumenta em SubPM nos diferentes níveis analisados em sentido rostro-caudal em todas as idades, estando aumentada em SHR quando comparada aos WKY de 90d. SolDL, rostral, 519,9±17,0 (SHR) e 455,9±16,7 (WKY), caudal, 319,4±17,8 (SHR) e 269,8±14,8 (WKY); SubPM, rostral, 211,2±14,6 (SHR) e 130,7±6,8 (WKY), caudal, 431,9±19,2 (SHR) e 376,8±16,2 (WKY). Essa diferença na intensidade da marcação entre as linhagens começa a aparecer já em 15 dias. SolDL, rostral, 432,4±18,8 (SHR) e 371,6±14,7 (WKY); SubPM, caudal, 304,1±16,0 (SHR) e 229,4±14,9 (WKY). Valores em fmol/mg de proteína.

Conclusões:

Ambas as linhagens possuem uma distribuição heterogênea de A1REC no NTS, bem como durante o desenvolvimento. Essa distribuição está alterada nos ratos hipertensos em fase precoce do desenvolvimento, podendo estar associada às alterações que antecedem o desenvolvimento da hipertensão arterial nestes animais.

03.015

BASIC FIBROBLAST GROWTH FACTOR IMMUNOREACTIVITY IN NEURONS AND SATELLITE CELLS OF THE MYENTERIC PLEXUS OF THE RODENT ILEUM. Levy, B. D. F. A.; Carvalho, B. F*; Cunha; J. C*; Chadi; G. Anatomia ICB III-USP

Objective: The enteric nervous system consists of a number of interconnected networks of neuronal cell bodies and fibers as well as satellite cells, the enteric glia. Basic fibroblast growth factor (bFGF, FGF-2) is a mitogen for a variety of mesodermal and neuroectodermal-derived cells and its presence has been described in many tissues. The present work employs immunohistochemistry to analyze bFGF immunoreactivity in neurons and glial cells in the rat and mouse iliac enteric plexus.

Methods and Results: Adult male pathogen-free Wistar rats and C57BL/6J mice from the Institute of Biomedical Sciences (São Paulo, Brazil) were processed for immunohistochemistry; the distal ileum was opened and its myenteric plexus was processed as whole-mount preparations. The membranes were immunostained for visualization of FGF-2 and glial fibrillary acidic protein (GFAP). FGF-2 immunoreactivity was observed in the majority of the neurons and satellite cells of the enteric ganglia of the ileum. GFAP-immunoreactive enteric glial cells and their processes were present in the iliac enteric plexus surrounding neuronal cell bodies and axons. A dense net of GFAP-immunoreactive processes was seen in the ganglia and connecting strands of the myenteric plexus. The two-color immunofluorescence method revealed bFGF immunoreactivity in GFAP-positive enteric glial cells.

Conclusion: The results suggest that the presence of FGF-2 in neuron and satellite cells of the myenteric plexus of the rodent ileum may be related to autocrine and paracrine actions of the molecule in the enteric nervous system.

03.016

EFEITO DIFERENCIAL DA ATIVAÇÃO DE RECEPTORES NMDA OU KAINATO NA SÍNTESE DE ÓXIDO NÍTRICO E LIBERAÇÃO DE L-CITRULINA. ¹Cossenza, M.; ²Coutinho, R. N.; ²Cadilhe, D. V. **; ²Paes-de-Carvalho, R.; ¹Biofísica UFRJ; ²Neurobiologia UFF

Objetivo:

A formação de L-citrulina (Cit) a partir da L-arginina (Arg) no sistema nervoso central tem sido relacionado à atividade da enzima sintase do óxido nítrico (NOS). Tanto em tecido intacto como em culturas, este procedimento pode representar um somatório de eventos que mascarem a função direta da NOS. Dois processos são relacionados a esta abordagem: 1)A participação de um sistema que libere a Cit para o meio extracelular; 2)O metabolismo de Cit. Em trabalhos anteriores foi demonstrada a participação de receptores NMDA na inibição de síntese protéica aumentando a Arg disponível para a síntese de óxido nítrico (NO).

Métodos e Resultados:

Em culturas de retina de embrião de pinto a captação de Arg foi reduzida na presença de cicloeximida (CHX, um inibidor de síntese protéica) em vários tempos (32,3±9,4% do controle no equilíbrio) e na ausência de sódio (9,0±0,6% do controle). Apesar desta redução, as concentrações intracelulares de Arg aumentaram cerca de 600% enquanto que em ensaios de incorporação em proteínas, a Arg reduziu para 1,6±0,4% do controle. Experimentos de medida da Cit revelaram um aumento de 283,9±10,6% para o extracelular e 190,9±31,6% para o intracelular, quando a CHX estava presente. Foi verificada a participação dos receptores glutamatérgicos na síntese e liberação da Cit na presença ou ausência de CHX. Kainato (Kai), NMDA, Glutamato (Glu) estimularam o efluxo em 36,8±4,3%, 54,1±1,5% e 118,9±25,38%, respectivamente; na presença de CHX os estímulos foram de 111,8±7,2%, 20,7±1,1% e 153,3±8,3%. Observou-se que Kai ou Glu não são capazes de promover acúmulo de Cit intracelular, enquanto que NMDA aumentou em 154,1±1,5% na ausência de CHX e 120,8±1,1% na presença de CHX. A ausência de sódio inibiu o estímulo de liberação de Cit por todos os agonistas.

Conclusões:

Nossos resultados indicam que a inibição da síntese protéica aumenta a síntese de NO por disponibilizar maiores concentrações de Arg. Enquanto o receptor NMDA promove ativação da NOS e disponibilização de Arg, o receptor de Kai estaria envolvido na liberação da Cit para uma possível reciclagem extracelular.

03.017

INOCULATION OF SCHWANN CELLS PRE TREATED OR NOT WITH INFLAMMATORY CYTOKINES IN THE CONTUSE LESIONED RAT SPINAL CORD PROMOTED BY THE NYU IMPACTOR ALTERS THE OPEN FIELD MOTOR SCORE (BBB). ¹Guzen, F. P.; ¹Taneda, M*; ¹de

Luca, B.A.*; ¹Cunha, J.C.*; ²Andrade, M. S. R. D.**; ¹Gomide, V. C.**; ¹Chadi, G. ¹Anatomia ICB III-USP; ²Anatomia Animais Domésticos USP

Objetivo:

Schwann cells (SC) plays an important role in neuronal regeneration due the production of neurotrophic molecules, that influence the fibers growth after injury. Inflammatory cytokines induce the mitogenic activity in SC and participate in various nervous system events, contributing for neuronal survival and growth. The aim of the present study was to investigate whether the transforming growth factor beta 1 (TGF- β 1) or tumor necrosis factor alpha (TNF- α) can modify the open field motor score (BBB) spinal cord lesioned of rats by the NYU Impactor.

Métodos e Resultados:

Primary cultured SC were pre-treated with TGF- β 1 (5ng/ml) or TNF- α (30ng/ml) for 30 min or not. Young rats were submitted to a laminectomy (T10-11) and spinal cord received a moderate contuse lesion by means of a 25 cm drop of a 10 g rod promoted by the Impactor. Sham animals received laminectomy without cord lesion. Lesioned rats received injections of SC, with or without pre-treatment with TGF- β 1 or TNF- α . A volume of 10 μ l SC (100,000 to 150,000/ μ l of cultured medium) was injected stereotaxically in the epicenter of the cord lesion immediately after injury. Sham rats received local injection of culture medium alone. The functional recovery of the hindlimbs of the rats was accessed througha open field motor score (BBB) during 8 weeks.

Impactor parameters demonstrated the moderate contuse lesion applied in the spinal cord. The BBB showed higher scores in the rats treated with SC alone 1 week after surgery as well at the 4th, 5th, 6th, 7th and 8th weeks post injury compared with the lesioned rats that were not treated with SC. In the lesioned rats that have received SC pre-treated with TGF- β 1 or TNF- α the BBB presented higher scores only at 2 weeks time-interval.

Conclusões: It is concluded that SC inoculation in contuse lesioned spinal cord improves hindlimb motor function. The manipulation of the SC in order to increase the ability of the cells to promote functional recoveryin spinal cord lesioned animal needs to be further investigated.

03.018

S-100 IMMUNOREACTIVITY IS INCREASED IN WHITE AND GRAY MATTERS OF THE CONTUSE LESIONED RAT SPINAL CORD. Cunha, J. C.; Levy B. F. A.*; Andrade, M. S. R.**; Chadi, G.; Anatomia ICB III-USP

Objective: Astrocytes in the central nervous system produce S-100 protein, which is up-regulated after injury. It has been showing that the macromolecule helps to protect and to maintain neurons from neurodegeneration. Here, we analyzed S-100 expression in the contuse lesioned rat spinal cord promoted by the NYU Impactor.

Methods and Results: Adult male Wistar rats (n=6) were submitted to a moderate degree of spinal cord contuse lesion. A 10g rod was dropped to the dorsal surface of the exposed spinal cord from distances of 25 mm. Another group of rats (n=4) were submitted to sham operation at T10-11 level. After 2 or 3 weeks, animals were sacrificed and their spinal cords sectioned, and processed for immunohistochemistry. S-100 immunoreactivity was detected by the avidin-biotin peroxidase technique and quantified by means of semiquantitative morphometric and microdensitometric image analysis. A strong S-100 reaction was observed bordering the lesioned site, in the region of the glial scar. Furthermore, S-100 immunoreactive cell profiles were also found to be elevated in the entire gray and white matters of the preserved tissue in cranial and caudal levels near the lesion. The S-100 immunoreactive profiles were very similar to astrocytes showing a cell body and cell processes. S-100 reaction was seen in putative activated astrocytes. In the sham operated rats, S-100 reaction was detected only in the posterior funiculus close to the region of the laminectomy. The responses were seen 2 weeks after the lesion, being maintained by 3 weeks.

Conclusion:

The expression of S-100 in different regions of the lesioned spinal cord may be related to the formation of a glial scar close to the lesion and also to paracrine neurotrophic responses far from injury.

03.019

ORGANOCALCOGÊNIOS DIMINUEM A CAPTAÇÃO DE GLUTAMATO EM FATIAS DE CÓRTEX DE RATOS: REVERSÃO POR GLUTATIONA. ¹Thomazi, A. P.; ²Moretto, M. B.; ¹Graça Godinho*; ¹Roessler, T. M.*; ³Zeni, G.*; ¹Souza, D. O. G. de; ¹Wofchuk, S. T.; ³Rocha, J. B. T. da; ¹Bioquímica ICBS-UFRGS; ²Análises Clínicas e Toxicológicas UFSM; ^{5,8}Química, UFSM;

Objetivo:

Formas orgânicas do selênio e telúrio têm sido relatadas por diversos investigadores como potentes agentes terapêuticos; entretanto, compostos inorgânicos e orgânicos do telúrio são altamente tóxicos para o SNC de roedores. A proposta deste estudo foi investigar um possível envolvimento do sistema glutamatérgico na toxicidade dos organocalcogênios em fatias de córtex de ratos de 12 e 60 dias, considerando que é importante analisar a captação de glutamato durante o desenvolvimento e envelhecimento.

Métodos e Resultados:

Fatias de córtex de ratos de 12 e 60 dias foram incubadas com três organocalcogênios diferentes na presença ou ausência de glutatona reduzida (GSH). Os resultados indicaram que 100uM de ebselen (12d: 0,69 ±0,11; 60d: 0,68 ; 40,0 ± n=6), difenil-ditelurito Ph(Te)₂ (12d: 0,53 ± 0,11; 60d: 0,57 ; 21,0 ± n=6) e difenil-diselenito Ph(Se)₂ (12d: 0,66 ± 0,18; 60d: 0,63 ; 50,0 ± n=6) levaram à diminuição da captação de [³H] glutamato em fatias de córtex de ratos em ambas as idades analisadas. Quando 100uM de GSH foi adicionado, esta foi capaz de reverter a ação causada pelo Ph(Te)₂ (0,91 ; 32,0 ± n=6), mas não sobre os demais organocalcogênios, em animais de 60 dias. Em fatias de córtex de ratos de 12 dias, GSH não reverteu a diminuição da captação causada pelos organocalcogênios.

Conclusões:

Observamos neste estudo que a GSH só foi capaz de reverter a inibição da captação de glutamato causada pelo Ph(Te)₂ e sugerimos que a inibição causada por estes compostos pode ser via ação direta na proteína transportadora deste aminoácido, o que pode ocorrer devido à modulação redox dos aminoácidos reativos dessas proteínas, demonstrando diferentes efeitos dos organocalcogênios sobre a modulação do sistema glutamatérgico.

03.020

FIBRAS IMUNORREATIVAS AO PEPTÍDEO CART INERVAM OS NEURÔNIOS DA ÁREA PRÉ-ÓPTICA QUE EXPRESSAM O RNAM DO MCH DURANTE A LACTAÇÃO. Rondini, T. A.; Bittencourt, J. C.; Elias, C. F.; Anatomia ICB III-USP

Objetivo:

A relação entre a disponibilidade de alimentos e a fertilidade e/ou o comportamento reprodutivo já é bem estabelecido uma vez que, no caso da fêmea, uma enorme quantidade de energia disponível é necessária durante a gravidez e a amamentação. Estudos têm demonstrado que durante a lactação, o hormônio concentrador de melanina (MCH) é expresso em neurônios do núcleo pré-óptico medial (MPO). Esta área recebe densa inervação de fibras imunorreativas ao peptídeo transcrito regulado pela cocaína e anfetamina (CART). Ambos neuropeptídeos têm sido relacionados com o comportamento alimentar. O objetivo deste estudo é investigar a relação entre os peptídeos mencionados e a origem das fibras imunorreativas ao CART (CART-ir) que inervam o núcleo MPO.

Métodos e Resultados:

Foram utilizadas ratas Sprague-Dawley no 19º dia de lactação (n=4), e fêmeas com implante de traçador retrógrado Fluorogold (FG) (n=18). Os encéfalos foram cortados em micrótomo de congelação (30µm). Uma série de cada fêmea lactante foi submetida à dupla marcação com hibridação *in situ* utilizando sonda marcada com digoxigenina para observação de células que expressam o RNAm do prepro MCH e à imunistoquímica com o anticorpo anti-CART para observação de fibras CART-IR. Nos casos com injeção de traçador, realizamos a imunistoquímica com anticorpo conjugado ao fluoróforo Cy3 para visualizar o peptídeo CART e a autofluorescência do FG, para identificar as células retrogradamente marcadas. Observamos uma moderada quantidade de neurônios duplamente marcados na área retroquiasmática (RCA) e no arqueado (Arc) e uma maior quantidade no núcleo pré-mamilar ventral (PMv).

Conclusões:

Nossos resultados sugerem que neurônios CART-ir do núcleo Arc e PMv podem modular a expressão do RNAm do MCH na MPO. Estes neurônios colocalizam o receptor de leptina, e podem, portanto, sinalizar aos neurônios MCH o estado nutricional do animal.
FAPESP: 03/01096-0, 03/06022-4.

03.021

DESSENSIBILIZAÇÃO DE RECEPTORES PARA PACAP EM CÉLULAS RETINIANAS DE GALINHAS. Henze, I. P.; Fleming, R. L.*; de Mello M. C. F.; de Mello, F. G.; Biofísica CCS-UFRJ

Objetivo:

Receptores de PACAP encontram-se expressos na retina de galinha desde os estágios iniciais do desenvolvimento embrionário, mantendo-se constantes até períodos equivalentes a animais adultos. Entretanto, a resposta de células da retina ao PACAP, em termos de aumento de AMPc, é alta nos estágios iniciais do desenvolvimento, decaindo durante a diferenciação do tecido. Neste trabalho investigamos a possibilidade de que o decréscimo da resposta ao PACAP em função da diferenciação do tecido retiniano se deva ao desacoplamento entre o receptor de PACAP e a adenilil ciclase.

Métodos e Resultados:

Retinas de galinha de nove dias embrionários (E9) eram mantidos em culturas por 12 e 24 horas na presença de 10nM de PACAP 38. Durante o tempo de incubação eram dados pulsos adicionais de PACAP. Em seguida os explantes eram lavados para remover o agonista e o tecido era estimulado por 15 minutos com PACAP e o teor de AMPc era medido. O tecido controle (não tratado) apresentava um acúmulo de AMPc de cerca de 10 vezes maior que o basal quando estimulados por PACAP. Retinas incubadas cronicamente com o peptídeo mostraram uma resposta reduzida ao PACAP (estímulo agudo), mostrando uma dessensibilização dos receptores do peptídeo. Para verificar se a dessensibilização natural ocorrida ao longo da diferenciação do tecido retiniano poderia ser bloqueada, retinas de galinha de 14 dias embrionários (E14) foram incubadas por 48 horas em cultura na presença de 100 µM do antagonista de receptores para PACAP (PACAP 6-38). Em seguida os explantes eram lavados e estimulados por 15 minutos com PACAP 38, e o AMPc era então medido. O tecido tratado apresentava um aumento no acúmulo de AMPc quando comparado com retinas controle, mostrando que houve um bloqueio da dessensibilização natural do tecido diferenciado.

Conclusões:

Nossos dados mostraram pela primeira vez que receptores de PACAP apresentam o fenômeno de dessensibilização quando expostos cronicamente a concentrações do peptídeo. O processo de dessensibilização natural, ocorrido provavelmente em idades mais diferenciadas de retinas de galinha, pode ser bloqueado após uso crônico de antagonistas de receptores de PACAP.

03.022

THE EXPRESSION OF SUBSTANCE P MRNA IN THE RAT SPINAL CORD SUBMITTED TO A CONTUSION LESION. Andrade, M. S. R. D.; Chadi, G.** Anatomia ICB III-USP

Objetivo:

The neuropeptide substance P is a neurotransmitter in the central nervous system. The molecule also participates in the neuroplasticity of the spinal cord, especially after injury.

Métodos e Resultados:

Adult rats were submitted to a moderate spinal cord injury by dropping a 10g rod (25mm distance) using the NYU Impactor (*Lesion Group*). A group of rats was submitted to a sham operation (*Sham Group*). The animals were sacrificed 3, 7 or 45 days after the surgery and their spinal cords removed. The substance P mRNA signal was achieved in the spinal cord by means of radioactive *in situ* hybridization and quantified using microdensitometric analysis (optical density). The expression of substance P mRNA signal was increased in anterior horn at thoracic level close to the lesion epicenter [0.047 ± 0.013 (*Sham*) and 0.119 ± 0.022 (*Lesion*), $p < 0.05$] 45 days after spinal cord injury. At high thoracic level, the signal in central intermediate gray matter was decreased 7 days post lesion [0.254 ± 0.014 (*Sham*) and 0.154 ± 0.025 (*Lesion*), $p < 0.05$], but was increased 45 days after spinal cord injury [0.049 ± 0.009 (*Sham*) and 0.135 ± 0.03 (*Lesion*), $p < 0.05$]. A 24% increase was

found in laminae IV of the posterior horn at cervical level after 45 days of contusion and a 34% increase was observed in laminae I and II of the gray matter at thoracic level by 3 days.

Conclusões:

Substance P is synthesized in the spinal cord and may be involved in the local plasticity after lesion.

03.023

PROTEOMICS OF NON-STEROIDAL ANTI-INFLAMMATORY DRUG AND ALZHEIMER'S Disease. ¹Costa, H.; ²Dolios, G.; ²Wang, R. ¹Ginecologia UNIFESP; ²Human Anatomy and Genetics EUA

Objetivo:

Increased A β ₄₂ accumulation, aggregation, and deposition in brain are key events in the pathogenesis of Alzheimer's disease (AD). Epidemiological studies and biochemical studies showed that A β ₄₂ was reduced by treatment with a subset of NSAIDs. However, the molecular mechanisms whereby NSAIDs inhibit A β ₄₂ generation, as well as the target protein of NSAIDs to modulate γ -secretase activity, still remain unclear. To explore the cellular functions of NSAIDs and to understand the molecular basis of how NSAIDs alter the ratio of A β ₄₂/A β ₄₀, we conducted a proteomic study.

Métodos e Resultados:

Mouse neuroblastoma cells (N2a) were treated with Ibuprofen in a concentration range corresponding to clinical prevention doses. Effect of this NSAID on A β peptide profiles was analyzed by immunoprecipitation/mass spectrometry using monoclonal anti-A β antibodies and MALDI-TOF-MS. Cellular proteome was analyzed by 2-D gel electrophoresis (2D-GE). Spots representing proteins that were up- or down-regulated by the Ibuprofen treatments were excised and subjected to in-gel tryptic digestion. The tryptic digests were analyzed by liquid-chromatography electrospray ionization MS/MS (LC-ESI-MS/MS) using Finnigan LCQ ion trap mass spectrometer. The resulting MS/MS data was submitted to protein identification using a database searching program, Sonar, and the non-redundant NCBI database.

Conclusões:

In our experiment, we used neuronal-like cells, mouse neuroblastoma (N2a) cells stably transfected with wild type human APP695 cDNA (N2a/APP695). Previous studies of NSAIDs treatments on the N2a cells using immunoprecipitation/mass spectrometry (IP/MS) further confirmed that several tested NSAIDs can reduce the level of A β ₄₂ without effect on A β ₄₀. However, a different observation from previous studies was that A β peptide level was also affected as the concentration of Ibuprofen increased. It demonstrated that different cells have different sensitivities to NSAID treatment. Analysis of cell lysates by 2D-GE showed 980 spots, where 42 spots were up-regulated and 31 were down-regulated by the treatment of Ibuprofen. Several classes of proteins were identified that were affected by NSAIDs treatment, including stress related proteins.

03.024

A ADMINISTRAÇÃO *IN VIVO* DE EBSELEN AFETA A HIDROLISE DE NUCLEOTÍDEOS DA ADENINA EM FÁTIAS DE HIPOCAMPO EM RATOS ADULTOS. ¹Ghisleni, G. C. ^{**}; ²Bruno, A. N. ^{**}; ²Böhmer, A. E.; ³Ayub, M.*; ²Sarkis, J. J. F.; ¹Rocha, J. B. T. da; ²Souza, D. O. G. ¹Bioquímica IQ-UFSM; ²Bioquímica ICBS-UFRGS; ³Bioquímica ICBS-IB

Objetivo:

O ebselen é um composto orgânico de selênio com propriedade antioxidante e ação antiinflamatória. Este composto foi descrito pelos seus efeitos neuroprotetores sob processos de injúrias celulares, bem como pelos seus efeitos tóxicos quando administrados em altas concentrações. Muitas situações patológicas também desencadeiam efeitos neuroprotetores via modulação do sistema purinérgico. O neurotransmissor ATP é hidrolisado até a estrutura neuromoduladora adenosina via ecto-enzimas presentes em sistema nervoso central. Este estudo pretende investigar o efeito do ebselen sobre a produção enzimática de adenosina extracelular em fatias hipocámpais de ratos adultos.

Métodos e Resultados:

Para isto, ratos adultos receberam uma única injeção intraperitoneal de ebselen 10, 25, 50 e 75µmol/kg e foram sacrificados 48 horas após a injeção. Os hipocampus foram removidos e fatiados. A liberação de Pi foi dosada pelo método de Chan et al (Anal. Biochem., 157: 375-80, 1986) e a concentração de proteína pelo método de Bradford (Anal. Biochem., 72: 218-254, 1976). Nossos resultados demonstraram que ratos tratados com ebselen apresentaram uma ativação significativa de 51%, 36% e 33% na hidrólise de AMP nas doses de 25, 50 e 75µmol/kg, respectivamente (n=5;p<0,005). Não houve ativação significativa na hidrólise de ADP e ATP nos ratos submetidos ao mesmo tratamento (n=5;p>0,05).

Conclusões:

A ativação da hidrólise de AMP em resposta a administração de ebselen pode representar um mecanismo adicional pelo qual baixas concentrações deste composto apresentam propriedades neuroprotetoras. Em contraste, a resposta enzimática frente à administração de doses mais elevadas deste composto, pode significar a presença de um mecanismo compensatório para evitar a neurotoxicidade induzida por estas concentrações.

03.025

MECANISMOS GLUTAMATÉRGICOS ENVOLVIDOS NA MODULAÇÃO DA FOSFORILAÇÃO DA GFAP EM BULBO OLFATÓRIO DE RATOS. ¹Boff, B.; ¹Battu, C. E. ^{**}; ¹Godinho, G.*; ²Kommers, T. C.; ¹Gonçalves, C. A. S.; ¹Wofchuk, S. T.; ¹Bioquímica ICBS-UFRGS; ²Bioquímica ICBS-Centro Universitário Lasalle

Objetivo:

A modulação da fosforilação da proteína ácida fibrilar glial (GFAP) consiste em um importante mecanismo de regulação do desenvolvimento do SNC. Mostramos em nosso laboratório que o glutamato regula o nível de fosforilação da GFAP em diferentes estruturas do SNC durante o período sinaptogênico. Trabalhos anteriores mostraram que o glutamato aumenta significativamente o nível de fosforilação da GFAP em fatias de hipocampo de ratos jovens através de um mecanismo envolvendo receptores glutamatérgicos metabotrópicos do grupo II, subtipo mGluR3. Em cerebelo, o glutamato também estimula a fosforilação da GFAP, entretanto, o mecanismo envolve receptores glutamatérgicos ionotrópicos do tipo NMDA. Neste trabalho temos o objetivo de analisar o perfil ontogenético da fosforilação da GFAP e qual receptor está envolvido.

Métodos e Resultados:

Foram utilizadas fatias de BO de ratos Wistar (P15-P21-P60) marcadas com ³²P e incubadas na presença de glutamato 1mM ou agonistas glutamatérgicos ionotrópicos e metabotrópicos. Após a incubação as amostras foram analisadas por eletroforese bidimensional e os géis expostos a filmes autorradiográficos, os quais foram quantificados pelo programa Optiquant e a análise estatística foi feita pelo teste T pareado de Student e ANOVA. Os resultados obtidos mostraram que o glutamato, assim como em hipocampo e cerebelo, estimula a fosforilação da GFAP em fatias de BO de ratos P15 (P15 112,6278±3,6711; P21 98,1907±5,7062; P60 99,9432±3,4609). O mecanismo envolvido, à semelhança do cerebelo, é via receptores NMDA, já que apenas este agonista aumentou a fosforilação da GFAP no mesmo nível que o glutamato (glu 112,6278±3,6711; ACPD 103,4922±3,9938; AMPA 82,1225±9,8874; KAI 81,7154±9,7225; NMDA 112,7005±2,6297; glu+AP5 98,5±4,13). Na idade correspondente ao desmame e no animal adulto, o glutamato não teve efeito.

Conclusões:

Estes dados reforçam o papel exercido pelo glutamato na modulação da fosforilação da GFAP, a qual exerce papel fundamental na estruturação do citoesqueleto durante o período de intensa proliferação sináptica e glial.

03.026

POSSÍVEL ENVOLVIMENTO DE RECEPTORES NICOTÍNICOS DE ACETILCOLINA E GLUTAMATÉRGICOS DO TIPO NMDA NA FISIOPATOLOGIA DA DEGENERAÇÃO MUSCULAR NA DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE. ¹D'Elia, L.*; ¹Stutz, B.*; ²Corrêa-Leite, P. E. ^{**}; ²Quirico-Santos, T.; ¹Yamasaki, E.N. ¹IBCCF-UFRJ; ²Instituto Biologia UFF

Objetivo:

A Distrofia Muscular de Duchenne é caracterizada pela ausência ou baixos níveis da proteína distrofina, resultando em uma extensa degeneração muscular. Altos níveis de cálcio intracelular parecem estar envolvidos nesse fenômeno. Neste trabalho procuramos investigar o possível envolvimento dos receptores nicotínicos de acetilcolina, especificamente da subunidade alfa 7; e glutamatérgicos do tipo NMDA na fisiopatologia da degeneração muscular.

Métodos e Resultados:

Cortes transversais e homogeneizados de músculo gastrocnêmio, de camundongos machos mdx e controle C57BL10/J de 4-6 semanas, foram utilizados para as técnicas de imunocitoquímica e Western blot. Os anticorpos contra a subunidade alfa7 do receptor colinérgico e a subunidade NR1 do receptor de NMDA foram revelados por avidina-biotina-peroxidase ou quimioluminescência.

Encontramos um aumento na expressão das subunidades alfa 7 do receptor nicotínico de acetilcolina e NR1 do receptor NMDA por imunocitoquímica em cortes transversais de músculo gastrocnêmio de animais mdx, assim como, de suas proteínas, pelo método de Western blot.

Conclusões:

O aumento observado na expressão dos receptores nicotínicos formados por subunidades alfa7 e receptores glutamatérgicos do tipo NMDA poderia contribuir para a fisiopatologia da degeneração muscular observada na DMD. Esses receptores permeiam íons cálcio e a consequência de sua ativação seriam níveis ainda maiores de cálcio intracelular.

03.027

EFEITO DA DEXAMETASONA E DA MIFEPRISTONA (RU38486) SOBRE A PROLIFERAÇÃO CELULAR EM LINHAGEM DE GLIOMA C6 DE RATO. ¹Bavaresco, L.*; ¹Bernardi, A.**; ²Barreto-Chaves, M. L.; ¹Sarkis, J. J. F.; ¹Battastini, A. M. O.; ¹Bioquímica ICBS-UFRGS; ²Anatomia USP

Objetivo:

A dexametasona é um glicocorticoide sintético utilizado como adjuvante na quimioterapia de gliomas para diminuir o edema causado pelo tumor no cérebro. Este fármaco pode reduzir a eficácia do tratamento com quimioterápicos por impedir a morte das células neoplásicas via apoptose. A mifepristona é um importante antagonista dos receptores de glicocorticóides. Assim, o objetivo deste trabalho é investigar o efeito da dexametasona e da mifepristona sobre a proliferação celular em linhagem de glioma C6 de rato.

Métodos e Resultados:

Monocamadas de células C6 foram mantidas em meio de cultivo DMEM suplementado com 5% de SFB e tratadas por 24, 48 e 72h com concentrações variadas de dexametasona (0,001 a 10,0µM). A proliferação celular foi avaliada através da contagem de células em hemocitômetro. A dexametasona inibiu a proliferação celular de uma maneira dose e tempo dependente. Para verificar o efeito da mifepristona sobre a proliferação celular, procedeu-se o tratamento com 10µM de mifepristona trinta minutos antes da adição de dexametasona na concentração de 1µM durante 48h. O tratamento com dexametasona 1µM causou uma inibição da proliferação de 30% +/- 3.9(n=3), a qual foi revertida pelo tratamento com RU38486 passando a 12% +/-3.14 (n=3).

Conclusões:

O pré-tratamento com RU38486 impediu o efeito inibitório da dexametasona sobre a proliferação celular na linhagem de glioma C6. Isto sugere que o processo de inibição da proliferação celular causada pela dexametasona é desencadeado via receptores de glicocorticóides. Portanto, mais estudos são necessários para melhor avaliar os efeitos da dexametasona na terapia dos gliomas, uma vez que mesmo podendo reduzir a eficácia de alguns quimioterápicos, esta droga também têm um efeito antiproliferativo nestas células.

03.028

EFEITO ANTIDEPRESSIVO DA ADMINISTRAÇÃO CENTRAL (I.C.V) DE AGMATINA ASSOCIADA COM FLUOXETINA EM MODELOS ANIMAIS DE DEPRESSÃO. Souza, D.G.; Felisbino, C.S.**; Almeida, R.C.**; Soletti, R. C.**; Rodrigues, A. L. S.; Gabilan, N. H.; Bioquímica CCB-UFSC

Objetivo:

A agmatina tem sido considerada como um neurotransmissor/neuromodulador endógeno. Este composto produziu um efeito antidepressivo em modelos animais de depressão, reduzindo o tempo de imobilidade no teste do nado forçado (TNF) (NeuroReport, 13:387. 2002). O objetivo deste trabalho foi verificar: i) o efeito antidepressivo produzido pela administração central (i.c.v.) da agmatina e da fluoxetina (um antidepressivo conhecido e utilizado na terapêutica); ii) um possível efeito sinérgico da associação de agmatina com fluoxetina, utilizando o TNF em camundongos.

Métodos e Resultados:

Camundongos (n = 6-8/animais/grupo) foram injetados (via i.c.v.) com salina (controle), agmatina (0,1 e 10 nmol/sítio) ou fluoxetina (0,1; 3; 10 e 30 nmol/sítio). Após 15 minutos, os animais foram submetidos ao TNF, para avaliar o tempo de imobilidade durante 6 minutos. A redução do tempo de imobilidade foi expressa em relação ao tempo dos animais controles (100%). A administração de agmatina (10 nmol/sítio) e fluoxetina (3 nmol/sítio) provocaram uma redução significativa do tempo de imobilidade de 30 ± 2 e 35 ± 5 %, respectivamente, em relação aos animais controle. A co-administração (via i.c.v.) de doses sub-ativas de agmatina (0,1 nmol/sítio) e fluoxetina (0,1 nmol/sítio) também produziu um efeito antidepressivo, reduzindo significativamente o tempo de imobilidade em 23 ± 2 %. Entretanto, a associação de agmatina (dose ativa, 10 nmol/sítio, via i.c.v.) com posterior injeção de fluoxetina (dose ativa, 32 mg/kg, via i.p.) não mostrou efeito aditivo na redução do tempo de imobilidade no TNF.

Conclusões:

A administração (via i.c.v.) de agmatina e fluoxetina provocou um efeito antidepressivo. A co-administração (via i.c.v.) destes compostos em doses sub-ativas mostrou um efeito sinérgico. A associação de doses ativas de agmatina (via i.c.v.) e de fluoxetina (via i.p.) não mostrou um efeito aditivo, sugerindo que estes compostos atuam através do mesmo mecanismo.

03.029

AUMENTO DA LIBERAÇÃO DE [³H]GABA E DA EXPRESSÃO DA GAD EM RETINAS DE EMBRIÕES DE PINTO TRATADAS CRONICAMENTE COM ETANOL. ¹Guimarães, F. P.; ²D'Elia, L.*; ²Reis, R. A. M.; ²Yamasaki, E. N. ¹Análises Clínicas UFRJ; ²IBCCF-UFRJ

Objetivo:

Etanol é uma droga largamente consumida que modula sinapses gabaérgicas e glutamatérgicas no SNC. GABA é o principal neurotransmissor inibitório que interage com receptores ionotrópicos e metabotrópicos, sendo sintetizado pela Glutamato Descarboxilase (GAD). Nesse trabalho investigamos marcadores gabaérgicos de embriões de pinto tratados com etanol

Métodos e Resultados:

Embriões de pinto com 11 dias (E11) foram injetados com 300 μ L de solução salina (PBS) ou etanol (10% em PBS), e esses ovos retornaram a incubadora por cerca de 5 dias. Os embriões foram sacrificados e as retinas dissecadas. Explantes retinianos foram incubados com [³H]GABA (0.4 μ Ci/placa) por 90min e a liberação desse neurotransmissor foi induzida por 2mM glutamato. Nossos resultados mostram que retinas tratadas com etanol aumentam a liberação de [³H]GABA em 39 % (p=0,003) quando estimuladas. Estudamos ainda a influência do tratamento de etanol na expressão de GAD. Para isso, retinas de embriões E17 (tratados em E6) foram homogeneizadas e as proteínas resolvidas por Western-blot. Nossos resultados mostram que a expressão da GAD está aumentada nos embriões tratados com etanol.

Conclusões:

Utilizamos um modelo de intoxicação em embriões de pinto e mostramos que o sistema gabaérgico da retina apresenta alterações funcionais quando os embriões desenvolvem-se na presença de etanol

03.030

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA ACETILCOLINESTERASE EM SINAPTOSSOMOS DO HIPOCAMPO DE RATOS EXPOSTA A PESTICIDAS. ¹Rodrigues, K. J. A. R.; ¹Faro, L. R. F.; ¹Nascimento, J. L. M. do; ¹Cruz, T. C. D.*; ¹Santana, M. B. D.**; ²Alfonso, M.; ²Duran, R.; ²Campos, F.**; ²Vidal, L.**; ¹Fisiologia CCB-UFPB; ²Biología Funcional y Ciencias de la Salud, Facultad de Ciencias, Universidad de Vigo, Espanha

Objetivo:

Investigar, em sinaptossomos do hipocampo de ratos, a atividade da enzima responsável pela degradação da acetilcolina, acetilcolinesterase, quando exposta *in vitro* a quatro tipos de pesticidas (Rotenona, Paraquat, MANEB e Dicofol).

Métodos e Resultados:

Ratos Wistar machos adultos sofreram decapitação e craniotomia, e o hipocampo foi dissecado em sacarose gelada (0,32 M), homogeneizado em 2 mL deste meio e centrifugado a 1000g (4° C, 10 min). O sobrenadante foi centrifugado a 17800g (4° C, 15min) e o sedimento obtido foi ressuspendido em 3 mL de sacarose gelada. Volume de 40 µL dessa solução contendo sinaptossomos era adicionado a 2 mL e 460 µL do tampão DTNB. Em seguida, no grupo tratado eram adicionados 30 µL dos respectivos pesticidas, todos a 100 µM. Havia então uma pré-incubação de 5 min (37°C) e a posterior adição do substrato da enzima, iodeto de propioniltiocolina. Incubava-se por 10 min (37°C) e após esse tempo adicionava-se 20 µL para o grupo tratado e 50 µL para o controle de um inibidor clássico da acetilcolinesterase (salicilato de eserina), parando a reação. A atividade da enzima era avaliada pela intensidade da coloração da solução, oriunda da reação da tiocolina liberada com o reativo de cor, DTNB, medida em espectrofotômetro a 405 nm. Dos quatro pesticidas estudados, apenas o herbicida paraquat mostrou diminuir a atividade da acetilcolinesterase (77,18% de atividade±7%, n=5), já que rotenona (99,12%±9,2%, n=5), MANEB (99,10%±6,8%, n=5) e dicofol (94,96%±8,3%, n=5) não diferiram significativamente em relação ao grupo controle (100%±6,4%, n=5)

Conclusões:

Dos pesticidas Rotenona, Paraquat, MANEB e Dicofol, somente o paraquat pareceu ter uma ação inibitória sobre a enzima acetilcolinesterase, podendo acarretar no acúmulo de seu substrato, acetilcolina, e prejudicar a transmissão colinérgica, um evento comum na neuropatologia central da Doença de Alzheimer.

03.031

SULFATO DE COBRE INIBE ATIVIDADE NTPDÁSICA EM MEMBRANAS CEREBRAIS DE ZEBRAFISH (*DANIO RERIO*). ¹Rosemberg, D. B.; ²Senger, M. R.*; ²Rico, E. P.**; ¹Arizi, M. B.*; ¹Dias, R. D.; ¹Bogo, M. R.; ¹Bonan, C. D. ¹Ciências Fisiológicas PUC-RS; ²Bioquímica ICBS-UFRGS

Objetivo:

O sulfato de cobre (CuSO₄) é um composto muito utilizado na agricultura que pode chegar ao ambiente contaminando diferentes espécies, incluindo peixes. Estudos demonstram sua toxicidade em muitos organismos, mas não existem evidências sobre possíveis efeitos no sistema purinérgico, onde o ATP atua como um neurotransmissor. Após sua liberação na fenda sináptica, o ATP necessita de mecanismos para inativação de sinal, sendo hidrolisado até o neuromodulador adenosina pelas enzimas NTPDase (nucleosídeo trifosfato difosfoidrolase) e ecto-5'-nucleotidase, recentemente caracterizadas em membranas cerebrais de zebrafish no nosso laboratório. Portanto, o objetivo do presente estudo é avaliar o efeito *in vitro* do CuSO₄ na atividade destas ectonucleotidases.

Métodos e Resultados:

As membranas cerebrais de zebrafish utilizadas nos ensaios enzimáticos foram preparadas como previamente descrito (J. Neurochem. 61:1685-1691, 1993). Nas concentrações do tratamento com CuSO₄ (variando de 0.05 mM a 1mM), verificou-se uma inibição significativa na hidrólise do ATP em 0.25, 0.5 e 1 mM de CuSO₄ (13%, 31% e 48%, respectivamente), em comparação ao grupo controle. Um efeito inibitório similar também ocorreu na hidrólise do ADP nessas mesmas concentrações (41%, 63%, 68%, respectivamente). Não foram evidenciadas alterações significativas na atividade da ecto-5'-nucleotidase na presença deste metal. Gráficos de Lineweaver-Burk, utilizando 0,5 e 1mM de CuSO₄, demonstraram uma inibição não-competitiva para a hidrólise do ATP e ADP.

Conclusões:

Dentre os diversos efeitos tóxicos do sulfato de cobre, a inibição da atividade NTPDásica em membranas cerebrais de zebrafish poderia sugerir um aumento nos níveis do ATP extracelular, o que acarretaria efeitos citotóxicos e neurodegenerativos no sistema nervoso central dessa espécie.

03.032

EFFECT OF ELECTROCONVULSIVE SHOCK ON Na^+, K^+ -ATPASE ACTIVITY IN HIPPOCAMPUS OF RATS. ¹Streck, E. L.; ²Franzon, R.*; ¹Feier, G.*; ¹Dal Pizzol, F.; ¹Quevedo, J. L. D.; ²Wyse, A. T. S.; ¹Medicina UNESC; ²Bioquímica - ICBS, UFRGS

Objetivo:

Electroconvulsive therapy (ECT) is the most effective treatment for refractory depression. Although several advances have occurred over the past 20 years concerning the use and administration of ECT in order to minimize side effects of this treatment, little progress has been made in understanding the mechanisms underlying its therapeutic or adverse effects. Electroconvulsive shock (ECS), the animal model of ECT, has been shown to have many effects and these findings have contributed to explain the therapeutic and side effects of ECT. In this work, our objective was to investigate Na^+, K^+ -ATPase activity in hippocampus of rats subjected to acute and chronic ECS.

Métodos e Resultados:

For acute model, 60-day-old rats received a single ECS. In chronic treatment, animals received eight ECS every other day. ECS was applied via bilateral ear clip electrodes. Sham groups (acute and chronic) were handled identically to the ECS-treated rats except no current was passed. Animals were sacrificed at different times after last ECS: immediately after, 48 hours, 7, 30, 60 and 90 days. Synaptic plasma membranes were prepared (Biochim Biophys Acta 1974, 356:276) and Na^+, K^+ -ATPase activity [nmol Pi/min x mg protein] was measured (Biochem J 1984, 22:301). We verified that acute ECS inhibited Na^+, K^+ -ATPase at all times (Sham: 924.5±277.9, 0h: 702.0±205.2, 48h: 534.5±276.8, 7d: 386.2±45.0, 30d: 407.0±118.5, 60d: 375.5±65.9, 90d: 584.7±117.3, p<0.05, n=4). Besides, in chronic ECS, the enzyme was activated immediately after last ECS (0h) and inhibited at 7 days (Sham: 1096.7±269.4, 0h: 1432.0±484.7, 48h: 1165.7±319.2, 7d: 666.0±189.7, 30d: 937.2±123.6, 60d: 988.0±279.8, 90d: 1019.5±230.5, p<0.05, n=4).

Conclusões:

Our findings demonstrated that ECS altered Na^+, K^+ -ATPase activity in hippocampus of rats. These results may help us to better understand the neurochemical effects of ECT.

03.033

HYPOXIC-ISCHEMIC INSULT DECREASES GLUTAMATE UPTAKE BY HIPPOCAMPAL SLICES FROM NEONATAL RATS: PREVENTION BY GUANOSINE. ¹Boff, B.; ¹Moretto, M. B.**; ¹Arteni, N. S.**; ¹Lavinsky, D.*; ¹Netto, C. A.; ²Rocha, J. B. T. da; ¹Souza, D. O. G.; ¹Wofchuk, S. T.; ¹Bioquímica ICBS-UFRGS; ²Química UFSM

Objetivo:

Brain injury secondary to hypoxic-ischemic disease is the predominant form of damage encountered in the perinatal period. The impact of neonatal hypoxia-ischemia (HI) in 7-day-old pups on the high-affinity [³H] glutamate uptake into hippocampal slices at different times after insult was examined.

Métodos e Resultados:

We utilized the most widely used experimental model of neonatal hypoxia-ischemia. The pups submitted to hypoxic insult (P7) were killed immediately or 1,3,5,30 or 60 days after. Hippocampal slices were used for glutamate uptake experiments. Immediately following and 1 day after the insult there was no effect, but at 3 to 5 days after the HI insult, glutamate uptake into the hippocampus was markedly reduced (C=1,1308 nmol/mgprotein(SD=0,2100;n=14;HI=0,7307nmol/mgprot;SD=0,2500,n=14) and (C=0,5555 nmol/mg/prot SD=0,046;n=7;HI=0,2739nmol/mg/prot SD=0,1209;n=7), respectively. However, after 30 or 60 days the glutamate uptake into hippocampal slices returned to control levels. Also, this study demonstrated the neuroprotector effect of the nucleoside guanosine (Guo) on the [³H] glutamate uptake in neonatal HI injury, maintaining the [³H] glutamate uptake at control levels when injected before and after insult HI.

Conclusões:

We conclude that neonatal HI influences glutamate uptake a few days following insult, and that guanosine prevents this action.

03.034

EFEITO DOS ANTIINFLAMATÓRIOS NÃO-ESTERÓIDES (AINES) SOBRE A HIDRÓLISE DO ATP, ADP E AMP EM LINHAGENS CELULARES DE GLIOMAS. ¹Bernardi, A. ^{**}; ¹Bavaresco L. ^{*}; ¹Sarkis, J. J. F.; ²Lenz, G.; ¹Battastini, A. M. O.; ^{1,2,3}Bioquímica ICBS-UFRGS; ⁴ Biofísica ICB-UFRGS

Objetivo:

Os gliomas são os tumores primários mais comuns que afetam o SNC. Os nucleotídeos extracelulares ATP e seus derivados são conhecidas moléculas sinalizadoras que podem modular muitas respostas fisiopatológicas. A hidrólise seqüencial do ATP até adenosina é realizada pelas ectonucleotidases. Embora sua função na patogênese do câncer não seja clara, estudos recentes sugerem que a enzima ciclooxigenase (COX) está envolvida na proliferação de tumores. Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito dos AINES, fármacos inibidores da COX, sobre a hidrólise de nucleotídeos em linhagens celulares de gliomas.

Métodos e Resultados:

As linhagens celulares de glioma humano (U138-MG) e de rato (C6) foram mantidas a 37°C em incubadora contendo 5% de CO₂, em meio DMEM suplementado com soro fetal bovino. Após a confluência as células foram tratadas com indometacina em variadas concentrações (25 a 400 µM) durante 24, 48 e 72h. As atividades ATPásica, ADPásica e AMPásica foram medidas pela liberação de fosfato inorgânico (Pi), baseado no método do Verde de Malaquita. A proteína foi determinada pelo método de Coomassie Blue. Não foram observadas alterações na hidrólise do ADP, porém houve um aumento das atividades AMPásica e ATPásica nas células tratadas com indometacina (80±2.4%,n=4). As células tratadas com acetaminofeno (500µM), sulfeto de sulindaco (250µM) e NS-398 (100µM) apresentaram um aumento das atividades enzimáticas comparável ao observado com a indometacina.

Conclusões:

Houve um aumento da atividade AMPásica e ATPásica em ambas as linhagens tratadas com os AINES. Mais estudos são necessários para investigar o efeito destes fármacos sobre a expressão das ecto-nucleotidases bem como sobre os produtos da degradação do AMP para que se possa melhor compreender a relação entre o aumento da atividade destas enzimas e a patogenia dos gliomas.

03.035

CALCIUM-STIMULATED PROLYL DIPEPTIDYL AMINOPEPTIDASE IV (DPPIV) IN RAT HYPOTHALAMIC SYNAPTOSOMES UNDER BASAL CONDITIONS. ¹Zambotti-Villela, L.; ¹Alponti, R. F.*; ¹Sandoval, M. R. L.; ²Carneiro, S. M.; ¹Silveira, P. F. ¹Farmacologia Instituto Butantan; ²Biologia Celular Instituto Butantan

Objetivo:

DPPIV has been detected at synapse level but there is no report about its localization or modulation by Ca⁺² in soluble (S) or particulate (M) fractions in the synaptosomes (SY) of the hypothalamus (HT). Here we (i) compare DPPIV activity levels among released (R), S and M fractions from SY of HT, and (ii) evaluate the influence of extracellular Ca⁺² on this activity at these locations.

Métodos e Resultados:

To obtain isolated SY, brains were removed from Wistar adult male rats and HTs were dissected and pooled (8 per experiment), homogenized and submitted to differential followed by gradient centrifugation. SY were incubated in a medium (R) with or without Ca⁺². After, R was separated and the pellet was resuspended and ultracentrifuged to obtain S and M. Lactate dehydrogenase (LDH) was measured in S and M. To confirm the integrity of SY, the pellet was visualized by transmission electron microscopy. DPPIV activity was fluorometrically measured. As results (mean±SEM), LDH (milimoles NADH hydrolysed min⁻¹mg protein⁻¹; n=4) was very higher in S (16.4±3.5) than in M (0.7±0.1). DPPIV (nanomoles substrate hydrolysed min⁻¹mg protein⁻¹; n= 3) in the presence of Ca⁺² was 1.1±0.4, 124.2±20, 4.6±1 in R, S and M, respectively. After Ca⁺² withdrawal, DPPIV levels remain unchanged in R while they decreased in S (86±2%) and M (78±3%).

Conclusões:

The procedures to obtain SY, S and M are efficient. DPPIV is predominantly a cytosolic enzyme at synapse level in rat HT, where it inactivates or processes and/or releases peptides. Under basal condition, released DPPIV can also exert a neuropeptide-degrading activity. The finding that DPPIV

activity decreases in S and M from SY in the Ca^{+2} -free medium suggests that this activity is modulated within the neurotransmission process. Whether the releasing of DPPIV can be dependent of intracellular Ca^{+2} and/or depolarizing stimuli is under investigation.

03.036

EFFECT OF ANTIOXIDANTS ON BRAIN INJURY CAUSED BY ISCHEMIA IN OVARECTOMIZED RATS. Tagliari, B.; Zamin, L. L.^{**}; Franzon, R.; Salbego, C. G.; Wyse, A. T. S. Bioquímica ICBS-UFRGS

Objetivo:

It has been demonstrated that postmenopausal women are more susceptible to brain ischemia. Considering that production of reactive oxygen species (ROS) is involved in this pathology, that estrogens have been show to be potents antioxidants and that hormone replacement decreases ischemic injury in ovariectomized (OVX) rats, in the present study we investigated the effect of antioxidants (vitamins E and C) on brain injury caused by ischemia in OVX rats.

Métodos e Resultados:

For the *in vitro* studies, female Wistar rats (80-days-old, 180-210 g) were assigned to one of the following groups: naive (control), sham (only submitted to surgery without removing of ovaries) and ovariectomized. After 10 days the animals were sacrificed and slices of hippocampus were preincubated in presence or absence of trolox (hydrosolúvel vitamin E) during 30 minutes. *In vitro* model of ischemia was performed in tissue exposed to oxygen and glucose deprivation (OGD), which mimic similar traumatic *in vivo* conditions. Preincubation with 1 mM trolox did not prevent the effect of OVX (Control: 437.42 ± 40.19 ; Trolox: 383.79 ± 32.25 ; $n=4$). For the *in vivo* studies, female Wistar rats (70-days-old, 180-210 g) were pretreated for 1 week with daily i.p. administration of saline (control) or vitamins E plus C (vits) and after this treatment the animals were divided in naive, sham or ovariectomized and the same model of ischemia was performed after 10 days. Results showed that vits pretreatment prevents the ischemic damage provoked by OVX (Control: 266.29 ± 94.87 ; Vits: 175.16 ± 35.2 ; $n=4$). OVX effects were assessed by LDH release to the medium and results are expressed as % of naive non-OGD group.

Conclusões:

Our results show that pretreatment with antioxidants prevents the brain injury caused by ovariectomy, suggesting that these effects were mediated by oxidative stress.

03.037

MECANISMOS DESPOLARIZANTES INDUZIDOS PELA ISQUEMIA EM NEURÔNIOS GABAÉRGICOS DA RETINA DO PRIMATA *CALLITHRIX JACCHUS*. ¹Ferreira, R. J. L.^{**}; ¹Silva, B. C.*; ¹Figueirôa, C. H. M.*; ¹Macedo, J. S.*; ²Castro, C. M. M. B. D.; ³Pontes Filho, N. T.; ³Montenegro, L.T.; ⁴Silveira, A.B.; ¹Costa, B. L. D. S. A. D.; ¹Fisiologia e Farmacologia, DFF-UFPE; ²Medicina Tropical UFPE; ³Patologia, UFPE; ⁴Histologia e Embriologia UFPE

Objetivo:

Analisar a participação relativa de receptores glutamatérgicos ionotrópicos e de transportadores de GABA na excitotoxicidade aguda induzida pela isquemia *in vitro* na retina do primata *Callithrix jacchus*.

Métodos e Resultados:

Foram utilizados 04 animais adultos do primata do Novo Mundo, *Callithrix jacchus*. As retinas foram rapidamente dissecadas, segmentadas e imersas por 45 min a 37°C em 2 tipos de Ringer os quais diferiram pela presença (condição controle) ou ausência de glicose e O₂ (condição de isquemia simulada). Os efeitos da isquemia sobre o padrão de imunoreatividade ao GABA e sobre a integridade estrutural do tecido foram analisados na presença de antagonistas de receptores NMDA e não-NMDA, de um inibidor do transportador de GABA (guvacina-HCl) ou ainda na presença de 10 mM Mg²⁺ no meio extracelular. Os resultados mostraram que a atividade de transportadores de GABA contribui para a produção do edema e vacuolização neuronal induzidos pela isquemia. O bloqueio de receptores do tipo NMDA e de canais de Ca²⁺ dependentes de voltagem promovidos por 10 mM Mg²⁺ ou a presença simultânea de antagonistas de receptores dos tipos NMDA e não-NMDA foram capazes de reduzir o dano agudo ao tecido mas não de prevenir a liberação de GABA no meio extracelular.

Conclusões:

Os dados sugerem que na retina do *Callithrix jacchus*, os efeitos neurotóxicos agudos da isquemia envolvem a participação aditiva de receptores glutamatérgicos ionotrópicos, transportadores de GABA e possivelmente de canais de Ca²⁺ dependentes de voltagem.

03.038

ATIVIDADE DA SUPERÓXIDO DISMUTASE NA MEDULA ESPINAL DE RATOS SUBMETIDOS À DOR NEUROPÁTICA. ¹Guedes, R. P.**; ¹Dal Bosco, L.; ¹Teixeira, C. M.*; ²Llesuy, S.; ¹Belló-Klein, A.; ¹Partata, W. A.; ¹Fisiologia UFRGS; ²Biofísica e Farmacologia Universidad de Buenos Aires

Objetivo:

O processamento da informação nociceptiva envolve diversos sistemas de neurotransmissores e muitas outras moléculas regulatórias. Recentemente foi descoberto que as espécies reativas do oxigênio e antioxidantes também participam dessas vias. Entretanto pouco é conhecido sobre o papel dessas moléculas na dor neuropática. Por isso, este trabalho tem o objetivo de determinar a atividade da superóxido dismutase (SOD) na medula espinal após o desenvolvimento de dor neuropática mediante secção do nervo ciático.

Métodos e Resultados:

Foram utilizados ratos *Wistar* machos para a secção do nervo ciático; no grupo *sham* o nervo foi exposto, porém não houve secção; foi considerado ainda um grupo controle, no qual os animais não sofreram nenhuma manipulação. O limiar nociceptivo foi testado através do teste da placa quente (teste estatístico de Kruskal-Wallis seguido de Dunn). Os animais foram sacrificados 3, 7 e 15 dias após a lesão (n=5 para cada grupo) e a medula espinal foi removida e homogeneizada para a medida da atividade da SOD (USOD/mg de proteína). Os dados foram analisados por ANOVA de uma via seguido de Student-Newman-Keuls. Após 3 dias de lesão, a medida do limiar nociceptivo indicou que os denervados desenvolveram hiperalgesia (2,9s±0,3) quando comparados aos controles (6,3s±0,5); 7 dias depois houve diferença significativa entre os animais controle (11,7s±2,3) e denervados (5,4s±0,3) e entre o grupo *sham* (8s±0,5) e o denervado. Aos 15 dias não houve diferenças significativas. Houve uma redução de 30% da atividade da SOD após 7 dias de lesão nos animais denervados quando comparados ao grupo controle. Nos demais grupos as variações não foram significativas.

Conclusões:

Ocorre uma redução das defesas antioxidantes primárias na medula espinal após o desenvolvimento da dor neuropática como evidenciado pela diminuição da atividade da SOD neste tecido 7 dias após a secção do nervo ciático.

03.039

EFEITOS DO ZINCO E DO CÁDMIO SOBRE AS ATIVIDADES ECTONUCLEOTIDÁSICAS EM MEMBRANAS CEREBRAIS DE ZEBRAFISH (*DANIO RERIO*). ¹Bernardi, G.F.; ²Rico, E.P.**; ²Senger, M. R.*; ¹Arizi, M. B.*; ¹Rosemberg, D. B.*; ¹Dias, R. D.; ¹Bogo, M. R.; ¹Bonan, C. D.; ¹Ciências Fisiológicas PUC-RS; ²Bioquímica ICBS-UFRGS

Objetivo:

O efeito dos metais pesados é estudado em diversas espécies, devido suas ações neurodegenerativas. Entretanto, não existem evidências sobre seus possíveis efeitos tóxicos no sistema purinérgico, onde o ATP age como um neurotransmissor. Depois de exercidas as suas funções nos terminais nervosos, o ATP necessita de mecanismos para a inativação do seu sinal. Portanto, o ATP é hidrolisado até o neuromodulador adenosina por enzimas chamadas ectonucleotidases. As ectonucleotidases são enzimas pertencentes à família das NTPDaese, sendo, portanto enzimas capazes de degradar o trifosfato de adenosina e difosfato de adenosina. Em nosso laboratório, foi caracterizada a atividade de uma NTPDase (capaz de hidrolisar ATP e ADP) e uma ecto-5'-nucleotiidase (enzima que hidrolisa AMP) em membranas cerebrais de zebrafish. Este peixe é utilizado como um modelo experimental em estudos biomédicos e toxicológicos. Portanto, o presente estudo tem como objetivo avaliar o efeito *in vitro* do acetato de cádmio e do cloreto de zinco na hidrólise do ATP, ADP e AMP em membranas cerebrais de zebrafish.

Métodos e Resultados:

As membranas cerebrais foram preparadas e os ensaios enzimáticos foram realizados, utilizando concentrações de acetato de cádmio e cloreto de zinco, variando entre 0,05 mM e 1 mM. Os resultados mostraram um aumento significativo na hidrólise do ATP nas concentrações de 0,5 e 1,0 mM (53% e 48%, respectivamente), uma inibição na hidrólise do ADP nas concentrações de 0,25, 0,5 e 1,0 mM (14%, 28%, 69%, respectivamente) e do AMP na concentração de 1,0 mM (37%) de acetato de cádmio. O cloreto de zinco inibiu a hidrólise do ATP na concentração de 0,1 mM (18%) e do ADP na concentração de 1,0 mM (36%), bem como aumentou a hidrólise do AMP nas concentrações de 0,5 e 1,0 mM (120% e 187%, respectivamente).

Conclusões:

Os resultados demonstram um efeito diferencial destes metais pesados na hidrólise dos nucleotídeos extracelulares em zebrafish, o que indica que o sistema purinérgico pode ser um alvo da ação destes metais no sistema nervoso central.

03.040

PERFIL ONTOGENÉTICO DAS ATIVIDADES ECTONUCLEOTIDÁSICAS EM SINAPTOSSOMAS CEREBRAIS DE RATOS TRATADOS COM PILOCARPINA. ¹Vuaden, F. C. ¹Cognato, G. D. P. ^{**}; ¹Bruno, A. N. ^{**}; ¹Sarkis, J. J. F.; ²Bonan, C. D.; ¹Bioquímica ICBS-UFRGS; ²Ciências Fisiológicas PUC-RS

Objetivo:

Ratos jovens apresentam diferenças morfológicas e fisiológicas no sistema nervoso central ao serem submetidos a modelos de epilepsia quando comparados com ratos adultos. O cérebro em desenvolvimento é mais resistente ao dano morfológico induzido pelo estado epilético do que o cérebro maduro. A adenosina pode agir como um anticonvulsivante endógeno pela ativação de receptores do tipo A₁. Este nucleosídeo é produzido na fenda sináptica pelas ectonucleotidases, uma família de enzimas que incluem a NTPDase (nucleosídeo trifosfato difosfoidrolase) e a ecto-5'-nucleotidase. Portanto, o objetivo deste estudo é verificar o efeito da ontogenia e do modelo de epilepsia da pilocarpina sobre as atividades ectonucleotidásicas em sinaptossomas cerebrais de ratos.

Métodos e Resultados:

Foram utilizados ratos *Wistar* machos com diferentes idades. Sete dias após o tratamento com pilocarpina, os sinaptossomas de córtex cerebral e de hipocampo dos ratos foram preparados e as atividades de hidrólise de ATP, ADP e AMP foram determinadas pelo fosfato inorgânico liberado. Foi observado um perfil de hidrólise de nucleotídeos aumentado em hipocampo de ratos controle de 14 a 16 dias de vida quando comparados com ratos de 7 a 9 dias (16%-ATP, 51%-ADP e 300% AMP), 27 a 30 dias (56%-ATP e 30%-ADP) e 60 a 70 dias (26%-ATP e 94%-ADP). Em córtex, as atividades de hidrólises de nucleotídeos de ratos controle de 14 a 16 dias aumentaram em: 42% (ATP), 33% (ADP) e 160% (AMP) em ratos de 7 a 9 dias; 21% (ATP), 17% (ADP) e 62% (AMP) em ratos de 27 a 30 dias; 63% (ATP) e 88% em ratos de 60 a 70 dias. Animais com idade de 7 a 30 dias, tratados com pilocarpina, não apresentaram um aumento nas atividades ectonucleotidásicas em sinaptossomas cerebrais quando comparados aos respectivos grupos controle. O tratamento com pilocarpina foi capaz de aumentar significativamente as atividades de hidrólise de nucleotídeos em hipocampo (ATP-55%, ADP-60% e AMP-100%) e córtex cerebral (ATP-33%, ADP-42% e AMP-66%) de ratos adultos.

Conclusões:

Estes resultados evidenciam fortemente uma diferença entre o sistema purinérgico de ratos jovens e adultos quando submetidos ao modelo de epilepsia da pilocarpina.

03.041

EXPRESSÃO DO FENÓTIPO GABAÉRGICO EM CÉLULAS GLIAIS. Schitine, C. D. S.; de Mello, F. G.; Yamasaki, E. N. Biofísica IBCCF-UFRJ

Objetivo:

GABA (ácido γ -amino-butírico) é o principal neurotransmissor inibitório do sistema nervoso central, sendo sintetizado pela enzima descarboxilase do ácido glutâmico (GAD). Neste trabalho investigamos a expressão de um marcador neuronal, GABAérgico, em culturas purificadas de

células gliais da retina de aves. Caracterizamos também a possível modulação da GAD por GABA, descrita para culturas mistas de retina (de Mello, 1984; Almeida e cols. 2002).

Métodos e Resultados:

Culturas purificadas de células gliais foram obtidas a partir de culturas mistas diluídas, de retina de embrião de ave de nove dias (E9), cultivadas por 2-3 semanas. As culturas eram tratadas com GABA 20mM durante 5 dias. A atividade GAD era medida pela produção de CO₂ e a quantidade da enzima ou do transportador de GABA (GAT-1) estimada por western blot (WB). Os ensaios de incorporação e liberação de GABA foram realizados a partir da incorporação de ³H-GABA por 2h a 37°C, seguidos de perfusão minuto a minuto, tendo como estímulo para liberação glutamato 100µM. Nossos resultados mostram a presença da GAD e do transportador GAT-1 em células gliais retinianas. Entretanto, essa enzima não apresentava atividade catalítica, assim como o seu transportador não era funcional, demonstrado pela ausência de captação ou de liberação de ³H - GABA após estímulo com glutamato. O tratamento com GABA 20mM durante 5 dias reduziu moderadamente a expressão da GAD nessas células em relação às culturas controle.

Conclusões:

Conclusão: Nossos resultados mostram a presença de um marcador neuronal sendo expresso em células gliais, podendo refletir um processo de desdiferenciação celular. Entretanto, esse fenótipo GABAérgico glial não parece ser funcional.

03.042

AVALIAÇÃO DA CAPTAÇÃO DE GLUTAMATO EM FATIAS DE CÓRTEX E HIPOCAMPO EM RATOS SUBMETIDOS À *STATUS EPILEPTICUS* INDUZIDO POR LÍTIO-PILOCARPINA Fischer, A.; Oliveira, D. L. D. ^{**}; Jorge, R. S. ^{*}; Souza, D. O. G. de; Wofchuk, S. T. Bioquímica ICBS-UFRGS

Objetivo:

A captação de glutamato, principal aminiácido excitatório do SNC, é um importante mecanismo envolvido na manutenção da concentração extracelular de glutamato abaixo dos níveis tóxicos. Estudos recentes têm demonstrado que alterações na expressão e função de transportadores de glutamato podem levar a uma grande variedade de disfunções neurológicas, incluindo as epilepsias. Este trabalho tem como objetivo avaliar o perfil ontogenético da captação de glutamato em ratos submetidos ao modelo de *status epilepticus* (SE) induzido por lítio-pilocarpina (LiCl-pilocarpina).

Métodos e Resultados:

Foram utilizados ratos Wistar machos (P15), os quais receberam um pré-tratamento com lítio (3mEq/kg – i.p.) e, 12-18h após, pilocarpina (60mg/kg – i.p.) ou solução salina. A captação de glutamato foi avaliada 3, 30 e 45 dias após em fatias de córtex e hipocampo. As fatias foram incubadas durante 5 e 7min (hipocampo e córtex, respectivamente), a 35° C em meio HBSS contendo [3H]glutamato. A radioatividade foi quantificada por cintilação e dosagem de proteínas foi realizada pelo método de Peterson. O SE induzido por LiCl-pilocarpina não alterou a captação de glutamato tanto em córtex (controle= 0,50±0,05; SE= 0,49±0,07) quanto em hipocampo (controle= 0,62±0,16; SE= 0,55±0,16) 3 dias após o insulto. Trinta dias após observou-se um aumento na captação de glutamato em córtex (controle= 0,29±0,03; SE= 0,40±0,06; P<0,05), mas não em hipocampo (controle= 0,51±0,20; SE= 0,54±0,13), dos animais submetidos ao SE. Não observou-se alteração na captação de glutamato tanto em córtex (controle= 0,41±0,14; SE= 0,42±0,10) quanto hipocampo (controle= 0,52±0,11; SE= 0,56±0,13) 45 dias após.

Conclusões:

Nossos resultados demonstram que o SE induzido por LiCl-pilocarpina aumenta a captação de glutamato em fatias de córtex 30 dias após a ocorrência do insulto.

03.043

EXPRESSÃO DE β-GALACTOSIDASE EM NEURÔNIOS DO GÂNGLIO DA RAIZ DORSAL DE RATOS DIRIGIDA POR UM VETOR ADENOVIRAL. ¹Duarte, H. L. L.; ¹da Rocha, W. D.; ²Bruña-Romero O.; ¹Gontijo C. M.; ¹Cruz, J. C.; ¹Bioquímica e Imunologia UFMG; ²Microbiologia ICB-UFMG

Objetivo:

No presente trabalho testamos a capacidade de infecção de neurônios sensoriais do gânglio da raiz dorsal de ratos por um vetor viral recombinante expressando um gene repórter bacteriano (*lacZ*).

Métodos e Resultados:

Neurônios obtidos de gânglios das raízes dorsais de ratos Wistar machos, \pm 10 semanas, pesando 200-300 g foram cultivados sobre lamínulas estéreis em meio DMEM com soro fetal bovino. Adenovírus recombinantes tipo 5 humano (Ad- β -Gal), deficientes na replicação, foram gerados após construção de um plasmídeo de transferência contendo um cassete de expressão para β -Galactosidase, o que permite a inserção deste gene no genoma viral através de mecanismos de recombinação homóloga. Tentamos infectar os neurônios isolados em cultura com este vírus, adicionando um volume final de 1,0 mL de meio de cultura completo com $5,0 \times 10^7$ p.f.u. O grupo das células controle não foi infectado. Os tempos de infecção foram de 1 e 12 h, sendo que ao final destes intervalos, as células foram lavadas e mantidas em cultura até completar 24 h, posteriormente fixadas e tratadas para confirmação da produção da enzima. Em microscópio óptico foram feitas análise morfológica e contagem de células coradas isoladas. No intervalo 1 h a porcentagem de infecção foi de 78%, enquanto que com 12 h atingiu-se 99%. A infecção viral não alterou a morfologia destas células quando comparadas ao grupo controle

Conclusões:

O adenovírus Ad- β -Gal mostrou-se eficiente vetor para expressão heteróloga em cultura primária de neurônios sensoriais do gânglio da raiz dorsal nos intervalos de 1 e 12 h de infecção. Diante da eficiência dessa metodologia, poderemos utilizar este sistema para estudos avançados, como RNAi, nesse tipo celular.

03.044

GESTATIONAL AND POSTNATAL MALNUTRITION AFFECTS SENSITIVITY OF YOUNG RATS TO PICROTOXIN AND QUINOLINIC ACID AND UPTAKE OF GABA BY CORTICAL AND HIPPOCAMPAL SLICES. ¹Oliveira, D. L. de; ²Schweigert, I.; ¹Scheibel, F.*; ¹Costa, F.*; ¹Wofchuk, S. T.; ¹Souza, D. O. G. de; ¹Perry, M. L. S.; ¹Bioquímica ICBS-UFRGS; ²CCS- UNIJUI

Objetivo:

It is widely known that a complex interaction between excitatory and inhibitory systems is required to support the adequate functioning of the brain and that significant alterations induced by early protein restriction are complex, involving many systems. Based on such assumptions, we investigated the effects of maternal protein restriction during pregnancy and lactation followed by offspring protein restriction on some GABAergic and glutamatergic parameters, which mediate inhibitory and excitatory transmission, respectively.

Métodos e Resultados:

The sensitivity of young malnourished rats to convulsant actions of the GABAA receptor antagonist picrotoxin (PCT; s.c.) and to N-methyl-d-aspartate (NMDA) receptor agonist quinolinic acid (QA; i.c.v) and also g-amino-n-butyric acid (GABA) and glutamate uptake by cortical and hippocampal slices were evaluated in P25 old rats. Early protein malnutrition induced higher sensitivity to picrotoxin, which could be associated with the observed higher GABA uptake by cortical ($58,70 \pm 2,24$ pmol GABA/mg prot/min; $p < 0,05$ compared with wellnourished), and hippocampal slices ($84,21 \pm 9,15$ pmol GABA/mg prot/min; $p < 0,05$ compared with wellnourished) in malnourished rats. In contrast, we observed lower sensitivity to quinolinic acid in spite of unaltered glutamate uptake by the cortical (wellnourished= $0,50 \pm 0,05$ nmol GLU/mg prot/min; malnourished= $0,39 \pm 0,07$ nmol GLU/mg prot/min) and hippocampal (wellnourished= $0,86 \pm 0,08$ nmol GLU/mg prot/min; malnourished= $0,77 \pm 0,05$ nmol GLU/mg prot/min) slices. Picrotoxin enhanced GABA uptake in hippocampus in well- ($108,10 \pm 13,50$ pmol GABA/mg prot/min; $p < 0,05$ compared with vehicle) and malnourished ($132,40 \pm 16,30$ pmol GABA/mg prot/min; $p < 0,05$ compared with vehicle) rats; however, it did not affect cortical GABA uptake.

Conclusões:

Our data corroborate our previous report, showing that malnutrition depresses the glutamatergic activity, and point to altered modulation of GABAergic neurotransmission. Such findings allow us to speculate that malnutrition may affect the excitatory and inhibitory interaction.

03.045

EFEITO *IN VITRO* DE LEUCINA E ÁCIDO ALFA-CETO-ISOCAPRÓICO SOBRE AS ENZIMAS ANTIOXIDANTES EM CÓRTEX CEREBRAL DE RATOS. ¹Dutra-Filho, C. S.; ¹Bridi, R. ^{**}; ¹Braun, C. A. ^{*}; ¹Zorzi, G. K. ^{*}; ¹Latini, A. S. ^{**}; ¹Wajner, M.; ²Lissi, E.; ¹Bioquímica ICBS-UFRGS; ²Universidad Santiago de Chile

Objetivo:

A doença do xarope do Bordo (MSUD) é causada pela deficiência na atividade da desidrogenase dos cetos-ácidos de cadeia ramificada resultando no acúmulo dos aminoácidos e α -cetos-ácidos de cadeia ramificada nos tecidos e líquidos biológicos dos pacientes afetados. A patogênese da MSUD está associada ao acúmulo destes metabólitos e seus efeitos tóxicos sobre o SNC. A leucina (Leu) e o ácido α -ceto-isocapróico (KIC) são considerados os principais metabólitos neurotóxicos, mas a fisiopatologia da MSUD ainda não está bem definida.

Métodos e Resultados:

Avaliou-se a atividade *in vitro* das enzimas antioxidantes catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathiona peroxidase (GPx) em homogeneizado de córtex cerebral de ratos. Leu e KIC (1; 2,5 e 5 mM) foram adicionados aos homogeneizados no momento do ensaio ou incubados previamente durante 1 hora a 37°C. Verificou-se que a Leu inibiu a atividade da CAT em 31% sem incubação prévia [F(3,20)=3.99; p<0.05] e em 28% com incubação [F(3,20)=3.75; p<0.05] enquanto que o KIC não afetou essa atividade. A atividade da GPx foi inibida pela Leu em 25% [F(3,16)=4.23; p<0.01] e pelo KIC em 24% [F(3,16)=6.07; p<0.01] sem incubação prévia. A atividade da SOD não foi alterada pelos metabólitos testados. A inibição da atividade da GPx por Leu e KIC e da CAT por Leu em homogeneizado sem incubação prévia sugerem um efeito direto destes compostos. Para comprovar este efeito, utilizaram-se preparações comerciais purificadas das enzimas e foram observadas inibições na presença de Leu e KIC em níveis similares àqueles encontrados nos homogeneizados cerebrais.

Conclusões:

Leu e KIC inibem a atividade da CAT e GPx. A diminuição das defesas antioxidantes enzimáticas pode ser um dos mecanismos que leva ao aumento da lipoperoxidação e depleção das defesas não-enzimáticas já observados nos homogeneizados cerebrais.

03.046

EFEITO DA INGESTÃO CRÔNICA DE CAFEÍNA NA ATIVIDADE DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES E NA PEROXIDAÇÃO DE LIPÍDEOS EM DIFERENTES REGIÕES DO CÉREBRO DE RATOS ADULTOS. ¹Jardim, F. M.; ¹Ganzella, M. ^{**}; ¹Almeida, L. M. V. D. ^{**}; ¹Vasconcellos, A. P. S. de ^{**}; ¹Gonçalves, C. A. S.; ¹Fontella, F. U.; ²Dalmaz, C.; ¹Vendite D. ¹Bioquímica ICBS-UFRGS; ⁷Bioquímica e Neurociências UFRGS

Objetivo:

Espécies reativas de oxigênio (ERO) são produzidas durante o metabolismo celular aeróbico e são inativadas pelos sistemas antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos endógenos. Estresse oxidativo é o desequilíbrio entre a geração de ERO e os níveis de defesas antioxidantes, sendo descrito em várias desordens neurológicas. O encéfalo é especialmente vulnerável a ERO, pois apresenta metabolismo aeróbico elevado e baixos níveis de enzimas antioxidantes, comparado com outros tecidos. A adenosina, liberada no estresse oxidativo, confere citoproteção aos sistemas nervoso central e cardiovascular por ativar os receptores A1, A2 e A3. Isto é demonstrado pelo aumento na atividade de enzimas antioxidantes em diferentes células por análogos da adenosina. A cafeína é um antagonista de receptores de adenosina, embora altas concentrações ativem canais de Ca²⁺ intracelulares, inibindo fosfodiesterases e apresentando propriedades antioxidantes.

Métodos e Resultados:

No presente estudo nós investigamos os efeitos da ingestão crônica de cafeína (1mg/ml) na água de beber por 7 dias (grupo caf; o grupo controle (cont) recebeu H₂O), sobre a atividade das enzimas antioxidantes: superóxido dismutase (SOD), glutathiona peroxidase (GSH-Px) e catalase (CAT) e na lipoperoxidação em homogenato de hipocampo (HP), cerebelo (CB) e estriado (ST). Os resultados demonstram que a cafeína aumenta a lipoperoxidação (Cont: HP=0,44 ±0,02, CE=0,31 ±0,05, ST=0,28 ±0,03 e Caf: HP=0,85±0,19, CE=0,83 ±0,19, ST=0,35± 0,04 – Média ±DP) e inibe a atividade da GSH-Px (HP=69,6%, CE=69,1%, ST=80,8%, n=5-7) e da SOD (HP=75,3%,

CE=82,4%, ST=81,0%, n=6-8) (test t de Student, $p < 0,05$), mas não causa alteração na atividade da CAT.

Conclusões: O efeito crônico da cafeína nas enzimas antioxidantes pode ser devido ao seu antagonismo aos receptores de adenosina, porém outros mecanismos podem ser considerados. Os presentes dados sugerem que a ingestão crônica de cafeína pode causar estresse oxidativo e contribuir para suas ações neurotóxicas.

03.047

PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES PURINÉRGICOS NA CONTRAÇÃO MUSCULAR. Salgado, A. H. I. Camargos, L.A*; Fisiologia e Biofísica UFMG

Objetivo:

Estudar os efeitos do ATP sobre a contração muscular em hemidiafragma inervado de rato em diferentes condições de estímulos e na presença de suramina

Métodos e Resultados:

Suramina é um antagonista purinérgico que atua bloqueando os receptores do tipo P2X e P2Y. A ação inibitória prejunctional da suramina na transmissão neuromuscular pode estar associada às propriedades de antagonista purinérgico como também pode estar relacionada à inibição da entrada de cálcio, resultando na diminuição da liberação de acetilcolina do terminal nervoso. Em nossos experimentos foram utilizados hemidiafragmas inervados de rato fixados em câmaras de 2 mL e superfundidos com solução Tyrode. Foi aplicada a estimulação nervosa através de um eletrodo de sucção e os parâmetros de estimulação foram testados. As amostras foram coletadas do banho em diferentes tempos, com padrões de estimulação diferentes, na presença ou ausência de suramina. A quantidade de ATP liberada foi realizada utilizando o ensaio de luciferina-luciferase. O aumento da frequência de estimulação de 3Hz para 5Hz (n= 12) aumenta a liberação de ATP em $22 \pm 1,08\%$. Na presença de suramina $100\mu\text{M}$ a quantidade de ATP liberado foi $0,11\text{nM} \pm 0,009$ (n= 6) sob estímulo de 3Hz e $0,10\text{nM} \pm 0,008$ de ATP (n= 6) sob estímulo de 5Hz. O valor de ATP liberado na presença de suramina $100\mu\text{M}$, quando comparado com o experimento controle, na ausência da droga, mostrou uma diminuição de $81,20 \pm 1,05\%$ (n= 6) e de $83,2 \pm 1,05\%$ (n= 6) na quantidade de ATP liberada na presença da droga para 3Hz e 5Hz respectivamente.

Conclusões:

Resultados anteriores no nosso laboratório demonstraram que a liberação de acetilcolina não é alterada pela presença de suramina. Os resultados agora encontrados onde a presença de suramina diminui a quantidade de ATP liberado, dependente da frequência de estimulação apontam para mecanismos diferenciados da ação de acetilcolina e ATP na contração muscular em junção neuromuscular de rato onde a ação do ATP pode ser mediada pelos receptores P1 ou P2.

03.048

REGULAÇÃO DA FOSFORILAÇÃO DA ERK POR ADENOSINA ENDÓGENA EM CULTURAS PURIFICADAS DE GLIA: ENVOLVIMENTO DE RECEPTORES A_1 E A_{2A} ¹Rodrigues, A. S.; ²Araújo, I. L. S.*; ³Leão-Ferreira, L. R.; ²Paes-de-Carvalho, R. ¹Neurobiologia IBCCF-UFRJ; ²Neurobiologia UFF; ³Biologia Celular e Molecular UFF

Objetivo:

Células gliais são elementos fundamentais no desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC), desempenhando funções na migração neuronal, neuroproteção e regulação da concentração de glutamato. A glia de Muller, o tipo de glia predominante na retina, expressa vários receptores e transportadores para neurotransmissores, inclusive de adenosina (Ado). A Ado é importante na regulação da expressão de receptores, proliferação, diferenciação celular e neuroproteção. Nosso objetivo foi estudar a regulação da fosforilação das MAP cinases induzida por ativação de receptores de Ado em culturas purificadas de glia.

Métodos e Resultados:

Culturas puras de glia eram obtidas de retinas de embriões de pinto de 11 dias, dissociadas, plaqueadas em uma densidade de $2,6 \times 10^5$ células/cm², e mantidas a 37 °C por 21 dias, com trocas de meio de 3 em 3 dias que produziam uma diminuição progressiva dos neurônios. A fosforilação da ERK 2 foi observada pela técnica de Western Blot. Nossos resultados demonstram que a Ado endógena regula a fosforilação da ERK 2, pois a incubação das culturas com adenosina

deaminase reduziu em $60,0 \pm 3,4$ % (n=3) a ativação basal da ERK 2. Este estímulo basal foi bloqueado de maneira dose-dependente pela incubação com DPMA, um agonista seletivo do receptor A_{2A} . O estímulo com CHA, um agonista seletivo do receptor A_1 , provocou um aumento de $168,7 \pm 24,02$ % (n=3) na fosforilação da ERK 2 comparado ao nível controle, enquanto que o DPMA bloqueou o efeito induzido pelo receptor A_1 . PD 98059, um inibidor da MEK, bloqueou o aumento da fosforilação induzido pela ativação do receptor A_1 .

Conclusões: A Ado pode regular a fosforilação da ERK 2 na glia de Muller através da ativação de receptores A_1 e A_{2A} .

03.049

EFEITO DA DIETA CETOGÊNICA SOBRE A ATIVIDADE DAS NUCLEOTIDASES E ACETILCOLINESTERASE EM CÉREBRO E SORO DE RATOS. ¹Silveira, V. G. ^{**}; ²Silva, R. S. da; ³Bonan, C. D.; ¹Sarkis, J. J. F.; ¹Perry M. L. S.; ¹Battastini, A. M. O. ¹Bioquímica UFRGS; ²Pesquisa em Bioquímica PUC-SP; ³Ciências Fisiológicas PUC-RS

Objetivo:

A dieta cetogênica é uma dieta rica em lipídeos e pobre em carboidratos, originalmente descrita como um tratamento para epilepsia humana. Nosso laboratório tem caracterizado nucleotidasas em sistema nervoso central e em soro sanguíneo de ratos, as quais apresentam alterações em diferentes modelos de epilepsia. O objetivo deste trabalho foi estudar o efeito da dieta cetogênica sobre a hidrólise de nucleotídeos em soro de ratos. Além disso, estudamos o efeito desta dieta sobre a acetilcolinesterase (AChE) e as ectonucleotidasas em hipocampo e córtex cerebral.

Métodos e Resultados:

As dietas controle e cetogênica foram induzidas em ratos a partir dos 15 dias de idade, durante 71 dias. No final do tratamento, os ratos foram decapitados, o soro foi coletado e hipocampo e córtex isolados para preparação de fatias, ou homogeneizados, para determinação das atividades enzimáticas. A determinação das atividades nucleotidásicas foi feita através da hidrólise de ATP, ADP ou AMP. O Pi liberado foi determinado pelo método do verde de malaquita e a proteína dosada pelo método de Comassie Blue. As ectonucleotidasas e a AChE foram expressas em nmolPi/min/mg de proteína e μ mol de acetilcolina hidrolisada/h/mg de proteína, respectivamente. Houve aumento significativo na hidrólise de ATP ($273 \pm 37\%$, n=8), ADP ($225 \pm 29\%$, n=8) e AMP ($178 \pm 39\%$, n=8) no soro dos ratos tratados com a dieta cetogênica, em relação aos controles. Por outro lado, não foi observada diferença significativa nas atividades nucleotidásicas e na AChE em hipocampo e córtex cerebral entre os dois grupos.

Conclusões:

Sabe-se que a dieta cetogênica promove alterações metabólicas, tais como hipertrigliceridemia. As ectonucleotidasas têm sido utilizadas como marcadores de lesões teciduais do pâncreas e fígado. O aumento das atividades ectonucleotidásicas no soro poderia sugerir um reflexo das alterações metabólicas causadas pela dieta, o que deve ser confirmado em experimentos futuros.

03.050

AÇÃO DO GLUTAMATO SOBRE O EFEITO DO ÁCIDO GAMA-AMINOBTÚRICO (GABA) NA REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO DA ENZIMA DESCARBOXILASE DO ÁCIDO GLUTÂMICO (GAD) NAS CÉLULAS DA RETINA DE PINTO ¹Barros, P. H. O. C.; ²de Mello, F. G.; ²Gardino, P. F. ¹Neurobiologia IBCCF-UFRJ; ²Biofísica Neurobiologia UFRJ

Objetivo:

Demonstramos anteriormente que o GABA reduz o número de células imunorreativas a GAD em cultura de retina de embrião de galinha. Este efeito é revertido pelo glutamato porém pouco se sabe sobre os mecanismos envolvidos neste controle. Nesse trabalho examinamos se o efeito do glutamato sobre a regulação da expressão da GAD mediada por GABA é devido à ativação de receptores ionotrópicos.

Métodos e Resultados:

Para tanto, utilizamos antagonistas de receptores glutamatérgicos e as técnicas de imunohistoquímica (IH) contra GAD e de RT-PCR para as diferentes isoformas GAD em culturas de retina de embrião de galinha. Foram feitas culturas em monocamadas de retinas de embriões de dez dias (E10). Essas culturas eram divididas em grupos: 1- controle; 2- GABA; 3- GABA +

glutamato; 4- glutamato; 5- GABA + glutamato + antagonistas (MK801 e DNQX). As culturas eram fixadas no quinto dia *in vitro*. A IH (n=2) para GAD foi revelada pelo método da avidina-biotina. Como esperado as culturas tratadas com GABA apresentaram uma significativa redução, de 85% a 95%, no número de células imunorreativas para GAD quando comparadas com o grupo controle. As culturas tratadas com GABA e posteriormente com glutamato apresentaram um número de células imunorreativas equivalente ao das culturas controle, revertendo o efeito de GABA sobre a expressão de GAD. Na presença de MK801 e DNQX o número de células GAD+ foi igual a das culturas controle bem como do grupo tratado com GABA+glutamato e com glutamato apenas. No RT-PCR (n=2) observamos a presença de bandas referentes a GAD 65 e 67 em todos os grupos.

Conclusões:

Confirmamos que a inibição da expressão da GAD mediada pelo GABA pode ser revertida por glutamato, porém esse efeito não parece ser mediado por receptores glutamatérgicos ionotrópicos. Dados preliminares sugerem que o mRNA para ambas as isoformas de GAD estão presentes e em quantidades equivalentes mesmo nos grupos em que a expressão da proteína está reduzida, grupo tratado com GABA.

03.051

PERFIL ONTOGENÉTICO DA CAPTAÇÃO DE GLUTAMATO E DA ATIVIDADE DA GLUTAMINA SINTETASE EM BULBO OLFATÓRIO DE RATOS. ¹Thomazi, A. P.; ¹Battu, C. E. ^{**}; ¹ Godinho, G. ^{*}; ¹Almeida, L. M. V. D. ^{**}; ²Kommers, T. C.; ¹Gonçalves, C. A. S.; ¹Wofchuk, S. T.; ¹Bioquímica ICBS-UFRGS; ²Bioquímica Centro Universitário Lasalle

Objetivo:

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do SNC. Em elevadas concentrações pode agir como uma excitotoxina, efeito relacionado a muitas doenças agudas e crônicas do SNC. A manutenção dos níveis extracelulares de glutamato abaixo dos neurotóxicos é realizada principalmente pelas células gliais, particularmente por astrócitos, através de transportadores de alta afinidade dependentes de sódio. O glutamato então captado, é convertido em glutamina pela ação da enzima glutamina sintetase, a fim de dar continuidade a neurotransmissão. Esse trabalho tem por objetivo investigar *in vitro* o perfil ontogenético da captação de glutamato em condições basais utilizando fatias de bulbo olfatório de ratos, e verificar a atividade da glutamina sintetase (GS) nas mesmas idades.

Métodos e Resultados:

Foram utilizadas fatias de bulbo olfatório de ratos Wistar (P15; P21 e P60), as quais foram incubadas com L-[³H]-glutamato por 5 min. Para a atividade da enzima, foram utilizados homogeneizados da estrutura, incubadas com glutamato e ATP. Os resultados mostraram que a captação de glutamato é maior nos animais jovens, 15d (0,58 ± 0,11; n=8) e 21d (0,54 ± 0,17; n=8) e menor nos animais de 60d (0,41 ± 0,08; n=8). A GS teve um pico de atividade aos 21d (69,45 ± 26,01; n=12), o qual foi menor significativamente aos 15d (29,02 ± 8,23; n=6) e aos 60d (37,96 ± 16,18; n=12).

Conclusões:

Observou-se uma intensa atividade glutamatérgica nos animais jovens, o que refletiu uma maior captação de glutamato e de seu metabolismo, o qual foi visto pelo perfil de atividade da glutamina sintetase.

03.052

AValiação DO POTENCIAL NEUROPROTETOR DO RESVERATROL: POSSÍVEL ENVOLVIMENTO DAS ENZIMAS AKT E GSK-3BETA. Dillenburg-Pilla, P.; Zamin, L. L. ^{**}; Nassif, M. C. ^{**}; Horn, A. P. ^{**}; Frozza, R. L. ^{*}; Simão, F. ^{**}; Salbego, C. G. Bioquímica ICBS-UFRGS

Objetivo:

O cérebro apresenta uma alta taxa metabólica sendo assim mais vulnerável ao dano isquêmico do que outros tecidos. Flavonóide presente na casca e sementes das uvas, o resveratrol tem propriedades antioxidantes e neuroprotetoras. Desta forma nosso objetivo foi avaliar o efeito neuroprotetor do resveratrol e o possível envolvimento das enzimas AKT e GSK-3beta em um modelo *in vitro* de Privação de Oxigênio e Glicose (POG).

Métodos e Resultados:

Culturas organotípicas de hipocampos de ratos *Wistar* machos de 6-8 dias foram tratadas com resveratrol nas doses 10, 25 e 50 μ M e expostas à POG por 60 minutos. O período de recuperação foi de 24 horas. A morte celular foi quantificada pela incorporação do corante de exclusão de células saudáveis, Iodeto de Propídeo (IP), e a relação entre a fosforilação e imunoconteúdo das proteínas estudadas foram analisadas por *Western Blotting*. Os resultados mostram redução da incorporação de IP nas fatias tratadas com resveratrol (R) (Controle (C) $2 \pm 0,5\%$, CR10 $4 \pm 1\%$, CR25 $2,3 \pm 0,7\%$, CR50 $1,8 \pm 0,7\%$ POG $78 \pm 5\%$, POGR10 $44 \pm 7\%$, POGR25 $50 \pm 10\%$, POGR50 $29 \pm 4\%$ IP \pm EP, n=6, p<0,05). Foi observado aumento na relação pAKT/AKTt nas culturas expostas à POG e tratadas com resveratrol, sendo esse revertido com o uso do LY294002, inibidor da enzima PI3K (C1, CR50 $1,06 \pm 0,07$, POG $0,95 \pm 0,07$, POGR50 $1,56 \pm 0,3$, POGR50LY $1,1 \pm 0,04$ %controle \pm EP, n=6, p<0,05). Da mesma forma foi observado aumento na relação pGSK/GSKt e conseqüente diminuição de sua atividade apoptótica, efeito esse não revertido pelo inibidor LY294002 (C 1, CR50 $1 \pm 0,09$, CR50LY $0,59 \pm 0,04$, POG $0,8 \pm 0,07$, POGR50 $1,53 \pm 0,18$, POGR50LY $1,66 \pm 0,37$ %controle \pm EP, n=6, p<0,05).

Conclusões:

Os resultados mostram um efeito neuroprotetor do resveratrol e sugerem que a via PI3K/AKT pode estar envolvida. O resveratrol induziu o aumento na fosforilação/inativação da enzima GSK-3 β , o qual não foi prevenido pelo inibidor LY294002 indicando o envolvimento de outras vias também ativadas pelo resveratrol.

03.053

CARBAMAZEPINA PREVINE A ATIVAÇÃO DAS ATIVIDADES ECTONUCLEOTIDÁSICAS EM SINAPTOSSOMAS DE HIPOCAMPO E CÓRTEX CEREBRAL DE RATOS EPILÉPTICOS. ¹Cognato, G. D. P.; ¹Bruno, A. N.; ¹Silva, R. S. da.; ²Bonan, C. D.; ¹Sarkis, J. J. F.; ^{1, 2, 5}Bioquímica ICBS, UFRGS; ²Biociências PUC-RS

Objetivo:

A degradação do ATP extracelular na fenda sináptica através das enzimas ecto-ATP difosfohidrolase (apirase) e ecto-5'-nucleotidase é a principal fonte de adenosina extracelular, um anticonvulsivante endógeno. Estudos de nosso laboratório mostraram que essas atividades enzimáticas se encontram aumentadas em cérebro de ratos epiléticos. Outros estudos revelaram que agonistas dos receptores adenosinérgicos podem aumentar a ação anticonvulsivante da carbamazepina. Considerando estas informações, torna-se interessante investigar o efeito da carbamazepina sobre as atividades ectonucleotidásicas que produzem adenosina na fenda sináptica.

Métodos e Resultados:

Ratos machos adultos receberam uma injeção via i.p. de carbamazepina (30 mg/kg) e, 45 minutos após, foram submetidos ao modelo de epilepsia da pilocarpina. Também foram utilizados ratos controle que receberam solução salina e ratos epiléticos que não receberam carbamazepina. Sete dias após o tratamento, os sinaptossomas do córtex cerebral e do hipocampo dos ratos foram preparados. As atividades ectonucleotidásicas foram determinadas pelo fosfato inorgânico liberado. Foi observado que a ativação das hidrólises de ATP (37%), ADP (90%) e AMP (123%), foi completamente prevenida por uma única injeção de carbamazepina em sinaptossomas de hipocampo de ratos submetidos ao modelo da pilocarpina. Para córtex cerebral, a ativação de 32%, 41%, 77%, das hidrólises de ATP, ADP e AMP, também foram prevenidas pela carbamazepina.

Conclusões:

A investigação da relação existente entre o sistema purinérgico e fármacos anticonvulsivantes pode auxiliar no maior entendimento sobre o papel da adenosina como um agente anticonvulsivante, bem como na sua interação farmacológica com a terapia classicamente utilizada no tratamento das epilepsias.

03.054

CONTROLE DA SÍNTESE DE PROTEÍNAS POR RECEPTORES IONOTRÓPICOS: UM NOVO MECANISMO PARA REGULAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO. Cadilhe, D. V.; Cossenza, M.; Paes-de-Carvalho, R. Neurobiologia UFF

Objetivo:

A síntese de proteínas em neurônios é regulada por inúmeros sinais extracelulares podendo ser localizada em dendritos e sinapses. Diversas cinases controlam a síntese de proteínas em diferentes etapas. A ativação da eEF2 cinase (eEF2K) promove a fosforilação do fator de alongamento eucariótico 2 (eEF2) e inibe o alongamento da cadeia peptídica. A eEF2K é cálcio/calmodulina-dependente podendo ser estimulada pelo influxo de cálcio induzido pela ativação de receptores NMDA (NMDAR). Neste trabalho mostramos o envolvimento do NMDAR no controle da síntese de proteínas em células de retina em cultura.

Métodos e Resultados:

Culturas de retina de embriões de pinto foram incubadas com [³⁵S]-metionina ou [³H]-arginina e, após a lise das células com TCA 5%, a radioatividade do precipitado foi quantificada. Culturas foram também lisadas e as proteínas separadas em SDS/PAGE, e a fosfo-eEF2 (P-eEF2) determinada por western blot. NMDA (1mM) inibiu em 47.5±5.9% e 61.8±12.7% a incorporação de [³⁵S]-metionina e [³H]-arginina em proteínas, respectivamente. Observamos metade do efeito máximo em 15 minutos que foi bloqueado por MK-801 (100µM), um antagonista do receptor NMDA. O inibidor da MEK PD98059 (25µM) promoveu efeito igual ao do NMDA, mas incubação com ambos compostos não promoveu efeito sinérgico. NMDA também aumentou P-eEF2 em 15 minutos (158,4±26,7%). No entanto, PD98059 diminuiu fortemente o teor de P-eEF2 (27,9±4,3%) e o tratamento conjunto promoveu uma inibição parcial da fosforilação (75,7±1,1%).

Conclusões:

Nossos resultados indicam que a ativação de NMDAR promove aumento de P-eEF2 e inibição da síntese proteica em nossas culturas, com conseqüente aumento de L-arginina livre e produção de NO. Nós sugerimos que este mecanismo pode ser importante na regulação da formação de sinapses no desenvolvimento embrionário.

03.055

EFEITO DO LÍLIO NO METABOLISMO ENERGÉTICO DE ASTRÓCITOS. Santoro, A.; Velez, B. S. F.*; Montero-Lomeli, M. Bioquímica Médica CCS-UFRJ

Objetivo:

O transtorno bipolar (TB) é uma desordem psiquiátrica grave que acomete cerca de 1% da população mundial. O lítio é usado no tratamento do TB, mas, apesar de sua eficácia, seu mecanismo de ação ainda é desconhecido. Foi demonstrado, em leveduras, que o lítio é capaz de inibir as enzimas glicogênio sintase quinase 3-β, que controla a quebra de glicogênio, e a fosfoglicomutase, responsável pela transformação de glicose-6P em glicose-1P. Foi visto também que a superexpressão da proteína SIT4, que faz parte da via TOR, é capaz de reverter a sensibilidade das leveduras ao tratamento com lítio. Essa via é ativada por nutrientes e controla o crescimento celular regulando diversos processos como transcrição, tradução e organização da actina, por exemplo. A levedura e as células de mamíferos têm sistemas de transdução de sinais muito parecidos. O glicogênio é a única reserva de energia no cérebro e se localiza predominantemente nos astrócitos. A fim de entender o mecanismo de ação do lítio no cérebro, esse trabalho tem como objetivo ampliar os resultados obtidos em levedura para o modelo de cultura de astrócitos.

Métodos e Resultados:

Como primeiro passo foram avaliados, por western blot, a presença e o estado de fosforilação da proteína TOR em lisado de cérebro de camundongo. A mesma se mostrou presente e predominantemente no estado fosforilado. Também foi visto que a proteína se distribui de forma semelhante em cortex, cerebelo, estriado e hipocampo. Paralelamente, foi avaliado o efeito do tratamento com concentrações crescentes de lítio na proliferação dos astrócitos. Comparada com o controle, a incorporação de [³H]-timidina em células tratadas com 1mM de LiCl foi reduzida em ~62% (62,8 e 60,4%, n=2) e em ~85% (84,3 e 85,5%, n=2) quando tratadas com 2 mM.

Conclusões:

A caracterização da via TOR e dos efeitos do lítio na cultura de astrócitos serão de grande importância para o entendimento do mecanismo de ação do mesmo no tratamento do TB.

03.056

EFEITO DO VALPROATO DE SÓDIO SOBRE AS ATIVIDADES ECTONUCLEOTIDÁSICAS EM SINAPTOSSOMAS DE HIPOCAMPO E CÓRTEX CEREBRAL DE RATOS TRATADOS COM PILOCARPINA. ¹Cognato, G. D. P.; ¹Bruno, A. N.**; ¹Silva, R. S. da**; ²Bonan, C. D.; ¹Sarkis, J. J. F.; ¹Bioquímica ICBS-UFRGS; ²Biociências PUC-RS

Objetivo:

Estudos têm demonstrado que a adenosina pode agir como um anticonvulsivante endógeno. Este nucleosídeo é produzido através da degradação do ATP extracelular na fenda sináptica pela ação das enzimas ecto-ATP difosfohidrolase (apirase) e ecto-5'-nucleotidase. Foi evidenciado que essas atividades enzimáticas se encontram aumentadas em cérebro de ratos epiléticos. Outros estudos revelaram que agonistas dos receptores adenosinérgicos podem aumentar a ação anticonvulsivante do valproato de sódio. Considerando estas informações, torna-se interessante investigar o efeito do valproato de sódio sobre as atividades ectonucleotidásicas que produzem adenosina na fenda sináptica.

Métodos e Resultados:

Ratos machos adultos receberam uma injeção via i.p. de valproato (100 mg/kg) e, 30 minutos após, foram submetidos ao modelo de epilepsia da pilocarpina. Também foram utilizados ratos controle que receberam solução salina e ratos epiléticos que não receberam anticonvulsivante. Sete dias após o tratamento, os sinaptossomas do córtex cerebral e do hipocampo dos ratos foram preparados. As atividades ectonucleotidásicas foram determinadas pelo fosfato inorgânico liberado. Foi observado que a ativação das hidrólises de ATP (37%), ADP (90%) foi completamente prevenida por uma única injeção de valproato de sódio em sinaptossomas de hipocampo de ratos submetidos ao modelo da pilocarpina. A ativação das hidrólises de AMP (123%) em hipocampo e ATP (32%), ADP (41%) e AMP (77%) em córtex cerebral não foram prevenidas pelo tratamento com o valproato de sódio.

Conclusões:

Esse resultado contribui para uma melhor compreensão sobre a relação existente entre a farmacologia utilizada no tratamento da epilepsia e as ectonucleotidases, que possuem um papel importante na produção de adenosina e na manutenção e controle das crises convulsivas.

03.057

ESTUDO DOS SISTEMAS DE NEUROTRANSMISSORES DURANTE A INFECÇÃO DA RETINA PELO *TOXOPLASMA GONDII*. Barros, P. R.; Pessôa, C. N.**; Moraes, A. M. M.; Lemgruber, L.**; Vommaro, R. C.; Souza, W. D.; de Mello, F. G.; Hokoç, J. N. IBCCF-UFRJ

Objetivo:

Este estudo tem como objetivo avaliar alterações nos diversos sistemas de neurotransmissores, decorrentes da presença do *T. gondii*, em meio ao tecido retiniano, durante o desenvolvimento. Alterações nos níveis de dopamina e noradrenalina nos cérebros de camundongos cronicamente infectados com *T. gondii*, assim como, a diminuição da proliferação dos parasitos em cultura de fibroblastos humanos com drogas que agem no sistema dopaminérgico, utilizadas rotineiramente para tratamento da esquizofrenia, são achados experimentais que reforçam a idéia da infecção pelo *T. gondii* como causa de diversas alterações funcionais do SNC.

Métodos e Resultados:

Foram utilizados neste estudo taquizoítas da cepa RH, pertencente ao tipo I. Este tipo é o principal causador de infecção ocular no hospedeiro imunocompetente (homem). Culturas densas em monocamada de retina de embriões de galinha (E9C5) foram infectadas com 4×10^5 taquizoítas/poço, mantidas em cultura por 24h e fixadas para posterior reação imunocitoquímica, ou processadas para "immunoblotting". Inicialmente, foram utilizados anticorpos contra componentes do sistema GABAérgico, visando avaliar um possível tropismo e conseqüente interferência deste protozoário neste sistema, uma vez que o GABA pode também ser sintetizado a partir da putrescina, molécula essencial para a proliferação deste parasita. Foram também realizados experimentos nos quais neuro-fármacos eram adicionados às culturas 48h antes e minutos após a interação com os taquizoítas. Os nossos resultados de "immunoblotting" mostraram um aumento da expressão da enzima GAD nas culturas infectadas em relação ao grupo controle. As culturas infectadas apresentaram, através da técnica de imunocitoquímica, um aumento do número de células GABAérgicas ($145 \pm 29,4$ células/mm²) em relação ao grupo controle ($92,8 \pm 35,98$

células/mm²). O tratamento das culturas infectadas com L-Dopa levou a uma inibição de 30±14,79% na proliferação deste protozoário.

Conclusões:

O aumento do número de células marcadas para GABA, assim como da expressão da enzima que cataliza a síntese deste neurotransmissor (GAD), demonstra que a presença deste protozoário no tecido retiniano afeta o sistema GABAérgico. Concluímos também que a manipulação do sistema dopaminérgico com L-Dopa influencia o ciclo deste parasita neste tecido. No entanto, tais dados preliminares não nos permitem definir quais são as conseqüências destes efeitos sobre o sistema de neurotransmissores.

03.058

MODULAÇÃO DA CAPTAÇÃO DE ADENOSINA POR ERKS E CAMK II EM CULTURAS MISTAS E PURIFICADAS DE GLIA DE RETINA ¹Ferreira, J. M. ^{**}; ¹Rodrigues, A. S.; ²Pereira, M. R. ^{**}; ³Leão-Ferreira, L. R.; ²Paes-de-Carvalho, R. ¹Neurobiologia IBCCF-UFRJ; ²Neurobiologia UFF; ²Biologia Celular e Molecular UFF

Objetivo:

Adenosina (Ado) participa em processos de reparo celular e na neuroproteção da excitotoxicidade induzida por glutamato. A presença de Ado e de seu transportador foi observada em neurônios e células glias. Trabalhos anteriores demonstraram a participação da CAMK II na regulação do transporte de Ado em culturas de retina. O objetivo deste trabalho foi caracterizar a participação da CAMK II e da ERK na captação de Ado em culturas de diferentes células da retina.

Métodos e Resultados:

Culturas de glia eram obtidas a partir de retinas de embrião de pinto em E11, dissociadas, plaqueadas em densidade de 2,6 x 10⁵ células/cm² e mantidas a 37 °C por 21 dias (C21), com trocas de meio de 3 em 3 dias que produziam uma diminuição progressiva dos neurônios. Culturas mistas eram obtidas de embrião em E8, dissociadas, plaqueadas em densidade de 12,5 x 10⁵ células/cm² e mantidas a 37^o C por 3-4 dias, com troca de meio em C1. As culturas eram incubadas com ³H-Ado e o material captado era quantificado através de cintilação líquida. Nossos resultados demonstraram que o bloqueio do transportador de Ado com NBMPR ou da CAMK II com KN62 reduziu a captação de Ado em culturas de glia em 70,5±12,9 % (n=4) ou 55±13,4 % (n=3), respectivamente. A inibição da ERK 1/2 nas culturas de glia utilizando dois inibidores com estruturas químicas distintas (UO126 e PD 98059) reduziu em 65,8±2,7 % (n=2) e 69,8±5,0 % (n=2) a captação de Ado, respectivamente. Nas culturas mistas, o uso de UO126 e PD 98059 reduziu a captação em 58,0±1,8 % (n=2) e 69,8±5,0 % (n=2), respectivamente.

Conclusões:

A captação de Ado pode ser regulada por ambas CAMK II e ERK em culturas purificadas de glia da retina, de modo semelhante ao observado em culturas mistas.

03.059

CULTIVO PRIMÁRIO DE NEURÔNIOS DOS GÂNGLIOS DAS RAÍZES DORSAIS LOMBARES DE RATOS WISTAR NEONATOS, JOVENS E ADULTOS: UMA COMPARAÇÃO DE DUAS TÉCNICAS. Duarte, H. L. L.; Fernandes F. S. B.*; Dias, D. J.*; Cruz, J. C. Bioquímica e Imunologia UFMG

Objetivo:

No presente trabalho compararamos uma técnica, já descrita na literatura científica, de cultivo primário de neurônios sensoriais dos gânglios das raízes dorsais de ratos com outra que pretende ser mais simples e eficaz.

Métodos e Resultados:

O protocolo da primeira técnica segue descrito no J. Biol Chem 271:5953, 2002, e não será destacado. Para a segunda técnica, desenvolvida neste trabalho, os gânglios das raízes dorsais foram obtidos de ratos Wistar machos, neonatos (1-5 dias /3,0-10,0 g), jovens (21 dias/150,0-250,0 g) e adultos (±10 semanas/200,0-300,0 g), previamente anestesiados sob condições assépticas. A identificação dos gânglios do segmento lombar baseou-se na localização do nervo isquiático. Os gânglios foram retirados e armazenados em uma solução salina resfriada contendo colagenase tipo IA, posteriormente aquecida. A concentração da enzima e o tempo de aquecimento variaram

conforme a idade dos animais. Ao final deste intervalo, os gânglios foram desbastados e centrifugados. Foram realizadas 3 lavagens com DMEM com soro fetal bovino, repetindo-se o desbastamento e a centrifugação. Na última centrifugação, os neurônios foram ressuspensos e cultivados aderidos sob lamínulas. Estas foram analisadas no microscópio óptico para avaliação da qualidade da cultura e aspecto morfológico dos neurônios. A observação dos neurônios em cultura e a comparação com culturas semelhantes que utilizaram o primeiro protocolo, descrito na literatura científica, confirmaram a validade da técnica proposta.

Conclusões:

O protocolo desenvolvido neste trabalho mostrou-se mais simples e eficaz quando comparado ao outro, da literatura. O primeiro destacou-se por ser menos dispendioso de reagentes, menos complexo quanto aos tratamentos e número de etapas, e por isto mais rápido, o que garantiu uma maior integridade das células em cultura.

03.060

RECEPTORES DE GLUTAMATO MODULAM TRANSPORTE DE ÁCIDO ASCÓRBICO EM CULTURAS DE RETINA. Portugal, C. C.; Martins, R. A.; Paes-de-Carvalho, R.; Neurobiologia UFF

Objetivo:

Ácido ascórbico (AA) é um importante antioxidante encontrado em diversos órgãos, inclusive no cérebro. O transporte de AA é realizado por duas isoformas de transportadores, SVCT 1 e 2. Nesse trabalho estudamos os processos de captação e liberação de AA em culturas de retina.

Métodos e Resultados:

Culturas mistas de retina de embrião de pinto foram utilizadas para ensaios de captação ou liberação de [¹⁴C]AA. Para a captação, culturas foram pré-incubadas por 10 minutos com diferentes drogas e incubadas com [¹⁴C]AA por 40 minutos. As células eram lisadas e a radioatividade determinada por cintilação líquida. Nos experimentos de liberação, após a captação as culturas eram incubadas por períodos sucessivos de 10 minutos com diferentes tratamentos. As frações liberadas eram recolhidas e a radioatividade determinada. A captação de AA entra em equilíbrio em cerca de uma hora. O transporte estudado era de AA e não de Ácido Dehidroascórbico (ADHA), pois foi levemente bloqueado por glicose (20mM) ($28,9 \pm 3,9\%$, n=2) mas não por LY294002 (50 μM), um inibidor da PI3 cinase ($3,3 \pm 23,3\%$, n=2), tratamentos que reconhecidamente inibem o transporte de ADHA. Além disso, o transporte revelou-se dependente de sódio e foi inibido por Sulfipirazona, um bloqueador do transporte de AA ($87,7 \pm 1,8\%$, n=3). Glutamato (1mM) promoveu aumento da liberação de AA de $57,2 \pm 7,0\%$ (n=9), um efeito igualmente observado quando da estimulação com 50 μM dos agonistas kainato ($54,2 \pm 6,7$, n=4) ou NMDA ($47,2 \pm 6,4$, n=5), que por sua vez foram bloqueados por seus respectivos antagonistas DNQX 50 μM ($12,1 \pm 2,2$, n=2) e MK-801 10μM ($10,7 \pm 2,2$, n=4).

Conclusões:

Células de retina em cultura captam e liberam AA possivelmente através do SVCT-2 e a liberação de AA pode ser estimulada pela ativação de receptores ionotrópicos de Glutamato do tipo NMDA ou não-NMDA.

03.061

SINALIZAÇÃO ASPARTÉRGICA EM RETINAS DE AVES. Stutz, B.; Fleming, R. L.*; de Mello, F. G.; de Mello, M. C. F.; Yamasaki, E. N. IBCCF-UFRJ

Objetivo:

O aspartato (Asp) e o glutamato (Glu) são os principais aminoácidos excitatórios do sistema nervoso central, estando envolvidos em diversos processos como epilepsia e aprendizado. O objetivo do trabalho é caracterizar a sinalização aspartérgica ao longo do desenvolvimento da retina de aves.

Métodos e Resultados:

Explantos de retina de embriões de galinha em diferentes estágios do desenvolvimento (E13 e PE) foram incubados com ³H-D-Asp por 20 minutos e utilizados para estudos de captação. A radioatividade captada era medida e o resultado expresso em relação à quantidade de proteína total. Os dados revelam que a captação é maior em retinas embrionárias quando comparada à observada em animais pós-eclosão. A liberação de Asp foi analisada através da incubação por 2

horas com ^3H -D-Asp seguida de perfusão com solução salina de Hanks. O estímulo para liberação era feito com Glu. A radioatividade liberada era medida e os resultados expressos como liberação em relação ao total incorporado no início da perfusão. A ontogênese da liberação de Asp mediada por Glu (E8-PE) mostra uma resposta já em E8 e tem sua intensidade máxima em E13. A liberação de Asp é diretamente proporcional à concentração de Glu no meio. Os dados demonstram que tanto a captação quanto a liberação de aspartato são dependentes de Na^+ e não ocorrem em baixas temperaturas ao longo de todo o desenvolvimento.

Conclusões:

Os dados mostram que a sinalização de Asp tem início em estágios precoces do desenvolvimento da retina sendo diretamente influenciada pela concentração de glutamato do meio. A influência da temperatura e da concentração de Na^+ sugerem que a liberação ocorra via transportador, possivelmente por troca Glu/Asp. Como Asp é seletivo para a ativação de receptores NMDA (Neurochem. Int. 32:47, 1998), a heterotroca Glu/Asp pode ter importância na modulação seletiva de receptores NMDA da retina.

03.062

EFEITO DO TRATAMENTO CRÔNICO COM LÍLIO NA MORTE CELULAR INDUZIDA POR ATP. Wilot, L.C.**; Frozza, R. L.*; Bernardi, A.**; Marques, A. L.; Cimarosti, H. I.**; Salbego, C. G.; Rocha, E. R. da; Battastini, A. M. O. Bioquímica ICBS-UFRGS

Objetivo:

Levando em consideração que a morte celular mediada pelo ATP tem sido descrita em vários modelos e em diferentes tipos celulares, e que, recentemente, muitos estudos com culturas de células, modelos animais e também em humanos, associam o lítio a uma ação neuroprotetora, decidimos investigar o papel neuroprotetor do lítio na morte celular induzida por ATP.

Métodos e Resultados:

Fatias de hipocampo de ratos Wistar machos, com 60 dias de idade, foram expostas a diferentes concentrações de ATP (0,1; 0,5; 3,0 e 5,0 mM) e a diferentes tempos de incubação (1, 4, 12, 18 e 24h). A morte celular foi quantificada pela medida da enzima citosólica lactato desidrogenase (LDH) liberada pelas fatias. As concentrações de ATP 0,1mM e 0,5mM não causaram aumento significativo na liberação da LDH em todos os tempos de incubação testados quando comparados aos respectivos controles. Na concentração de 3mM o ATP aumentou significativamente a liberação da LDH após 24h de incubação (26,2% em relação ao controle, $p < 0,05$). O tratamento com ATP 5mM, após 12, 18 e 24h causou um aumento de 27,8%, 29,7% e 37,9% ($p < 0,05$), respectivamente, na liberação da LDH de fatias hipocâmpais. As fatias de hipocampo de ratos que foram tratados cronicamente com lítio e incubadas com ATP 5mM mostraram uma redução significativa na liberação da LDH em relação aos respectivos grupos controle após 12, 18 e 24h, com percentuais de decréscimo de 23,8%, 21,4% e 27,6% ($p < 0,05$), respectivamente. Além disso, as fatias de ratos que foram tratados cronicamente com lítio, mas não receberam tratamento com ATP, também apresentaram uma redução significativa na liberação de LDH quando comparadas com os grupos controle após 18 e 24h e o percentual foi de 3,97% e 2,5% ($p < 0,05$).

Conclusões:

Os resultados obtidos nos permitem sugerir um efeito protetor do lítio tanto na morte induzida por concentrações citotóxicas de ATP quanto na morte espontânea do tecido.

03.063

DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA ACETILCOLINESTERASE *IN VITRO* EM CÉREBRO DE RATOS ADULTOS NA PRESENÇA DE AMINOPIRAZÓIS. Spanevello, R. M.; Cargnelutti, D.*; Mazzanti, C.**; Kaizer, R.**; Hannel, L.*; Becker, L.*; Tavares, L. ; Schetinger, M. R. C.; Braibante, M.; Braibante, H.; Morsch, V. M. Química, UFSM

Objetivo:

A enzima acetilcolinesterase (AChE) é um importante alvo terapêutico em doenças neurodegenerativas. Inibidores desta enzima vêm sendo amplamente utilizados para o tratamento da Doença de Alzheimer. O objetivo do presente trabalho foi avaliar *in vitro* o potencial de inibição de 3-Fenil-5-Metilamino-Pirazol (A) e 5-Benzilamino-3-Fenil-Pirazol (B) sobre a atividade da AChE em estriado e hipocampo de ratos.

Métodos e Resultados:

Ratos machos Wistar adultos (n=5) foram submetidos à eutanásia. As estruturas cerebrais foram separadas e atividade da AChE foi determinada por espectrofotometria à 412nm. Os compostos testados foram dissolvidos em metanol e introduzidos diretamente no ensaio nas concentrações: 0 (controle); 0,015; 0,031; 0,0625; 0,125 e 0,250mM. Os dados foram analisados por MANOVA de duas vias, seguido do teste de Duncan ou teste-t quando apropriado. Os resultados obtidos demonstraram que o composto A não inibiu a atividade da AChE no estriado em nenhuma das concentrações testadas. No hipocampo houve uma inibição significativa na concentração de 0,125 mM ($5,57 \pm 0,32$, n=5, SEM; $p < 0,05$) em relação ao grupo controle ($6,36 \pm 0,46$). O composto B inibiu significativamente a atividade da AChE no estriado nas duas maiores concentrações testadas de 0,125 mM ($24,13 \pm 1,03$, n=5, SEM; $p < 0,05$) e 0,250mM ($20,72 \pm 1,10$, n=5, SEM; $p < 0,05$) comparado com o grupo controle ($26,19 \pm 1,29$). No hipocampo este composto inibiu somente na maior concentração de 0,250mM ($5,69 \pm 0,30$, n=5, SEM; $p < 0,05$) em relação ao controle ($6,81 \pm 0,25$).

Conclusões:

Dos dois compostos avaliados 5-Benzilamino-3-Fenil-Pirazol foi mais eficaz em inibir a AChE tanto no estriado como no hipocampo; sugerindo que esse composto poderá ser utilizado em doenças neurodegenerativas.

03.064

EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO INTRASTRIATAL DE $MnCl_2$ E $HgCl_2$ SOBRE A LIBERAÇÃO DE DOPAMINA ESTIMULADA POR DESPOLARIZAÇÃO. ¹Adáu, L. V.; ²Durán, R.; ¹Alfonso, M.; ¹Campos, F. ^{**}; ²Santana, M. B. D. ^{**}; ²Rodrigues, K. J. A. R. ^{**}; ²Faro, L. R. F. ¹Biología Funcional y Ciencias de la Salud Universidad de Vigo Espanha; ²Fisiología CCB-UFP

Objetivo:

O manganês e o mercúrio são metais amplamente distribuídos no meio ambiente e que são extremamente tóxicos para o SNC. A intoxicação por manganês produz um quadro clínico caracterizado por alterações motoras como distonia, bradicinesia e rigidez muscular, enquanto que o mercúrio produz tremores e eretismo mercurial. O objetivo deste trabalho é avaliar o efeito dessas substâncias sobre a liberação in vivo de dopamina (DA) estimulada por despolarização no núcleo estriado de ratos.

Métodos e Resultados:

O $MnCl_2$ e o $HgCl_2$, diluídos em meio Ringer com 100 e 75 mM de KCl, respectivamente, foram administrados diretamente no núcleo estriado de ratos Sprague-Dawley (280-300g, 5 por grupo) através de uma membrana de microdiálise. As amostras de dializado foram coletadas a cada 20 min, no caso do $MnCl_2$ e a cada 15 min, no caso do $HgCl_2$. Os níveis de DA foram medidos mediante um sistema de HPLC com detecção eletroquímica. A análise estatística foi feita por ANOVA e teste de Student-Newman-Keuls. Diferenças significativas: $P < 0,01$ e $0,001$. A administração intraestriatal de meio Ringer com 100 mM de KCl produziu um aumento nos níveis de DA de 1651(295% ($p < 0,001$), enquanto que a coadministração junto com 2 mM de $MnCl_2$ produziu um aumento nos níveis extracelulares de DA de apenas 607(159% ($p < 0,001$), em relação aos níveis basais. No caso da administração do meio com 75 mM de KCl o aumento foi de 2246 ± 259 ($p < 0,001$) e a coadministração junto com 1 mM de $HgCl_2$ produziu um aumento de $1215 \pm 366\%$ ($p < 0,01$), em relação ao basal.

Conclusões:

Portanto, a administração intraestriatal tanto de $HgCl_2$ quanto de $MnCl_2$ reduz a liberação de DA estimulada por despolarização com K^+ no núcleo estriado.

03.065

EFEITOS DE PESTICIDAS SOBRE A LIBERAÇÃO *IN VIVO* DE DOPAMINA ESTRIATAL. ¹Faro, L. R. F.; ¹Santana, M. B. D. ^{**}; ¹Rodrigues, K. J. A. R. ^{**}; ²Campos, F. ^{**}; ²Vidal, L. ^{**}; ²Cervantes, R. C. ^{**}; ²Alfonso, M.; ²Duran, R. ¹Fisiología CCB-UFP; ⁴Biología Funcional Ciências Salud Universidad de Vigo Espanha

Objetivo:

Os pesticidas são agentes tóxicos capazes de causar sérios problemas à saúde humana. Entre os efeitos bioquímicos produzidos pelos pesticidas estão a inibição da atividade enzimática, como a acetilcolinesterase (Marrs, Pharmacol. Ther. 5, 51, 1993), produção de radicais livres (Corasaniti, Funct. Neurol. 6, 385, 1991), interferência com os canais de membrana e inibição do transporte de elétrons (Kackar, Indian J. Exp. Biol. 37:553, 1999). Este trabalho tem por objetivo estudar o efeito de diferentes tipos de pesticidas sobre a liberação in vivo de dopamina (DA) estriatal.

Métodos e Resultados:

Foram utilizados ratos Sprague-Dawley adultos (230-280 g, 5 por grupo), aos quais administrou-se diretamente no núcleo estriado MANEB, Dicofol, DDT, Paraquat e Lindano (1 mM), através de uma sonda de microdiálise cerebral. Os níveis de DA, obtidos por microdiálise, foram medidos por um sistema de HPLC com detecção eletroquímica. A análise estatística foi feita por ANOVA e teste de Student-Newman-Keuls. Diferenças significativas: $P < 0,05$ e $0,01$.

Conclusões:

A administração dos diferentes tipos de pesticidas produziu os seguintes efeitos máximos sobre os níveis extracelulares de DA: Maneb 791+187%; Dicofol 101+0,7%; DDT 683+65%; Paraquat 956+80%; Lindano 281+28%. Portanto, todos os pesticidas utilizados produziram aumentos nos níveis extracelulares de DA, sendo que, nessas condições experimentais, os pesticidas que apresentaram maior efeito foram o Paraquat e o Maneb. A exceção foi o Dicofol que, na concentração de 1 mM, não produziu efeitos significativos sobre os níveis de DA. Estes resultados mostram que os pesticidas aqui utilizados induzem a liberação in vivo de dopamina estriatal medida por microdiálise cerebral.

03.066

INVESTIGAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DAS PROTEÍNAS ERK E GSK3B NO EFEITO NEUROPROTETOR DO PRÉ-CONDICIONAMENTO ISQUÊMICO. Horn, A. P.; Simão, F. **; Nassif, M. C. **; Zamin, L. L. **; Cimarosti, H. I. **; Salbego, C. G. Bioquímica ICBS-UFRGS

Objetivo:

O condicionamento isquêmico (PC) é um mecanismo endógeno no qual um curto período de isquemia, não letal para as células neuronais de regiões vulneráveis do cérebro, pode proteger estas células contra uma isquemia mais severa. Estudos recentes têm mostrado que vários aspectos podem estar envolvidos nessa tolerância, como redução da produção de radicais livres e ativação de mecanismos anti-apoptóticos. O objetivo desse trabalho é estudar alterações nas proteínas ERK e GSK3 β para investigação dos possíveis mecanismos moleculares envolvidos na neuroproteção induzida pelo PC.

Métodos e Resultados:

Foram utilizadas culturas organotípicas de hipocampo de ratos Wistar machos, cultivadas por 14 dias. O PC consistiu de uma privação de oxigênio e glicose (POG) de 15min (subletal) 48h antes da POG de 45min (letal). Os resultados de incorporação do iodeto de propídeo (IP) mostraram uma grande marcação na região CA1 24h após a POG letal (%controle+EP; n=15; $p < 0,05$) de $62 \pm 1,5$ que foi diminuída quando as culturas foram condicionadas com a POG subletal $36 \pm 0,9$. A fosforilação (%controle+EP, n=4 para ERK e n=2 para GSK3 β , $p > 0,05$) das proteínas ERK (grupo PC= $121,8 \pm 31,8$; grupo POG= $86,5 \pm 22,1$; grupo PC+POG= $92,5 \pm 36,5$) e GSK3 β (grupo PC= $166,2 \pm 17$; grupo POG= $103,7 \pm 25,5$; grupo PC+POG= $122,7 \pm 25$) não foi alterada em nenhum dos tratamentos. Por outro lado, o imunoconteúdo de ambas as proteínas diminuiu 24h após a POG ($55,3 \pm 3,6$, n=4, $p < 0,05$ e $57,4 \pm 16,5$, n=2, respectivamente) e após o PC+POG ($51,4 \pm 7,4$; n=4; $p < 0,05$ e $24,5 \pm 2,2$, n=2 respectivamente), sugerindo que o condicionamento não reverte essa diminuição.

Conclusões:

O condicionamento das culturas com uma POG subletal foi capaz de diminuir a morte celular na região CA1 do hipocampo, mostrando-se um bom modelo para o estudo de mecanismos moleculares de neuroproteção. Os primeiros experimentos realizados mostram uma diminuição do imunoconteúdo de ERK e GSK3 β após a POG, o qual não é revertido pelo PC. A fosforilação dessas proteínas parece não sofrer alteração em nenhum dos grupos experimentais.

03.067

NEUROTOXICIDADE DO PEPTÍDEO A β ₄₂ EM CULTURA ORGANOTÍPICA DE HIPOCAMPO DE RATOS E POSSÍVEL ENVOLVIMENTO DA PROTEÍNA GSK-3. Hoppe, J.; Nassif, M.^{**}; Santin, K.*; Frozza, R. L.*; Horn, A. P.^{**}; Zamin, L. L.^{**}; Simão, F.^{**}; Salbego, C. G. Bioquímica ICBS-UFRGS

Objetivo:

Investigação da neurotoxicidade do peptídeo A β ₄₂, envolvido na Doença de Alzheimer, e de um possível mecanismo de morte celular através da quantificação da fosforilação e imunoconteúdo da glicogênio sintase quinase-3 β (GSK-3 β), proteína envolvida em vias pró-apoptóticas.

Métodos e Resultados:

Foi realizada cultura organotípica de fatias hipocampais de ratos Wistar machos de 6-8 dias. As fatias foram cultivadas por 14 dias e então tratadas com o peptídeo A β ₄₂ (Calbiochem) nas concentrações de 10 e 20uM. Os tempos de tratamento foram de 24 e 72hs. A morte celular foi avaliada pela incorporação do corante iodeto de propídeo (IP). Após a captura das imagens para quantificação da morte celular, as fatias foram solubilizadas, e as proteínas separadas por eletroforese e imunoquantificadas por *Western Blotting* para avaliação da fosforilação/inativação da proteína GSK-3 β . A quantificação foi realizada através do programa Optiquant, e a análise estatística ANOVA seguida de Tukey (p<0,05) foi utilizada para analisar os resultados. Foi detectada diferença significativa (% controle \pm E.P., n=6) no aumento da incorporação de IP na dose 10uM (33,4% \pm 7, p<0,001) e na de 20uM (58,87% \pm 6, p<0,001) apenas no tempo 72hs de tratamento. No tempo 24hs, não houve diferença significativa entre as doses e o controle. Não foi observada alteração no grau de fosforilação/inativação da enzima nos tratamentos e tempos referidos (p>0,05, n=3).

Conclusões:

Esses resultados demonstram que o peptídeo A β ₄₂ induziu a morte celular apenas quando exposto por um tempo mais prolongado (72hs) de tratamento às fatias, bem como, somente a maior dose (20uM) apresentou neurotoxicidade. Os resultados ainda sugerem que a proteína GSK-3 β pode não estar envolvida no mecanismo de morte desencadeado pelo peptídeo, já que a presença de A β ₄₂ não foi capaz de alterar seu grau de fosforilação e tampouco seu imunoconteúdo. Estudos posteriores serão realizados a fim de examinar o papel de outras proteínas de sinalização celular (PDK, Akt, ERK) no mecanismo de morte celular pelo peptídeo A β ₄₂.

03.068

ENVOLVIMENTO DA PROTEÍNA ÓXIDO NÍTRICO SINTASE INDUZÍVEL (iNOS) NA NEUROTOXICIDADE PROVOCADA PELO PEPTÍDEO A β ₄₂ EM CULTURA ORGANOTÍPICA DE HIPOCAMPO DE RATOS. Santin, K.; Nassif, M. C.^{**}; Hoppe, J.*; Frozza, R. L.*; Salbego, C. G. Bioquímica ICBS-UFRGS

Objetivo:

Verificação da neurotoxicidade do peptídeo A β ₄₂, envolvido na Doença de Alzheimer, e de um possível mecanismo de dano celular através da quantificação do imunoconteúdo da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), que sintetiza óxido nítrico (NO). O NO parece contribuir para a neurotoxicidade e, conseqüentemente, para o dano tecidual em doenças neurodegenerativas.

Métodos e Resultados:

Foi realizada cultura organotípica com fatias hipocampais de ratos Wistar machos de 6-8 dias. As fatias foram cultivadas por 14 dias e então tratadas com o peptídeo A β ₄₂ (Calbiochem) nas concentrações de 10 e 20uM. Os tempos de tratamento foram de 24 e 72hs. O dano celular foi quantificado pela incorporação do iodeto de propídeo (IP), corante marcador excluído de células saudáveis. O imunoconteúdo da proteína iNOS foi avaliado por *Western blotting* e quantificado através do programa Optiquant. A análise estatística utilizada foi ANOVA seguida de teste de Tukey (p<0,05). Os resultados mostraram um aumento na incorporação de IP (%controle \pm E.P.) na dose 10uM (33,4% \pm 7, p<0,001) e na de 20uM (58,9% \pm 6, p<0,001) apenas no tempo 72hs de tratamento (n=6). No tempo 24hs, não houve diferença significativa entre as doses e o controle. Após a avaliação da morte com IP, as fatias foram solubilizadas em tampão de lise e submetidas à separação eletroforética, e as proteínas detectadas e quantificadas por *Western Blotting*, seguida de revelação em filme radiográfico. O tratamento das fatias com A β ₄₂ levou ao aumento

significativo do imunoconteúdo de iNOS apenas na dose de 20uM no tempo de 72hs de tratamento ($166\% \pm 20$, $p < 0,05$, $n=3$). Não foi observada diferença significativa na dose de 10uM, tanto em 24 como em 72hs.

Conclusões:

Esses resultados demonstram que a morte celular foi observada apenas quando as culturas ficaram expostas ao peptídeo por um tempo mais prolongado (72hs), bem como, somente a maior dose (20uM) apresentou neurotoxicidade. Com os dados da imunodeteccção, concluímos que a proteína iNOS pode estar envolvida no mecanismo de morte celular na dose de 20uM, pois seu imunoconteúdo está aumentado significativamente no tempo e dose referidos.

03.069

ATIVACÃO DE RECEPTORES A_{2A} DE ADENOSINA INDUZ INIBIÇÃO DA SÍNTESE DE PROTEÍNAS EM CULTURA DE RETINA DE EMBRIÃO DE *GALLUS DOMESTICUS* ¹ Conceição, M. M.; ² Paes-de-Carvalho, R.; ^{1,2} Neurobiologia, UFF

Objetivo:

A compreensão dos mecanismos envolvidos na síntese de proteínas e sua regulação é de extrema relevância devido ao seu envolvimento em inúmeros fenômenos biológicos. Adenosina modula a adenilil ciclase na retina através da ativação de receptores A_1 e A_{2a} que diminuem ou aumentam os níveis de AMPc, respectivamente. Através da utilização de culturas de retina de embrião de galinha, estudamos as conseqüências da estimulação farmacológica dos receptores A_{2a} de adenosina na síntese de proteínas.

Métodos e Resultados:

Culturas de retina de embrião de galinha foram tratadas com DMPA (100 nM) e adenosina desaminase (0,1 U/ml) por 30 minutos e em seqüência incubadas com [³⁵S]-Metionina por mais 60 minutos. As células foram lisadas com TCA 5% e a incorporação da radioatividade às proteínas avaliada por cintilação líquida. Em nosso modelo, o aumento nas concentrações do AMPc induzido pelo tratamento, promoveu a inibição na síntese global de proteínas em $16,3 \pm 3,3\%$ em culturas densas e em $31,6 \pm 4,2\%$ em culturas semi-densas ($n=3$), não sendo observado efeito em culturas purificadas de neurônios. O efeito máximo alcançado está relacionado ao tipo de cultura (semi-densa), ao estágio de desenvolvimento (E8C3 - oitavo dia do desenvolvimento embrionário e terceiro dia de cultura) e à concentração de DPMA (100 nM). O efeito primário observado em culturas densas foi mimetizado pela forskolina ($11,5\% \pm 0,6$).

Conclusões:

O aumento nos níveis intracelulares de AMPc induz inibição da síntese global de proteínas o que está de acordo com os resultados descritos na literatura que apontam o envolvimento da PKA na ativação da eEF2-K que age fosforilando o eEF2, inibindo o alongamento das cadeia polipeptídicas nascentes.

03.070

CARACTERIZAÇÃO DO RECEPTOR PURINÉRGICO $P2X_2$ EM CÉLULA GLIAL 1321N1 TRANSFECTADAS. Trujillo, C.A.; Majumder, P. *; Ulrich, A. H. Bioquímica IQ-USP

Objetivo:

Caracterizar a expressão, atividade e farmacologia do receptor $P2X_2$ de rato em astrocitoma 1321N1 transfectado.

Métodos e Resultados:

Imunofluorescência: Após as células serem fixadas, lavadas e permeabilizadas, adicionou-se anticorpos anti- $P2X_2$. Western Blot: O extrato de membrana foi submetido a SDS-PAGE e as proteínas transferidas para membrana de nitrocelulose, incubada com anticorpos e revelada. Microscopia Confocal: As células foram coradas com fluo-3AM, e o cálcio intracelular quantificado. Binding: A ligação entre ^{32}P α ATP e as membranas com $P2X_2$ foi medida por ensaio de filtro em diferentes concentrações de ATP e suramina para mesma de proteína. O complexo receptor-radioligante precipitou nos filtros e a radiação foi quantificada. Eletrofisiologia: realizamos experimentos baseado na técnica de whole-cell e ao método cell-flow de cinética rápida. Resultados: Imunofluorescência e Western Blot: determinamos a expressão do $P2X_2$ por toda membrana da célula. Binding: caracterizamos o equilíbrio de ligação entre a suramina e o ATP no

sítio de P2X2. Microscopia Confocal e Eletrofisiologia: demonstramos a atividade do receptor e o influxo de íons na célula em resposta ao ATP.

Conclusões:

Caracterizamos a expressão do receptor, bem como sua resposta ao ATP em ensaios de ligação, eletrofisiologia e variação intracelular de cálcio. Portanto, poderemos compreender o mecanismo de ativação e inativação dos receptores com implicações para terapias e dependência de drogas.

03.071

EFEITO PROTETOR DA ESPERMINA NO MODELO DA DOENÇA DE HUNTINGTON É DOSE-DEPENDENTE. ¹Bellé, N. A. V.; ¹Dalmolin, G. D. **; ¹Fonini, G.*; ¹Sinhorin, V. D. G. **; ¹Rubin, M. A.; ²Mello, C. F. D.; ¹Química UFSM; ²Fisiologia UFSM

Objetivo:

O ácido quinolínico (AQ), um agonista do receptor NMDA, quando administrado no estriado de ratos reproduz o modelo da doença de Huntington (DH), uma desordem neurodegenerativa. A espermina (SPM), uma droga poliamínica e moduladora do receptor NMDA, demonstrou atenuar as alterações comportamentais neste modelo de DH. Com o propósito de pesquisar uma possível terapêutica para esta desordem neurológica, o objetivo deste trabalho foi investigar o efeito de várias doses de SPM sobre o comportamento estereotipado, caracterizado por rotações contralaterais, induzido por administração intraestriatal de AQ.

Métodos e Resultados:

Foram utilizados ratos Wistar machos adultos canulados no estriado dorsal direito. Estes animais receberam uma primeira injeção de 1 µL de salina 0,9% ou SPM nas seguintes doses: 0,01; 0,1; 1 ou 10 nmol. Após 15 minutos, foi realizada uma segunda injeção de 1 µL de salina 0,9% ou AQ 180 nmol. Os animais foram transferidos imediatamente para um campo aberto para observação. Os parâmetros observados foram número de cruzamentos, respostas de levantar, tempo de limpeza e número de rotações contralaterais. O AQ induziu o aparecimento de rotações contralaterais [$20,9 \pm 2,6$; $F_{(1,146)} = 228,64$; $P < 0,001$; $n=20$]. SPM, na dose de 0,1 nmol, aumentou significativamente o número de rotações contralaterais [$29,8 \pm 4,3$; $F_{(4,146)} = 9,65$; $P < 0,001$, $n=12$] enquanto as doses de 0,01 e 1 nmol não alteraram o número de rotações. A única dose de SPM capaz de atenuar significativamente o comportamento estereotipado induzido pelo AQ foi a de 10 nmol [$7,8 \pm 1,1$; $F_{(4,146)} = 9,65$; $P < 0,001$, $n=20$]. Não houveram alterações significativas nos demais parâmetros comportamentais.

Conclusões:

A SPM demonstrou ser neuroprotetora, neste modelo de DH, apenas na dose de 10 nmol. Nas doses 0,01 e 1 nmol a SPM não demonstrou efeito e na dose de 0,1 nmol ela agravou as alterações comportamentais induzidas por injeção intraestriatal de AQ.

03.072

BIPHASIC EFFECT OF INOCULATION OF SCHWANN CELLS ON THE COMBINED BEHAVIOR SCORE (CBS) OF NYU IMPACTOR CONTUSE LESIONED SPINAL CORD RATS IS ALTERED WHEN CELLS ARE PRE-TREATED WITH TNF-ALFA. Guzen, F. P.; de Luca, B. A*; Cunha, J. C*; Taneda, M.*; Andrade, M. S. R. D. **; Gomide, V. C. **; Chadi, G. Anatomia ICB III-USP

Objetivo:

It is known that the cytokines modulate the repair-promoted effects of Schwann cells (SC) on injured nerves probably by triggering the expression of neurotrophic molecules. Cultured SC also induce regeneration of lesioned spinal cord which can also be modulated by inflammatory cytokines. On the other hand, pro-inflammatory cytokines may impair the process of regeneration by interfering with myelin formation and fiber growth. The aim of the present study was to investigate whether the cytokine tumor necrosis factor alpha (TNF-α) can modify the ability of primary cultured SC to induce motor recover on NYU Impactor contuse lesioned rat spinal cord.

Métodos e Resultados:

Material and Methods: Primary cultured SC were pre-treated with TNF-α(30ng/ml) for 30 min or not. Young rats were submitted to a laminectomy (T10-11) and spinal cord received a moderate contuse lesion by means of a 25 cm drop of a 10 g rod promoted by the Impactor. Sham animals received laminectomy without cord lesion. Lesioned rats received injections of SC, with or without pre-

treatment with TNF- α . A volume of 10 ml SC (100,000 to 150,000/ml of cultured medium) was injected stereotaxically in the epicenter of the cord lesion immediately after injury. Sham rats received local injection of culture medium alone. The functional recovery of the hindlimbs of the rats was assessed through a combined behavior score (CBS) during 8 weeks. Results: Impactor parameters demonstrated the moderate contuse lesion applied in the spinal cord. The CBS score show a better hindlimb function in the rats treated with SC alone 48hs, 72hs and 1 week after surgery as well at the 5th, 6th, 7th, and 8th weeks post injury compared with the lesioned rats that were not treated with SC. The above described effect was observed in the lesioned rats that received SC pre-treated with TNF- α only at 48 hours time-interval.

Conclusões:

It is concluded that SC inoculation in contuse lesioned spinal cord improves hindlimb motor function. The manipulation of the SC to increase the ability of the cells to promote functional recovery needs to be further investigated.

03.073

DETECTION AND FUNCTIONALITY OF NICOTINIC ACETYLCHOLINE RECEPTORS DURING NEURONAL DIFFERENTIATION OF PC12 PHEOCHROMOCYTOMA CELLS. ¹Nery, A.; ²Martins, A. H. B.**; ¹Trujillo, C.A.*; ¹Ulrich, H. ¹Bioquímica IQ-USP; ²Biofísica UNIFESP

Objetivo:

The present work aims at the characterization of expression and activity of nicotinic acetylcholine receptors during neuronal maturation of rat pheochromocytoma PC12 cells. Gene expression was detected and quantified by real-time PCR and receptor functionality was confirmed by voltage clamp whole-cell recordings.

Métodos e Resultados:

The PC12 cell line is a widely accepted model system for studying neuronal differentiation *in vitro*. In the presence of basic fibroblast growth factor (bFGF) and dibutyl-cAMP nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) activity was increase during the course of differentiation, as determined by fast kinetic whole-cell recording. When undifferentiated PC12 were stimulated by 1.5 mM carbamoylcholine (CCh), a stable nAChR agonist, at a holding potential of -70 mV an average current of 122 ± 8 pA was obtained. On the first day and seventh day of neuronal differentiation, currents obtained under the same experimental conditions raised to 1407 ± 253 and 7165 ± 615 pA, respectively.

In agreement with these data, mRNA transcription levels of α_7 nAChR subtypes increased by a factor of 2.2 at the beginning of differentiation, whereas gene expression of α_3 , α_5 , α_2 , α_4 remained unchanged. On the first day, we observed a peak of gene expression of the α_7 subunit as determined by real-time PCR, whereas the peak of α_7 receptor activity was found on the second day. α_7 receptor activity was determined as the fraction of CCh-induced current which could be inhibited by a 10nM concentration of the α_7 receptor antagonist methyllycaconitine citrate (MLA). On the second day, the fraction of current which was inhibited by MLA increased from 20 to 50 %, and decreased again below 20 % on the seventh day of differentiation.

Conclusões:

Our results showed that activity and expression of the nAChR subunits are modulated during the course of neuronal differentiation, with the α_7 subunit expressed in the beginning of differentiation. Since α_7 receptors form channels which are highly permeable for calcium ions, this nAChR receptor subtype may be important for calcium signaling in the onset of differentiation.

03.074

DIMINUIÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE TOTAL POR ÁCIDO PROPIONICO *IN VITRO* EM RIM DE RATOS JOVENS. ¹Zandoná, B. R.; ¹Ricalde, S. R.**; ¹Rufatto, S.**; ¹Sgarbi, M. B.*; ¹Wajner, M.; ²Belló-Klein, A.; ¹Dutra-Filho, C. S. Bioquímica ICBS-UFRGS; ²Fisiologia UFRGS

Objetivo:

A acidemia propiônica caracteriza-se pela deficiência de propionil-CoA carboxilase o que provoca o acúmulo de ácido propiônico nos tecidos e fluidos biológicos. Os pacientes apresentam episódios de vômito, desidratação e severa acidose metabólica (precipitados por ingestão de proteína), além de convulsões, hipotonia muscular e retardo no desenvolvimento neuropsicomotor. Cronicamente,

ocorre comprometimento renal. No presente estudo, investigamos o efeito do ácido propiônico (1 e 5 mM) sobre alguns parâmetros bioquímicos de estresse oxidativo em rim de ratos.

Métodos e Resultados:

Foram estudados o potencial antioxidante total (TRAP), quimiluminescência e medida de glutatona em homogeneizado e grupos sulfidrilas em preparação de membrana de mitocôndria (tióis protéicos) de rim de ratos de 28 a 30 dias de vida. Foi observado que o ácido propiônico não alterou as medidas de quimiluminescência em homogeneizado de rim, indicando que não houve estímulo da lipoperoxidação. A medida de tiol protéico aumentou significativamente neste tecido (até 45%), sugerindo alteração do estado redox tiol/dissulfeto de proteínas. A medida do TRAP foi reduzida significativamente pelo ácido propiônico (até 30%), sugerindo um comprometimento na capacidade antioxidante não enzimática total desse tecido, mas a medida de glutatona não apresentou alteração.

Conclusões:

Nossos resultados sugerem que o ácido propiônico *in vitro* não afeta a lipoperoxidação, porém diminui as defesas antioxidantes não-enzimáticas em homogeneizado e altera o estado redox tiol/dissulfeto de proteínas de membrana de mitocôndria em rim de ratos jovens.

03.075

EFEITO *IN VIVO* E *IN VITRO* DA FLUOXETINA SOBRE AS ATIVIDADES ECTONUCLEOTIDÁSICAS EM SINAPTOSSOMAS DE HIPOCAMPO DE RATOS ¹ Pedrazza, E. L.; ²Sarkis, J. J. F.; ¹Bonan, C. D.; ¹Ciências Fisiológicas PUC-RS; ²Bioquímica ICBS-UFRGS

Objetivo:

Existem evidências sobre o papel do ATP e da adenosina como neurotransmissores e neuromoduladores no sistema nervoso central. As ações sinalizadoras induzidas pelo ATP extracelular estão relacionadas à atividade das ectonucleotidases, pois elas catalizam a conversão do ATP até adenosina, controlando os níveis de nucleotídeos e nucleosídeos na fenda sináptica. Este grupo de ecto-enzimas inclui uma ATP difosfohidrolase, uma ecto-ATPase e uma ecto-5'-nucleotidase. Estudos têm demonstrado o efeito da fluoxetina sobre algumas ATPases, porém não existem relatos da sua ação sobre as ectonucleotidases. O objetivo desse estudo foi demonstrar o efeito "in vitro" e "in vivo" da fluoxetina sobre as atividades ectonucleotidásicas em sinaptossomas de hipocampo de ratos.

Métodos e Resultados:

Nos ensaios "in vivo" os animais recebiam uma dose de 10mg/Kg intraperitonealmente de fluoxetina 1 hora antes de serem sacrificados, já nos ensaios "in vitro" foram adicionadas diferentes concentrações (100, 250 e 500µM) da droga ao meio de incubação das enzimas. Os sinaptossomas eram preparados de acordo com Nagy & Delgado-Escueta, 1984. A atividade das enzimas foi determinada de acordo com Battastini et al., 1991. A determinação do fosfato inorgânico foi realizada de acordo com Chan et al., 1986. A dosagem de proteína foi feita pelo método de Coomassie Blue, utilizando albumina bovina sérica como padrão (Bradford, 1976). Os resultados mostraram que a droga diminuiu a atividade da ATP-difosfohidrolase "in vitro" nas concentrações de 100, 250 e 500µM na presença do nucleotídeo ATP (67%, 79% e 82% respectivamente) e na presença do nucleotídeo ADP (50%, 63% e 68% respectivamente). Porém, não foram observadas alterações na atividade da ecto-5'-nucleotidase nas doses testadas. Os resultados do tratamento "in vivo" mostraram um aumento significativo na hidrólise do ATP (20,91%), mas não foram observadas alterações na hidrólise de ADP e AMP.

Conclusões:

Nossos resultados demonstram que a fluoxetina, uma droga utilizada no tratamento da depressão, é capaz de modular a via de formação de adenosina extracelular, um importante neuromodulador.

03.076

EFEITO DE NORADRENALINA EM RECEPTORES DOPAMINÉRGICOS (D1) EM RETINA EMBRIONÁRIA DE AVES. ¹Kubrusly, R. C. C.; ¹Serra, G. D. C. F.*; ²Ventura, A. L. M.; ³Reis, R. A. M.; ³de Mello, M. C. F.; ³de Mello, F. G.; ¹Fisiologia, UFF; ²Neurobiologia, UFF; ³IIBCCF-UFRJ

Objetivo:

A retina de aves tem a capacidade de responder a estímulos dopaminérgicos e noradrenérgicos aumentando os níveis intracelulares de AMPc, desde o período embrionário de 7 dias (E7). Neste trabalho, investigaremos de que forma a noradrenalina (NE) medeia o aumento de AMPc em retinas indiferenciadas de aves já que este tecido não apresenta enzimas de síntese ou receptores noradrenérgicos descritos.

Métodos e Resultados:

Retinas de embriões de 7 dias (E7), 14 dias (E14) foram dissecadas e incubadas em meio MEM contendo 0,5mM de IBMX (inibidor da fosfodiesterase) por 20 minutos. Dopamina (DA) ou NE (100 μ M) foram incubadas por 15 minutos e a reação foi interrompida com ácido tricloroacético para dosagem do AMPc. Ambas as catecolaminas promoveram um aumento de AMPc na ordem de 5 vezes (DA = 350 \pm 20, NE=310 \pm 25 pmoles/mgptn n=5) em relação ao controle (180pmoles/mgptn) porém isoproterenol, um agonista α 1 não teve qualquer efeito. O EC₅₀ da noradrenalina para acúmulo de AMPc foi de 30 μ M e este efeito foi inteiramente bloqueado por 2 μ M SCH23390 (antagonista D1 dopaminérgico) mas não por 50 μ M alprenolol (antagonista α 1 adrenérgico). Estudos recentes do nosso grupo mostram que dois tipos de receptores D1A e D1B estão presentes na retina embrionária de aves (J. Neurochem 75, 1071-1075, 2000). D1A está presente num período precoce de diferenciação (E7) enquanto D1B é expresso posteriormente. NE ou DA (100 μ M) estimularam o acúmulo de AMPc em E7 (NE= 150 \pm 20 e DA= 160 \pm 15 pmoles AMPc n=5) na ordem de 5 vezes em relação ao basal (30 \pm 5 pmoles AMPc), sendo esse efeito bloqueado pelo SCH 23390, mas não por propranolol (antagonista α 1 adrenérgico).

Conclusões:

Nossos resultados sugerem que durante o período embrionário, os receptores dopaminérgicos são sensíveis a NE. Logo, durante o desenvolvimento retiniano, NE sintetizada por outros tecidos poderá difundir-se até a retina neural e ativar receptores D1A.

03.077

EFEITOS DE INIBIDORES SELETIVOS DE RECAPTAÇÃO DE SEROTONINA NA EXPRESSÃO DE 5-HTT, 5-HT1A E S100B EM RATOS MACHOS ADULTOS. ¹Gonçalves, L.; ¹Silva, A. V.; ¹Leal, J.; ²Azmitia, E. C.; ¹Nogueira, M. I. ¹Anatomia ICB III-USP; ²Biologia Universidade de Nova York

Objetivo:

O presente estudo objetivou avaliar o efeito dos antidepressivos Fluoxetina e Clozapina na expressão de moléculas relacionadas ao sistema serotoninérgico em camadas do hipocampo de ratos tratados com Paracloroanfetamina (PCA) pela sua imunoreatividade (IR) aos anticorpos dessas moléculas.

Métodos e Resultados:

Foram utilizados 15 ratos machos, Wistar adultos mantidos sob condições padrão de biotério (C:E 12/12h, luzes 7:00 h). Grupo controle (n=6) recebeu injeção de salina e o grupo experimental recebeu injeção de 10mg/kg de PCA (n=9), às 9:00 h, por 2 dias consecutivos. Após recuperação de 7 dias, os animais foram subdivididos em 3 subgrupos tratados com: 1. salina, 2. fluoxetina (10mg/Kg), e 3. clozapina (20mg/Kg) durante 14 dias, sempre às 9 h. Após esse período eles foram profundamente anestesiados e perfundidos com salina, seguida de solução fixadora de paraformaldeído, pH 7,4, 4°C. Os encéfalos removidos foram pós fixados e crioprotetidos por 16 h. Sendo, então, cortados em secção coronal, 50 μ m de espessura, na região do hipocampo, ao redor do bregma - 5.00 e coletados em 12 séries. Uma série foi processada para cada um dos anticorpos primários 5-HTT; 5-HT1A e S100 (respectivamente 1:2000; 1:2000, 1:5000), pelo método de avidina-biotina e DAB. As imagens da imunoreatividade (IR) dos vários cortes foram capturadas e analisadas com microscópio Nikon E1000, utilizando o programa Image Pro-Plus 4.1, por densidade óptica. Os resultados estão resumidos na tabela a seguir:

IR medida por densidade Óptica nas camadas do Hipocampo de ratos machos

IR medida por densidade Óptica nas camadas do Hipocampo de ratos machos

	Sal – sal	Sal-fluox	Sal-ccloz	Pca-sal	Pca-fluox	Pca-cloz
5-HTT-CA3	47,2±5,2	74,4±6,8*	98,2± 8,1*	10,1±2,2	13,5±1,8*	9,8±0,6
5-HT1A-CA3	62.9±2.0	86.1±1.3*	77.7±6.1*	70.1±1.6	72.7±5.6	73.8±1.1
S-100b hillus	35.6±2.8	61.5±6.2*	56.3±5.4*	44.9±2.2*	78.6±6.2*	48.3±4.7

Análise de variância e teste Tukey, P<0,05

Conclusões:

O aumento de serotonina no meio extracelular devido a ação dos inibidores de sua recaptação (fluoxetina e clozapina) não foi capaz de aumentar a expressão do transportador e do receptor 5-HT1A nos animais tratados com PCA, como aumentou nos animais controle. Entretanto a resposta gliótica observada pela expressão de S100b, foi aumentada com fluoxetina nos animais tratados, mas não com clozapina, evidenciando assim diferente ação desses antidepressivos no sistema nervoso central que deve ser considerada quando de sua prescrição.

03.078

EFEITOS DE PESTICIDAS SOBRE A CAPTAÇÃO DE COLINA EM SINAPTOSSOMOS DO HIPOCAMPO DE RATOS. ¹Rodrigues, K. J. A. R.; ¹Faro, L. R. F.; ¹Nascimento, J. L. M. do; ¹Cruz, T. C. D.*; ¹Santana, M. B. D.**; ²Alfonso, M.; ²Duran, R.; ²Campos, F.**; ²Vidal, L.**; ¹Fisiologia CCB-UFGA; ²Biologia Funcional Ciencias de la Salud Universidad de Vigo Espanha

Objetivo:

Avaliar in vitro a possível ação dos pesticidas Rotenona, Paraquat, MANEB e Dicofol sobre o transporte de colina em sinaptossomos hipocámpais de ratos.

Métodos e Resultados:

Ratos Wistar machos adultos (grupos com n=5) foram decapitados e o hipocampo dissecado em sacarose gelada (0,32 M), homogeneizado e centrifugado a 1000g (4° C, 10 min). Centrifugou-se o sobrenadante a 17800g (4° C, 15 min) e o sedimento ressuspendido em 3 mL de sacarose. Porções dessa solução foram incubadas durante 5 min com os pesticidas rotenona, paraquat, MANEB e dicofol (todos a 15 µM) ou com tampão (controle) e 50 µL desse material foram adicionados a 450 µL do meio Krebs-Ringer com sódio, possuindo colina (0,42 µM) e [³H]colina (0,4 µCi); ou a 450 µL do mesmo meio sem sódio. Incubou-se por 4 min (37°C) e parou-se a captação com 2 mL de tampão gelado e feita a filtração, secagem e leitura do material retido, em um cintilador. Na captação de colina total, apenas os pesticidas paraquat (46,133 pmol/4min/mg proteína±4,533) e dicofol (39,661±4,011) diferiram significativamente do grupo controle (54,247±5,120) (p<0,05). O composto dicofol (19,622±5,378) também mostrou ter um efeito sobre a captação independente de sódio, em comparação ao controle (24,396±4,315) (p<0,05). Na captação de colina dependente de sódio (captação total menos a captação independente de sódio), nenhum pesticida diferiu significativamente do controle (p>0,05).

Conclusões:

O transporte de colina total mostrou ser diminuído na presença dos compostos paraquat e dicofol. Este último também mostrou um efeito sobre a captação de colina independente de sódio. Nenhuma ação foi observada dos pesticidas sobre o transporte de colina dependente de sódio.

03.079

EFFECT OF INTRASTRIATAL ADMINISTRATION OF HYPOXANTHINE ON NA⁺,K⁺-ATPASE ACTIVITY AND NON ENZYMATIC ANTIOXIDANT CAPACITY IN RAT STRIATUM. Bavaresco, C. S.; Chiarani, F.*; Netto, C. A.; Wyse, A. T. S. Bioquímica ICBS-UFRGS

Objetivo:

Lesch-Nyhan is an inherited disease of purine metabolism caused by a severe deficiency of enzyme hypoxanthine-guanine phosphoribosyl-transferase activity. Affected patients present

spasticity, mental retardation and self-mutilation, whose pathophysiology is still obscure. Hypoxanthine (Hpx) is the major metabolite accumulated in tissue of patients with Lesch-Nyhan. Hpx also is increased in other neurological disorders, including ischemia. Na⁺,K⁺-ATPase, a membrane-embedded enzyme, is essential for cellular excitability and its activity is decreased by oxidative stress. In the present study, we investigated the effect of intrastriatal injection of Hpx on Na⁺,K⁺-ATPase activity and on total radical-trapping antioxidant parameter (TRAP) in rat striatum after 30 min of Hpx administration.

Métodos e Resultados:

60-day-old male Wistar rats were placed in a rodent stereotaxic apparatus and a cannula was inserted unilaterally into the right striatum (AP 0,5 mm; ML 2,5 mm; V 2,5 mm). The animals were divided into three groups: naive (control group), sham group (rats received 0,2 µl saline 0,9%) and Hpx group (rats received 0,2 µl of 10µM hpx solution). Membranes from striatum of rats were used for Na⁺,K⁺-ATPase activity assay. For TRAP determination, homogenized of the same structure was used. Results showed that intrastriatal administration of Hpx significantly decreased Na⁺K⁺-ATPase activity (naive =1134.50±186.89; sham=1006±94.22; Hpx=548.50±163.11, n=4] and decreased TRAP (Naive =14.50±1.51; Sham=13.99±2.70; Hpx=7.08±1.77, n=4] in right striatum of rats. Enzyme activity was expressed as nmol Pi. min. mg protein and TRAP was expressed as nmol trolox. min. mg protein.

Conclusões:

Our findings suggest that the inhibition of Na⁺,K⁺-ATPase activity may be associated in the neurological dysfunction characteristic of Lesch-Nyhan disease.

03.080

ESTRESSE OXIDATIVO INDUZIDO POR ATIVAÇÃO CRÔNICA DE RECEPTORES GLUTAMATÉRGICOS REGULA A ATIVIDADE DA COLINA ACETILTRANSFERASE. Almeida, C. P.; de Mello, F. G. IBCCF-UFRJ

Objetivo:

A ativação prolongada de receptores glutamatérgicos leva a inativação da colina acetiltransferase (CAT), enzima responsável pela síntese de acetilcolina no sistema nervoso. Essa inativação não resulta da perda de moléculas da enzima e parece ser devida a modificações pós-transcricionais da enzima (J. Neurochem. 77:1136-1144; 2001). Como a ativação crônica de receptores glutamatérgicos leva a produção de óxido nítrico e de espécies reativas de oxigênio (ROS), levantou-se a hipótese de que a eventual produção de peroxinitrito poderia levar a inativação da CAT. Dentro desse contexto analisamos o efeito de agentes antioxidantes, desacopladores mitocondriais e inibidor da Oxido Nítrico Sintase (NOS) sobre a inativação da CAT por agonistas glutamatérgicos.

Métodos e Resultados:

Culturas de agregados de células de retinas embrionárias foram incubadas por 15 horas em meio contendo 2mM de glutamato, na presença ou não de L-NAME (5mM), L-NA (10mM), FCCP (1mM), glutatona reduzido (10mM). As células foram recolhidas, homogeneizadas e a atividade CAT determinada seguindo protocolo disponível no laboratório. Culturas expostas a glutamato por 15 horas mostram uma redução da atividade CAT de cerca de 50% (270,7±23,06 n=10) quando comparadas a culturas controles não tratadas (603,2±34,94 n=10). A pré-incubação com L-NAME (527,1±30,41 n=8) e Glutathione (618,7±26,79 n=6) preveniram completamente a inibição da CAT provocada pelo glutamato. O uso do desacoplador mitocondrial FCCP também reduziu a inibição da CAT em culturas de monocamada, porém não completamente (C=235,1±20,12 n=2; Glu=88,38±11,25 n=2; Glu+FCCP=125,5±14,62 n=2).

Conclusões: Os resultados indicam que o estímulo crônico de neurônios colinérgicos retinianos com agonistas glutamatérgicos parece aumentar o estresse oxidativo celular levando a produção de radicais livres que possivelmente causam modificações na CAT, inativando a enzima possivelmente por interações de grupamentos peroxinitrito com radicais SH da enzima.

03.081

ESTUDO NEUROQUÍMICO DAS AÇÕES DA NIMODIPINA (ND) NAS CONVULSÕES INDUZIDAS POR PILOCARPINA (P400) EM RATOS JOVENS. ¹Fonseca, F. N.; ¹Nascimento, V. S.*; ¹D'Alva,

M. S.*; ¹Almeida, J. P. C.*; ¹Oliveira, A. A.**; ¹Freitas, R. M.**; ¹Sousa, F. C. F.; ²Fonteles, M. M. F.
¹Fisiologia e Farmacologia UFC; ²Farmácia UFC

Objetivo:

O trabalho objetivou verificar a influência da ND nas alterações neuroquímicas nas convulsões induzidas por P400 em ratos jovens.

Métodos e Resultados:

Ratos Wistar machos (40-50g; 21 dias) foram tratados ou não com ND (10 e 30mg/Kg; i.p.; N10 e N30) e após 30 minutos com Pilocarpina (400mg/Kg; s.c.). Os controles receberam salina. Após 1h da última injeção, os animais foram sacrificados e os cérebros dissecados para determinação da produção de TBARS, nitrito e atividade da catalase em corpo estriado. O pré-tratamento com ND nas duas doses utilizadas diminuiu os níveis de TBARS (Controle=8,06±0,19, n=6; P400=9,96±0,22, n=7; N10=9,15±0,28, n=7; N30=7,10±0,35, n=7) e nitrito (Controle=34,89±2,16, n=8; P400=47,97±3,09, n=8; N10=40,95±1,49, n=8; N30=32,94±2,16, n=8) quando comparado ao grupo P400. Um aumento na atividade da catalase foi observado após as convulsões induzidas por P400 (Controle=37,24±3,40, n=6; P400=71,66±6,96, n=7). Contudo, a administração de ND, na dose de 30mg/Kg (N30=48,43±5,04, n=7), 30 min antes de P400, preservou a atividade da catalase nos níveis normais, enquanto na dose de 10mg/Kg (N10=63,71±3,87, n=7) não foi detectada nenhuma alteração.

Conclusões:

Os resultados mostram que a Nimodipina interfere nas alterações neuroquímicas ocasionadas pelas convulsões, exercendo um efeito protetor em animais jovens nesse modelo de convulsão.

03.082

EXPRESSÃO DE CAVEOLINA-1 DURANTE O DESENVOLVIMENTO DA RETINA DE PINTO.
Freitas, R. C. C.; Ventura, A. L. M. Neurobiologia UFF

Objetivo:

A caveolina-1 (cav-1) é a proteína majoritária das cavéolas e tem como função dar suporte estrutural à sinalização intracelular. Neste trabalho, estudamos a expressão de cav-1 durante o desenvolvimento da retina de pinto.

Métodos e Resultados:

Ensaio de imunofluorescência (IF) realizados em culturas de retinas de embriões de 8 dias (E8) e em retinas de pintos com 2 dias (P2) revelaram IF para cav-1 apenas em células gliais. Nas culturas, essa IF foi mais intensa em áreas de contato entre as células. Em cortes de retina, essa IF foi vista como estrias transversais percorrendo desde a metade da camada nuclear interna até a membrana limitante externa, sugerindo que a cav-1 tenha uma distribuição polarizada na glia de Müller. Ensaio de western blotting revelaram que expressão de cav-1 nas culturas foi muito reduzida no início do cultivo, aumentando a partir do 3º dia de cultivo (17,9 ± 3,4% da expressão máxima, n=3). No 5º dia de cultivo, a expressão aumentou para 63,3 ± 9,45% (n=3), atingindo o máximo em torno do 9º dia de cultivo. Já que a expressão de cav-1 está relacionada com a diferenciação e a proliferação celular, culturas foram tratadas com 200 µM de hidrocortisona, um indutor da diferenciação celular (Minerva Endocrinol. 27; 1:7-20, 2002) ou com 25µM de PD 98059, um inibidor de ERKs 1 e 2 conhecido por inibir a proliferação celular (Intl.J.Dev.Neurosci. 20;1:21-27, 2002). Nenhuma expressão de cav-1 foi observada nas culturas de E8C3 ou C4 tratadas com hidrocortisona, enquanto que as culturas controle apresentaram 13,5 ± 3,9% (n=2) e 56,3 ± 1,5 % (n=2) da expressão máxima, respectivamente. Após este período, a expressão aumentou e atingiu níveis semelhantes ao das culturas de E8C7 (controle), sugerindo que glicocorticóides promovam um atraso na expressão de cav-1 nas culturas. Já o PD 98059 diminuiu a expressão máxima de cav-1 para 35,6 ± 1,0 % (n=3) em relação a observada em culturas controle até o 7º dia de tratamento, sugerindo que a ativação de ERKs seja importante para síntese de cav-1 nestas células.

Conclusões:

Nossos dados sugerem que a cav-1 possa ser um marcador de diferenciação das células gliais retinianas.

03.083

EXPRESSÃO DE FOS EM RATOS EXPOSTOS AO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO NA AUSÊNCIA E PRESENÇA DE LUMINOSIDADE. Rico, J. L. R.; Morato, S. Psicobiologia FFCLRP-USP

Objetivo:

Padrões luminosos atingindo a retina em diferentes níveis de luminosidade podem alterar o funcionamento dos sistemas cerebrais que medeiam a aversão. O objetivo do presente trabalho é verificar o efeito da luminosidade sobre a expressão da proteína Fos nas várias regiões do cérebro de ratos testados no labirinto em cruz elevado (LCE) na presença e ausência de luminosidade.

Métodos e Resultados:

Distribuíram-se ratos (240 g) em 5 grupos: teste no LCE (0 e 30 lux), controle luminosidade (30 e 0 lux) e controle de animais mantidos no biotério até a morte. Usaram-se 3 salas com igual nível de luminosidade: sala de teste com LCE, sala de controle de luminosidade com uma gaiola onde o rato ficava por 5 minutos e sala de espera. A cada teste, 2 animais eram transportados, um para a sala de controle e outro para a sala do teste onde explorava o LCE por 5 min. Após o teste comportamental, os 2 animais eram colocados em uma gaiola na sala de espera por 2 horas, quando recebiam injeção de uretana e eram perfundidos juntamente com um rato do grupo biotério. Todas as duplas eram de uma mesma gaiola para evitar o estresse do isolamento ou da interação social com um animal desconhecido. Após a perfusão, os cérebros foram retirados e fatiados (40 µm). Os cortes foram submetidos ao protocolo para marcação imunistoquímica da proteína Fos e montados em lâminas. Em um microscópio, contaram-se os núcleos de neurônios marcados nas estruturas cerebrais. A ausência de luminosidade parece ativar o córtex pré-frontal (ver tabela de contagem de neurônios; média±EPM (N)). Na amígdala observou-se ativação pela exposição ao LCE na ausência de luminosidade.

Conclusões:

A estimulação visual inibe neurônios da amígdala e do córtex pré-frontal medial, evidenciado pelo aumento da marcação de Fos correlacionado com o comportamento dos animais testados no LCE.

03.084

FOLIC ACID PRETREATMENT PREVENTS BUTYRYLCHOLINESTERASE INHIBITION IN RAT SERUM BY ACUTE HYPERHOMOCYSTEINEMIA. Durigon, E.; Matte, C.*; Stefanello, F. M.**; Wyse, A. T. S. Bioquímica ICBS-UFRGS

Objetivo:

Homocystinuria is an inborn error of metabolism characterized biochemically by tissue accumulation of homocysteine (Hcy) and clinically by mental retardation and vascular complications. Previous studies showed that Hcy administration decreased butyrylcholinesterase and energy metabolism in rats. Considering that folic acid and creatine have been shown be neuroprotectors and that butyrylcholinesterase can be used as a peripheral marker for the neurotoxic effects of Hcy, in the present study we evaluated the effect of folic acid and creatine pretreatment on butyrylcholinesterase activity inhibition caused by acute hyperhomocysteinemia.

Métodos e Resultados:

Wistar rats were pretreated with folic acid (5 mg/Kg) or creatine (160 mg/Kg) daily by intraperitoneal administration from 22th to 28th days of age. On 29-day-old the rats received one injection of Hcy (80 mg/Kg) and were killed one hour later. Serum was used to butyrylcholinesterase activity determination. Our results showed that folic acid administration prevented the reduction of butyrylcholinesterase activity provoked by acute hyperhomocysteinemia (saline: 1.33±0.073; Hcy: 1.05±0.12; folic acid: 1.21±0.047; folic acid + Hcy: 1.23±0.054; n= 5). In contrast, creatine pretreatment did not prevent the Hcy effect on butyrylcholinesterase activity (saline: 1.33±0.073; Hcy: 1.05±0.12; creatine: 1.28±0.28; creatine + Hcy: 1.03±0.056; n= 5). Results are expressed as mean ± S.D. and butyrylcholinesterase activity was expressed as µmol ACSCh/h/mg of protein.

Conclusões:

Our findings show that Hcy administration reduces butyrylcholinesterase activity in rat serum and that folic acid prevents such effect. These results are in agreement with other findings showing the efficacy of the therapy with folic acid to homocystinuric patients.

03.085

GABA RELEASE INDUCED BY EXCITATORY AMINO ACIDS IN OPOSSUM RETINA: SELECTIVE ACTIVATION OF NMDA RECEPTORS BY ASPARTATE IN AMACRINE CELLS. ¹Calaza, K. C.; ²Hokoç, J. N.; ²Gardino, P. F. ¹Neurobiologia UFF; ²Neurobiologia IBCCF-UFRJ

Objetivo:

To study the Glutamate-GABA circuit in the retina of the opossum (*Didelphis aurita*), a primitive mammalian, where some ancestral characteristics are still present. In the retina, glutamate (Glu) is released by several cell types from photoreceptors to ganglion cells. This flow of information is modulated by GABAergic inputs from horizontal and amacrine cells in the outer and inner plexiform layers, respectively. We have shown in previous studies that different species the GABAergic cells are activated differently by glutamatergic agonists. For instance, in primate retina Glu activates kainate receptors and in avian retina, both kainate and NMDA receptors (KAR and NMDAR) are activate.

Métodos e Resultados:

Using GABA immunohistochemistry, we compared the effects of excitatory amino acids (EAAs) treatment on GABA release at different sites of the opossum retina (n=3). NMDA (100µM) and kainate (KA, 100µM) induced the release of GABA from amacrine cells in the inner nuclear (INL) and ganglion cell layers (GCL). Aspartate (ASP, 100µM) induced GABA release in a sub-population of amacrine cells in the INL but not in cells of the CCG. Quantitative analysis showed a reduction of 60% and 80% GABA-positive amacrine cells in INL and CCG, respectively, with the treatment of KA and NMDA. This effect was totally blocked by DNQX (100µM) and MK801 (10µM), antagonists of KAR and NMDAR, respectively. ASP reduced only 45% of GABA-positive amacrine cells and this effect was inhibited by NMDAR antagonist.

Conclusões:

Our data showed that in the opossum retina both NMDA and KA receptors were able to induced GABA release. In addition, NMDAR presented in amacrine cells are sensitive to Asp, indicating a possible endogenous function of this neurotransmitter. These results suggest that Glu-GABA circuit in the marsupial retina is distinct of that observed in avian and primate retina.

03.086

HOMOCYSTEINE ALTERS NA⁺,K⁺-ATPASE ACTIVITY AND INDUCES OXIDATIVE STRESS IN PARIETAL, PREFRONTAL AND CINGULATE CORTEX OF YOUNG RATS. Matte, C.; Monteiro, S. D. C. ^{**}; Calcagnotto, T. ^{*}; Bavaresco, C. S. ^{**}; Netto, C. A.; Wyse, A. T. S. Bioquímica ICBS-UFRGS

Objetivo:

Homocystinuria (HCU) is a metabolic disorder biochemically characterized by deficiency of cystathionine β-synthase activity, leading tissue homocysteine (Hcy) accumulation. Affected patients present mental retardation and atherosclerosis. Considering that Na⁺,K⁺-ATPase is a fundamental enzyme to brain normal function, in the present study we investigated the effect of Hcy on this enzyme activity in parietal, prefrontal and cingulate cortex. We also investigated the in vitro effect of Hcy on some parameters of oxidative stress, namely thiobarbituric acid-reactive substances (TBA) and total radical-trapping antioxidant potential (TRAP) in the same structures.

Métodos e Resultados:

For in vivo studies Wistar rats were submitted to a chronic hyperhomocysteinemia (6th to 28th days of life). For in vitro studies we used untreated rats. Synaptic membranes are used to Na⁺,K⁺-ATPase determination. Results showed that hyperhomocysteinemia reduced Na⁺,K⁺-ATPase activity in parietal (control 1390±110; Hcy 706±114; n=4) and increased in prefrontal cortex (control 891±20; Hcy 1212±141; n=4). Hcy inhibited in vitro Na⁺,K⁺-ATPase in parietal (control 842±158; Hcy 500uM 503±158; n=4), prefrontal (control 651±105; Hcy 500uM 188±54; n=6) and cingulate cortex (control 740±84; Hcy 500uM 240±33; n=5). TBA was increased in parietal (control 0.54±0.054; Hcy 500uM 0.68±0.087; n=5), prefrontal (control 0.52±0.037; Hcy 500uM 0.61±0.045; n=6) and cingulate cortex (control 0.58±0.047; Hcy 500uM 0.72±0.045; n=6). TRAP was reduced in parietal (control 25±3.7; Hcy 500uM 18.6±1.5; n=4), prefrontal (control 31±4.7; Hcy 500uM 17.3±3.9; n=4) and cingulate cortex (control 25±2.4; Hcy 500uM 16±4; n=4). Results are expressed as mean + S.D.; Na⁺,K⁺-ATPase, TBA and TRAP were expressed as nmol Pi/min.mg protein, nmol TBA/mg protein and nmol trolox/mg protein, respectively.

Conclusões: It is proposed that the alteration of Na⁺,K⁺-ATPase and induction of oxidative stress by Hcy in cerebral cortex may be one of the mechanisms related to the neuronal dysfunction observed in human homocystinuria.

03.087

HYPOXANTHINE INHIBITS NA⁺,K⁺-ATPASE ACTIVITY AND INCREASES LIPID PEROXIDATION IN RAT STRIATUM. Chiarani, F.; Bavaresco, C. S.^{**}; Netto, C. A.; Wyse, A. T. S.; Bioquímica ICBS-UFRGS

Objetivo:

Lesch Nyhan disease is a metabolic disorder caused by deficiency of hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase activity leading to tissue accumulation of hypoxanthine (Hpx). Affected patients present hyperuricemia, mental retardation and self-mutilation behavior. Considering that Na⁺,K⁺-ATPase is an enzyme necessary to maintain neuronal excitability and it is inhibited by free radicals, in the present study we investigated the effect of preincubation with Hpx on Na⁺,K⁺-ATPase alone or combined with glutathione (GSH) (SH-group protecting), trolox (peroxyl radical trapping), N^v-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) (nitric oxide synthase inhibitor) and allopurinol (alo) (xanthine oxidase inhibitor). We also evaluated the effect of Hpx on thiobarbituric acid-reactive substances (TBA) and the influence of GSH and trolox on this effect.

Métodos e Resultados

Striatum (6 days old) Wistar rats was homogenized and preincubated with 10 µM Hpx alone or combined with 1 mM GSH and L-NAME, 3 mM trolox and 100 µM alo. After preincubation, TBA was measured and synaptic membranes were prepared for Na⁺,K⁺-ATPase determination. Results showed that Hpx significantly inhibited Na⁺,K⁺-ATPase activity (45%) and that GSH and trolox prevented this inhibition, but not L-NAME and Alo (Control: 743.50±98; Hpx: 402±84; GSH+Hpx: 715±114; Tro+Hpx: 641.75±34; Alo+Hpx: 472.75±121; L-NAME+Hpx: 418.25±127, n=4). Furthermore, Hpx increased TBA (22%) and this effect was prevented by GSH and trolox (Control: 2.99±0.35; Hpx: 3.59±0.14; GSH+Hpx: 2.19±0.41; Tro+Hpx: 0.40±0.13; n=4). Data are expressed as mean + SD. Na⁺, K⁺ - ATPase and TBA were expressed as nmol Pi released per min per mg of protein and nmol TBA per mg protein, respectively.

Conclusões:

Reduction of Na⁺,K⁺-ATPase and increase of TBA caused by Hpx is possibly mediated by SH group oxidation and lipid peroxidation, since that GSH e trolox prevented such effects.

03.088

HYPOXIC PRECONDITIONING IN NEONATAL RAT BRAIN INVOLVES REGULATION OF EXCITATORY AMINO ACID TRANSPORTER 2 AND ESTROGEN RECEPTOR ALPHA. ¹Simão, F.; ¹Cimarosti, H. I.^{**}; ²Jones, N. M.; ²O'Shea, R. D.; ²Beart, P. M.; ¹Salbego, C. G.; ¹Bioquímica ICBS-UFRGS; ²Howard Florey Institute of Physiology University of Melbourne

Objetivo:

Exposure of the brain to a sublethal insult can protect against a subsequent brain injury. Hypoxic preconditioning induces tolerance to hypoxic-ischemic injury in neonatal rat brain and is associated with changes in gene and protein expression. To study the involvement of excitatory amino acid transporters (EAAT1 and EAAT2) and estrogen receptors (ER α and ER β) in neonatal hypoxia-induced ischemic tolerance, we examined the cortex, hippocampus and striatum of newborn rats at different time points after exposure to sublethal.

Métodos e Resultados:

Hypoxic preconditioning was performed on Sprague Dawley rat pups at post-natal day 6 (P6). Briefly, pups were placed in an 8% O₂/92% N₂ humidified atmosphere in chambers partially submerged in a water-bath maintained at the constant temperature of 37°C for 3 hours. Control animals were maintained at 37°C for 3 hours under normoxic conditions. The rats were anesthetized with 1.5% isoflurane in an O₂/N₂ mixture and the left common carotid artery was exposed through a ventral midline neck incision and permanently occluded by electrocoagulation. The data represent the mean \pm S.E.M.. Preconditioning with hypoxia 24 hours before hypoxia-ischemia afforded marked brain protection compared with littermate control animals. Immunoblot analysis showed that EAAT2 and ER α were significantly increased by 55%(155±24, n=10) and

49%(149±18, n=10), respectively, in cortex at 24 hours after hypoxic-preconditioning. Surprisingly, at the same time point, a significant decrease of EAAT2 by 48%(52±13, n=8), in striatum was observed. In contrast, hypoxic preconditioning had no effect on the levels of EAAT1 and ERβ in any of the brain structures studied at any time points analyzed. The co-regulation of EAAT2 and ERα in a similar manner suggest that ERα might be further part of some type of functional complex involving EAAT2 and Na⁺/K⁺ ATPase in cortex.

Conclusões:

These endogenous molecular mechanisms modulated by hypoxia may contribute to the development of hypoxia-induced ischemic tolerance, and may provide novel therapeutic targets for treatment of cerebral ischemia.

03.089

INHIBITION OF BRAIN NA⁺,K⁺-ATPASE ACTIVITY INDUCED BY METHIONINE IS PROBABLY MEDIATED BY OXIDATIVE STRESS. Kurek, A. G.; Stefanello, F. M.^{**}; Chiarani, F.*; Scherer, E. B. S.*; Wyse, A. T. S. Bioquímica ICBS-UFRGS

Objetivo:

Tissue accumulation of methionine (Met) occurs in hypermethioninemia, a metabolic disorder caused by severe deficiency of methionine adenosyltransferase activity. Mental retardation, cerebral edema and demyelination are symptoms of this disease. Na⁺,K⁺-ATPase is necessary to maintain the ionic gradient for neuronal excitability. In the present study we investigated the effect of preincubation of hippocampus homogenates in the presence of Met on Na⁺,K⁺-ATPase activity in synaptic membranes of rats. Considering that Na⁺,K⁺-ATPase is inhibited by free radical, we also evaluated the role of the antioxidants glutathione (GSH) and trolox (Tro) on the inhibition of this enzyme caused by Met.

Métodos e Resultados:

Wistar rats of 29-day-old were killed by decapitation, hippocampus was dissected. Homogenates were separately incubated at 37°C for 1h with Met (2-5 mM), 1 mM GSH, 3 mM Tro, and with 5 mM Met plus 1 mM GSH or 3 mM Tro. After incubation, synaptic plasma membranes were prepared and Na⁺,K⁺-ATPase activity determined. Results showed that 5 mM Met significantly inhibited (~25%) Na⁺,K⁺-ATPase activity (C: 878.5±16.1; Met 2mM: 859.1±81.2; Met 3.5mM: 823.7±9.4; Met 5mM: 687.5±56.8, n=4). GSH and Tro per se did not alter Na⁺,K⁺-ATPase but prevented the inhibition of this enzyme elicited by Met (C: 907.5±24.8; Met 5mM: 687.5± 56.8; GSH 1mM: 943.4±138.3; Tro 3mM: 841.6±55.4; GSH 1mM + Met 5mM: 945.6±73.7; Tro 3mM + Met 5mM: 862.5±36.2, n=4). Data are expressed as mean ± SD and Na⁺,K⁺-ATPase activity as nmol/Pi/min.mg protein.

Conclusões: Our results suggest that the inhibition of Na⁺,K⁺-ATPase by Met is probably mediated by oxidation of thiol groups and lipid peroxidation since GSH (SH-group protecting) and Tro (peroxil radical trapping) prevented such effects. If confirmed in humans, these findings could be contribute to the neurological dysfunction found in hypermethioninemic patients.

03.090

INTRASTRIATAL ADMINISTRATION OF GUANIDINOACETATE INHIBITS NA⁺,K⁺-ATPASE AND CREATINE KINASE ACTIVITIES IN RAT STRIATUM. Zugno, A.; Schuck, P. F.^{**}; Wajner, M.; Wyse, A. T. S. Bioquímica ICBS-UFRGS

Objetivo:

Guanidinoacetate methyltransferase deficiency (GAMT deficiency) is an inherited metabolic disorder clinically characterized by epilepsy and mental retardation and biochemically by guanidinoacetate(GAA) accumulation and depletion of creatine. Although this disease is characterized by neurological findings, the underlying mechanisms of brain injury are not yet established. In the present study we investigated the effect of intrastriatal administration of GAA on Na⁺,K⁺-ATPase and CK (Mi-CK and Cy-CK fractions) activities in rat striatum. We also tested the effect of GAA administration on thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), an index of lipid peroxidation, in the same structure.

Métodos e Resultados:

Wistar rats (180 – 200g) were divided in three groups: group 1 (naive group) rats that did not suffer surgery; group 2 (sham group) rats that suffered surgery and received saline and group 3 (GAA

treated) rats received 10 μ M of GAA solution. The animals were killed by decapitation at 30 min, 3 or 6 hs after injection. Synaptic plasma membranes were used for the determination of Na⁺,K⁺-ATPase activity (nmol Pi. min. mg protein). Striatum homogenates were used to measure CK activities (umol creatine/min.g protein) and for TBARS assays (nmol MDA/mg protein). Results showed that GAA significantly inhibited Na⁺,K⁺-ATPase (naive: 1081 \pm 122; sham: 1006 \pm 94; GAA: 615 \pm 45; n=6) and CK (naive: 10.27 \pm 2.56; sham: 9.96 \pm 2.35; GAA: 7.11 \pm 1.89; n=5) activities, after 30 min of GAA injection. We also investigated the effect of intrastriatal administration of GAA on CK activity in the Mi-CK and Cy-CK fractions of striatum of rats. Results showed that GAA inhibited significantly Mi-CK (naive: 6.45 \pm 1.19; sham: 7.57 \pm 2.04; GAA: 4.15 \pm 0.96; n=5) but did not affect Cy-CK. (naive: 15.43 \pm 2.53; sham: 15.18 \pm 3.26; GAA: 14.58 \pm 1.94; n=5). GAA significantly increased TBARS at 30 min after injection (naive: 1.42 \pm 0.41; sham: 2.01 \pm 0.43; GAA: 2.7 \pm 0.35; n=5). Data are expressed as mean \pm SD.

Conclusões: Our results suggest that the inhibition of CK and Na⁺,K⁺-ATPase activities by GAA may contribute to the neuro dysfunction observed in patients with GAMT-deficiency.

03.091

L-NAME ADMINISTRATION PREVENT THE INHIBITION OF NUCLEOTIDE HYDROLYSIS BY RAT BLOOD SERUM SUBJECTED TO HYPERARGININEMIA. Delwing, D.; Gonçalves, M. C. F.; Sarkis, J. J. F.; Wyse, A. T. S. Bioquímica UFRGS

Objetivo:

Hyperargininemia is an inherited metabolic disease biochemically characterized by tissue accumulation of arginine (Arg). Mental retardation and other neurological features, whose mechanisms are still obscure, are common symptoms in hyperargininemic patients. In the present study, our goal was to evaluate the in vivo and in vitro effect of Arg on serum nucleotide hydrolysis. The action of NF-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), an inhibitor of nitric oxide synthase, on the effects produced by Arg was also tested.

Métodos e Resultados:

For the treatment, sixty-day-old Wistar rats were used. Rats were treated with a single or a triple (with an interval of 1h between each injection) intraperitoneal injection of saline (group I), Arg (0.8 g/Kg) (group II), L-NAME (2.0 mg/Kg or 20 mg/Kg) (group III) or Arg (0.8 g/Kg) plus L-NAME (2.0 mg/Kg or 20 mg/Kg) (group IV) and were killed 1h later. Our results showed that a triple, but not single, Arg administration decreased ATP (C:1.20 \pm 0.10; Arg:0.79 \pm 0.11; n=5), ADP (C:1.13 \pm 0.10; Arg:0.81 \pm 0.10; n=5) and AMP (C:1.20 \pm 0.17; Arg:0.85 \pm 0.20; n=5) hydrolysis. Simultaneous injection of L-NAME (20 mg/Kg) prevented such effects [ATP (C:1.08 \pm 0.10; Arg:0.54 \pm 0.09; L-NAME:1.09 \pm 0.19; Arg+L-NAME:1.05 \pm 0.19; n=4), ADP (C:1.15 \pm 0.06; Arg:0.54 \pm 0.08; L-NAME:1.10 \pm 0.14; Arg+L-NAME:1.12 \pm 0.04; n=4) and AMP (C:1.34 \pm 0.19; Arg:0.73 \pm 0.13; L-NAME:1.31 \pm 0.23; Arg+L-NAME:1.28 \pm 0.09; n=4)]. Arg in vitro did not alter nucleotide hydrolysis [ATP (C:1.52 \pm 0.10; 0.5mM:1.69 \pm 0.20; 1.5mM:1.60 \pm 0.26; n=4), ADP (C:1.84 \pm 0.24; 0.5mM:1.66 \pm 0.24; 1.5mM:1.90 \pm 0.25; n=4) and AMP (C:1.79 \pm 0.21; 0.5mM:1.84 \pm 0.23; 1.5mM:1.89 \pm 0.34; n=4)]. Data are expressed as mean \pm S.D and enzyme activities were expressed as nanomoles of Pi released per minute per milligram of protein.

Conclusões:

The present data indicate that in vivo Arg administration reduces nucleotide hydrolysis in rat serum probably through nitric oxide or/ and peroxy-nitrite formation, since L-NAME prevented such effects.

03.092

LÍLIO INIBE DIFERENCIALMENTE A FOSFOGLICOMUTASE EM REGIÕES DO CÉREBRO DE RATO. Nepomuceno da Silva, G. G.; Neto, D. C. S.*; Montero-Lomeli, M. Bioquímica Médica CCS-UFRJ

Objetivo:

O lítio é usado no tratamento da desordem bipolar. Contudo, apesar da utilidade clínica desta droga, o seu mecanismo de ação ainda é desconhecido. Em mamíferos, lítio (em concentrações terapêuticamente relevantes) inibe um grupo de pelo menos quatro fosfomonoesterases (IPPase, Im-pase, FBPase e BPNase), a enzima metabólica, fosfoglicomutase (PGM), e glicogênio sintase quinase-3 (GSK-3). Nosso objetivo é verificar a influência do lítio na atividade da enzima

fosfoglicomutase (enzima que catalisa a reação reversível de glicose 1-fosfato a glicose 6-fosfato) em diferentes regiões do cérebro de rato (córtex, hipocampo, estriado, tronco e cerebelo).

Métodos e Resultados:

Foram usados neste estudo, ratos Wistar adultos machos (peso médio de 350g), em dois grupos: controle e tratados com lítio, administrado na ração dos animais durante o tratamento que durou cinco semanas. Concentrações terapêuticas de lítio no sangue, peso corporal, ingestão de ração e água foram monitoradas. Um lisado total de proteínas de cada região cerebral foi utilizado para medir a atividade da fosfoglicomutase na ausência e com 1 e 4mM de lítio. Ocorre uma maior inibição da atividade enzimática causada pelo lítio nas frações cerebrais de animais controle, como por exemplo o córtex ($74,5\% \pm 2,87, n=4$) quando comparados com o grupo tratado ($62,12\% \pm 7,73, n=3$), dados de quando utilizada a concentração de 4mM de lítio. O padrão de inibição é igual nas diferentes frações, nos dois grupos, controle e tratado, sendo o cerebelo, a fração com maior atividade inicial tanto em controle ($172,24 \pm 67,68, n=4$) quanto em tratados ($146,62 \pm 27,3, n=3$) e a que mostra menor inibição por lítio tanto no grupo controle ($54,5\% \pm 6,04, n=4$) quanto no grupo tratado ($55,96\% \pm 11,85, n=3$).

Conclusões:

Conclusões: A enzima fosfoglicomutase é inibida pelo lítio nas diferentes regiões do cérebro. O cerebelo é a fração cerebral menos inibida pelo lítio tanto no grupo controle quanto no tratado. Perspectivas: investigar a distribuição das isoformas da PGM no cérebro de rato, e analisar se há correlação com essa diferença de atividade nas regiões estudadas.

03.093

METHIONINE ALTERS LIPID PEROXIDATION AND ANTIOXIDANT NON-ENZYMATIC DEFENSES IN RAT HIPPOCAMPUS. Stefanello, F. M.; Kurek, A. G.¹; Chiarani, F.*; Wyse, A. T. S. Bioquímica ICBS-UFRGS

Objetivo:

Hypermethioninemia is a rare disorder caused by deficiency of methionine adenosyltransferase activity. Affected patients present mental retardation, cerebral edema and demyelination, whose underlying mechanisms are still obscure. Considering that oxidative stress seems to play an important role in the pathogenesis of many neurodegenerative disorders, in the present study we evaluated the in vitro effect of methionine (Met) on some parameters of oxidative stress, namely thiobarbituric acid reactive substances (TBA), total radical-trapping antioxidant potential (TRAP), as well as on antioxidant enzymes activities (catalase-CAT and superoxide dismutase-SOD) in rat hippocampus.

Métodos e Resultados:

Wistar rats of 29-day-old were killed by decapitation, hippocampus was dissected and homogenized. Met was added to the incubation medium at concentrations ranging from 0.2-5 mM. Results showed that 3.5 and 5 mM Met significantly increased lipid peroxidation (TBA: C: 1.79 ± 0.07 ; Met 0.2mM: 1.80 ± 0.26 ; Met 2mM: 1.87 ± 0.25 ; Met 3.5mM: 2.87 ± 0.5 ; Met 5mM: $3.63 \pm 0.4, n=5$). Met, in all concentrations tested, decreased tissue non-enzymatic antioxidant defenses (TRAP: C: 21.9 ± 0.73 ; Met 0.2mM: 18.7 ± 2.36 ; Met 2mM: 16.7 ± 2.85 ; Met 3.5mM: 15.3 ± 1.68 ; Met 5mM: $16.11 \pm 0.99, n=5$) and did not change antioxidant enzymes (CAT: C: 0.54 ± 0.1 ; Met 0.2mM: 0.58 ± 0.09 ; Met 2mM: 0.5 ± 0.1 ; Met 3.5mM: 0.51 ± 0.11 ; Met 5mM: $0.51 \pm 0.1, n=5$); (SOD: C: 5.15 ± 0.45 ; Met 0.2mM: 5.43 ± 0.78 ; Met 2mM: 5.52 ± 0.72 ; Met 3.5mM: 5.83 ± 0.83 ; Met 5mM: $5.87 \pm 0.46, n=5$). Data were expressed as mean \pm SD. TBA, TRAP and enzymatic activities were reported as nmol MDA/mg protein, nmol trolox/mg protein and units/mg protein, respectively.

Conclusões: Our results suggest that Met induces oxidative stress and these findings may be, at least in part, one of the mechanisms related to the brain damage observed in hypermethioninemia.

03.094

METHYLMERCURY IN VITRO INTOXICATION IMPAIRS [3H]D-ASPARTATE UPTAKE AND OPENS PERMEABILIZING PORES IN CULTURED ASTROCYTES. ¹Ignácio, A. R. A.; ¹Malm, O.; ²Guimarães, F. P.²; ¹Reis, R. A. M.; ¹Pereira, C. H.; ³Fróes, M. M. ¹IBCCF-UFRJ; ²Análises Clínicas UFRJ; ³ICB-UFRJ

Objetivo:

Methylmercury (MeHg) intoxication has been evaluated in the context of astrocytic gap junctions (GJ) and glutamate mobilization, both taken as central aspects of astrocytic physiology.

Métodos e Resultados:

We prepared astrocyte cultures by mechanical dissociation of P2 rat cerebral hemispheres. A GJ non-permeant dye Rhodamine dextran (RD, 3,000 Da) and a GJ-permeant Lucifer yellow (LY, 443Da) were used in a scrape loading procedure to evaluate functional GJ in these cultures. Typical GJ-mediated wavelike intercellular diffusion of LY was obtained in control cultures. Distance of fluorescent wavefront propagation was measured. Control (86.52±13.43) versus 10min exposures to 10 (78.32±12.96) and 30µM (74.83±10.32) MeHg were nonsignificant (t-test). In more severe conditions (30µM/30min, 100µM/10min) extensive LY loading was consistently observed in astrocytes all over the culture dish. Complete blockade of this extensive loading was achieved by carbenoxolone (CBX, 100µM) and LaCl₃ (10mM), although only partially by Brilliant Blue G (BBG, 100µM). Finally, D-aspartate, a substrate for the high-affinity glutamate transport system, had its uptake significantly decreased in treated (30µM MeHg/30min) astrocyte cultures (35.98±3.13) relative to control (54.31±3.75).

Conclusões:

The effects of CBX, a known GJ uncoupling agent and low mM LaCl₃, recently shown to block unapposed GJ hemichannels, suggests "hemigaps" in the massive LY loading. Ionotropic P2X7 receptors may also be involved, as indicated by BBG results. Taken together, transmembrane permeabilization, cell damage and impairment of Excitatory Aminoacids uptake seems to explain part of the toxic character of MeHg actions on astrocytes. Considering the growing evidence of astrocyte insertion in neural circuits, the actions of MeHg on astrocytic targets predict strong consequences on main aspects of cellular excitability and homeostasis in the brain.

03.095

MODELO AGUDO QUIMICAMENTE INDUZIDO DA DOENÇA DO XAROPE DO BORDO EM RATOS PARA ESTUDOS NEUROCOMPORTAMENTAIS E NEUROQUÍMICOS. ¹Bridi, R.; ¹Fontella, F. U. ^{**}; ¹Pultronick, V. ^{**}; ¹Braum, C. A. ^{*}; ¹Zorzi, G. K. ^{*}; ²Coelho, D.; ¹Wajner, M.; ²Vargas, C. R.; ¹Dutra-Filho, C. S.; ¹Bioquímica ICBS-UFRGS; ²HCPA

Objetivo:

A doença do xarope do bordo (MSUD) é um distúrbio metabólico causado pela deficiência do complexo enzimático desidrogenase dos cetoadácidos de cadeia ramificada, que leva ao acúmulo dos aminoácidos de cadeia ramificada (BCAA) leucina (Leu), isoleucina (Ile) e valina (Val). Neste estudo, propõe-se um modelo da MSUD baseado na administração sistêmica de BCAA em ratos.

Métodos e Resultados:

Ratos Wistar de 10 ou 30 dias de vida receberam três injeções s.c. (1h de intervalo) do pool de BCAA 15,8µg/g, ou salina e foram sacrificados 0, 30, 60, 90 e 120 min após a última injeção. Os BCAA foram quantificados por HPLC. Os resultados estão expressos em média ± d.p.(n=3-8). Houve aumento significativo de BCAA no plasma (µmol/L) dos animais que receberam BCAA tanto com 10 dias de vida [Leu:F(4,27)=48,8 p<0,01; Ile:F(4,27)=26,8 p<0,01; Val:F(4,26)=31,5 p<0,01] quanto com 30 dias [Leu:F(4,14)=25,4 p<0,01; Ile: F(4,14)=23,8 p<0,01; Val:F(4,14)=32,0 p<0,01]. Os picos de concentração foram de 30 min nos animais de 10 dias (Leu: controle=219±86, n=8; 30min=2282±256, n=6; Ile: controle=116±36, n=8; 30min=986±340, n=6; Val: controle=217±70, n=8; 30min=1569±322, n=6) e de 60 min nos animais de 30 dias (Leu: controle=128±12, n=3; 60min=787±144, n=4; Ile: controle=81±5, n=3; 60min= 261±36, n=4; Val: controle=169±7, n=3; 60min=768±101, n=4). Os níveis cerebrais de BCAA (µmol/mg proteína) foram significativamente aumentados somente nos animais de 10 dias [Leu:F(4,27)=7,3 p<0,01; Ile:F(4,22)=9,1 p<0,01; Val:F(4,22)=10,8 p<0,01] mantendo-se altos de 30 a 120 min (Leu: controle=136±26, n=8; 30min=855±317, n=6; 120min=614±258, n=6; Ile: controle=63±12, n=7; 30min=247±67, n=5; 120min=197±81, n=5; Val: controle=126±17, n=7; 30min=462±125, n=5; 120min=546±201, n=5).

Conclusões:

A administração de BCAA em ratos de 10 dias de vida produz alterações metabólicas comparáveis às encontradas em pacientes com MSUD não tratada, sendo um modelo de fácil execução e baixo custo que pode contribuir para o estudo das alterações fisiopatológicas induzidas pelo acúmulo de BCAA.

03.096

OVARIECTOMY INCREASES NA⁺,K⁺-ATPASE, ACETYLCHOLINESTERASE AND CATALASE ACTIVITIES IN RAT HIPPOCAMPUS. Monteiro, S. C.; Matte, C.***; Delwing, D.***; Wyse, A. T. S. Bioquímica ICBS UFRGS

Objetivo:

Considering that estrogen deprivation is implicated in neurodegenerative disorders, such as cerebral ischemia and Alzheimer's disease and that Na⁺,K⁺-ATPase, acetylcholinesterase (AChE) and oxidative stress are altered in these conditions, in the present study we investigated the effect of ovariectomy on Na⁺, K⁺-ATPase, AChE and catalase activities in hippocampus of female adult rats.

Métodos e Resultados:

Female Wistar rats (3 months, 180-210 g) were assigned to one of the following groups: naive (control), sham (only submitted to surgery without removing of ovaries) and ovariectomized. One month after ovariectomy, rats were killed and the hippocampus was dissected to determine the activities of Na⁺, K⁺-ATPase, AChE and catalase. Our results showed that ovariectomy significantly increases the activities of Na⁺,K⁺-ATPase (36%) (naive:1079.6±39.32;sham:1183.8±101.99, n=5); ovariectomized:1462.0±115.33), AChE (36%) (naive:1.63±0.04; sham:1.61±0.10; ovariectomized:2.22±0.24, n=5) and catalase (47%) (naive:0.42±0.01; sham:0.45±0.04; ovariectomized:0.63±0.06, n=5). Data are expressed as mean ± S.E.M. The activities of Na⁺, K⁺-ATPase, AChE and catalase were expressed as nmol.Pi/mg.protein, umol ACSCh/h/mg protein and units/mg protein, respectively.

Conclusões:

Since ovariectomy mimics postmenopausal changes, our findings showing alteration in the activities of brain Na⁺,K⁺-ATPase, AChE and CAT may be related to problems in postmenopausal women.

03.097

PHARMACOLOGICAL PROPERTIES OF SURAMIN AS NON-COMPETITIVE ANTAGONIST OF RAT P2X₂ RECEPTOR. Trujillo, C. A.; Majumder, P.***; Nery, A.*; Ulrich, H. Bioquímica IQ-USP

Objetivo:

The objective of our study is to investigate the non-competitive inhibition mechanism of the recombinant rat P2X₂ purinergic receptor stably transfected in 1321N1 cells by the antagonist suramin.

Métodos e Resultados:

Equilibrium binding and competition between suramin and ATP was determined by a binding assay, using [α ³²P]-ATP as a radioligand. Two-hundred thousand 1321N1 human glioma cells permanently transfected with the recombinant P2X₂ receptor each were incubated with [α ³²P]-ATP in the absence or presence of increasing concentrations of the antagonists suramin or TNP-ATP (0.01 μ M to 100 μ M) to determine the IC₅₀ and whether suramin, TNP-ATP and [α ³²P]-ATP compete for the same binding site. Our data indicate that suramin does not compete with ATP for the ligand binding site, because as the concentration of suramin increases, no displacement of [α ³²P]-ATP in the binding assay was observed. However, the competitive antagonist TNP-ATP displaced [α ³²P]-ATP with an IC₅₀ of 1,97 ± 0,12 μ M, and displace 90 ± 3,4% of receptor-bound [α ³²P]-ATP at a concentration of 100 μ M.

We have used fast-kinetic whole-cell recording to confirm the finding that suramin is a non-competitive inhibitor of P2X₂ receptor function and does not interfere with the ligand-binding site. The whole-cell currents stimulated by ATP in the presence of suramin were compared to those obtained by ATP in the presence of the competitive antagonist TNP-ATP. When inhibition factors ($A_{max}/A_1 - 1$)^{1/2} were plotted as functions of inhibitor concentrations (TNP-ATP or suramin), a comparison of the obtained slopes indicated a nonlinear fit for inhibition factors obtained in the presence of increasing concentration of suramin (R² = 0,97) and a linear fit for inhibition factors obtained in the presence of TNP-ATP (R² = 0,98). Linear regression can be used for curve fitting of an inhibition curve in the presence of a competitive antagonist, but is not applicable for a non-competitive inhibition mechanisms. Our data interpretation is supported by a mathematical model according to *Biochemistry*. 40:8419, 2001.

Conclusões:

Both data obtained from radioligand-binding and whole-recording studies support a non-competitive inhibition mechanism of the rat recombinant P2X₂ receptor by suramin.

03.098

REGULAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR INDUZIDA POR ATP EM CULTURAS DE CÉLULAS DE RETINA DE PINTO MEDIADA POR AMP CÍCLICO. Ornelas, M. I.; Alves, H. F.; Ventura, A. L. M. Neurobiologia UFF

Objetivo:

ATP é capaz de induzir a proliferação de células de retina de pinto em cultura, dependente da ativação de receptores P2Y₁, PKC e da via das MAP cinases (Intl. J. Dev. Neurosci. 20; 1:21-27, 2002). Neste trabalho, investigamos o efeito do AMP cíclico e a participação da enzima PI3K na proliferação celular induzida por ATP.

Métodos e Resultados:

ATP 100 μ M aumentou ~100% a proliferação de células de retina em cultura, medida através da incorporação de [³H]-timidina (controle = 3593,1 \pm 201,34 CPM/cultura, n=8). O cultivo de células em presença de forskolina 50 μ M (FK) ou IBMX 0.5 mM (ATP = 211,7 \pm 24,6%; FK = 112,4 \pm 16,9%, n = 6; IBMX = 97,5 \pm 8,7%, n=10) promoveu inibição na resposta proliferativa, indicando que o acúmulo de AMPc possui um papel inibitório sobre o efeito do ATP. Dopamina (DA), SKF 38393 (SKF) e 6-CI-PB também foram capazes de inibir em 100% a incorporação de [³H]-timidina induzida por ATP, mostrando valores de IC₅₀ de 8,6 μ M, 24,8 nM e 2 μ M, respectivamente. Estes dados sugerem que a ativação de receptores dopaminérgicos D1 possam mediar o efeito inibitório do AMPc. Já o tratamento com DA, FK ou SKF não alterou a taxa de fosforilação das ERKs pelo ATP, sugerindo que o efeito inibitório do AMPc ocorra em outra etapa da via de sinalização do ATP. O pré-tratamento das culturas com LY 294002 25 μ M, inibidor da via da PI3K/AKT, também foi capaz de inibir a incorporação de [³H]-timidina (ATP = 225,5 \pm 26,1%; ATP + LY = 37,6 \pm 6,1%, n=3), sugerindo o envolvimento desta via. Nenhum efeito de ATP foi observado quando o soro fetal foi retirado do meio de cultura, sugerindo que componentes do soro possam mediar a ativação da PI3K envolvida na proliferação celular nas culturas.

Conclusões:

Esses resultados sugerem que o ATP induz a proliferação de células de retina de pinto, de maneira dependente da ativação da enzima PI3K e de elementos do soro fetal bovino. Tendo em vista que AMPc inibiu a proliferação induzida por ATP, nossos dados levantam a hipótese de que este nucleotídeo cíclico possa interferir no efeito mitogênico do ATP através da inibição da ativação da PI3K.

03.099

SAXITOXIN EFFECTS ON NEUROTRANSMITTERS IN DISCRETE RAT BRAIN REGIONS. ¹Cervantes, R. C. ^{**}; ¹Alfonso, M.; ¹Duran, R.; ¹Campos, F.; ²Gago, A.; ³Faro, L. R. F. ¹Biología Funcional y Ciencias de la Salud, Universidad de Vigo Espanha; ²Química Universidad de Vigo; ³Fisiología UFPA

Objetivo:

Saxitoxin (STX) is a powerful neurotoxic compound belonging to a group of toxins known as Paralytic Shellfish Poisoning (PSP) toxins, which are mainly produced by certain species of dinoflagellates present in the marine phytoplankton. Their main toxicological activity is observed through the blockage of the sodium channels. The aim of the present study is to analyse the effects of STX on neurotransmitters levels in rat brain regions after acute intraperitoneal administration.

Métodos e Resultados:

Two hours after STX administration (5 and 10 μ g/kg), animals were sacrificed and brains were removed, dissected in: hypothalamus, striatum, midbrain, frontal cortex, hemispheres and brain stem. Tissue samples were homogenized by sonication in perchloric acid 0.1 M and centrifuged at 4.000 g. Neurotransmitters were analyzed by using an optimised HPLC method. Statistical analysis of the results was accomplished by means of ANOVA and Student-Newman-Keuls test, considering significant differences: P<0.01 y 0.001. Sistemic administration of STX produced a significant decrease in the concentrations of dopamine (368.37 \pm 25.38 pg/mg) and HVA (32.54 \pm 1.75 pg/mg),

but not of DOPAC (86.62 ± 5.57 pg/mg) in the hypothalamus. Intraperitoneal administration of STX (10 mg/Kg) significant increase the levels of 5-HT (698.74 ± 70.9 pg/mg) and 5-HIA (278.73 ± 45.26).

Conclusões:

These results confirm that STX administered peripherally, can cross the blood brain barrier and reaches the brain where STX produces alterations in neurotransmission, affecting the levels of dopamine and serotonin in the hypothalamus.

03.100

SOLUBLE OLIGOMERS FROM A NON-DISEASE RELATED PROTEIN MIMIC ABETA-INDUCED TAU HYPERPHOSPHORYLATION AND NEURODEGENERATION IN RAT BRAINS: POSSIBLE IMPLICATIONS FOR THE PATHOGENESIS OF ALZHEIMER'S DISEASE. ¹Vieira, N. N. M.*; ²Germano, L. F.; ¹Sebollela, A.**; ³Martinez, A. M. B.; ²Houzel, J. C.; ¹De Felice, G. F.; ¹Ferreira, T. S.; ¹Bioquímica Médica ICB-UFRJ; ²Anatomia ICB-CCS-UFRJ; ³Histologia e Embriologia UFRJ

Objetivo:

Protein aggregation and amyloid deposition in different tissues are associated with cellular dysfunction and toxicity in several important human pathologies, including Alzheimer's disease (AD). Soluble oligomers formed at the early stages of protein aggregation have recently been implicated as the main toxic species in amyloid diseases. We have investigated the aggregation of hen egg white lysozyme (HEWL), a normally harmless protein, using a variety of biophysical and biochemical techniques.

Métodos e Resultados:

The combined results obtained from turbidimetry, thioflavin T fluorescence, circular dichroism, size-exclusion chromatography, non-denaturing gel electrophoresis and transmission electron microscopy showed that aggregation of HEWL proceeds via the initial formation of beta-sheet rich roughly spherical oligomers which appear to convert into protofibrils and mature amyloid fibrils with increasing incubation times. We show that soluble oligomers of HEWL are potently neurotoxic to rat cortical neurons in culture, leading to approximately 70% neuronal death, while mature amyloid fibrils are little or non-toxic. Remarkably, in vivo injection of HEWL oligomers in the cerebral cortices of adult rats induces extensive and selective neuronal degeneration and tau hyperphosphorylation, similar to what is pathologically induced by the Abeta peptide in AD. Tau hyperphosphorylation induced by HEWL oligomers was also observed in cortical neuronal cultures. HEWL oligomers leads to an increase of 150% in phospho tau levels.

Conclusões:

These findings suggest that the neurodegeneration and tau hyperphosphorylation that are characteristic of AD may not be strictly dependent on the specific amino acid sequence of the Abeta peptide. Rather, those pathological hallmarks appear to be triggered by a specific conformation of the amyloid oligomers that accumulate in the brains of AD patients.