

- Receptores e Mecanismos de sinalização

20.001

EFFECTS OF TESTICULAR FACTORS ON THE EXPRESSION OF MUSCARINIC ACETYLCHOLINE RECEPTOR SUBTYPES IN THE RAT EPIDIDYMIS. Siu, E.R.; Yasuhara, F.\*\*; Avellar, M. C. W. D.; Porto, C. S.; Farmacologia - Endocrino Exp., UNIFESP

**Objetivo:**

The epididymal functions are influenced by many factors such as testicular factors, hormones and neural input, which plays an important role not only in sperm transport and storage, but also in protein processing and electrolyte transport (*J Androl* 19: 1, 1998). Our laboratory has shown the presence of M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub> and M<sub>3</sub> muscarinic acetylcholine receptor (mAChR) subtypes, at mRNA and protein level, along the epididymis. The expression of each mAChR transcript differed depending on the epididymal region analysed and testosterone and/or testicular factors status. The aim of this study was to further understand the regulation of mAChRs in the rat epididymis by testicular factors.

**Métodos e Resultados:**

40-day-old Wistar rats were anaesthetized and either bilateral efferent ductules ligation (EDL) or sham-operation (control) was performed according to Nicander et al. (*Int J Androl* 6: 91, 1983). After 10 days, the animals were euthanized and caput and cauda of the epididymis were either fixed in Bouin's solution or frozen in liquid nitrogen. The success of EDL was judged by histo-morphological analysis. Testosterone concentrations did not differ between the groups. The EDL resulted in a regression of the epithelium of the initial segment and absence of spermatozoa in the epididymal lumen. Ribonuclease protection assays indicated that in the caput of the epididymis, m1, m2 and m3 transcript expression remained unaffected by EDL, while in the cauda region, the ligation resulted in a slight increase in the m2 transcript level, and m1 and m3 transcripts were not affected.

**Conclusões:** The m2 transcript in the cauda region was altered by EDL, suggesting a modulation by testicular factors. Thus, the regulation of mAChRs mRNA expression by testicular factors differs between the caput and cauda epididymis.

20.002

CHARACTERIZATION OF THE ESTROGEN RECEPTOR SUBTYPES IN RAT TESTIS AND SERTOLI CELLS. <sup>1</sup> Esteves, C. A.\*\*; <sup>1</sup> Lucas, T. F. G.\*\*; <sup>2</sup> Breno, M. C.; <sup>1</sup> Porto, C. S.; <sup>1</sup> Lazari, M. F. M.; <sup>1</sup> Farmacologia - Endocrino Exp., UNIFESP; <sup>2</sup> Farmacologia, Butantan

**Objetivo:**

Estrogen has important functions in the male, and is synthesized by Sertoli, Leydig and germ cells. Two subtypes of estrogen receptors (ER) are known,  $\alpha$  and  $\beta$ , which differ in the C-terminal ligand binding domain and the N-terminal transactivation domain. ER $\beta$  has four variants:  $\beta$  1,  $\beta$  1 $\delta$  3,  $\beta$  2 and  $\beta$  2 $\delta$  3. While ER $\beta$  has a wide distribution in the testis, expression of ER $\alpha$  has not been described in Sertoli cells (*Endocr Rev* 22:289, 2001). Sertoli cells are important for support and development of germ cells, but the role of estrogen on Sertoli cell function remains to be determined. The aim of the present work was to identify the ERs present in Sertoli cells and in testis from rats in different stages of sexual development.

**Métodos e Resultados:**

Sertoli cells were obtained from 15 day-old rats and cultured for 5 days. Testes were removed from 15, 28 and 120 day-old rats. Total RNA was extracted from testis and Sertoli cells for RT-PCR. A transcript with the expected size for the  $\alpha$  subtype was detected in Sertoli cells and in testis from 28 and 120-day-old rats. A transcript with the expected size for ER $\beta$  subtypes and a transcript specific for the ER $\beta$  2 isoform were detected in Sertoli cells and in testis of all ages. To confirm the expression of the corresponding proteins, lysates of Sertoli cells were subjected to Western blot analysis, using polyclonal antibodies (Santa Cruz Biotech.) directed against a region of the C-terminal or N-terminal of ER $\alpha$  or a region of the aminoterminal of ER $\beta$ . The chemiluminescence was detected by autoradiography. A single band of about 67 kDa was detected with the antibody against ER $\alpha$ , and it was absent when the primary antibody was incubated in the presence of a blocking peptide. A 55 kDa band was detected when the membrane was incubated with the antibody against ER $\beta$ .

**Conclusões:**

Our data show that not only ER $\beta$ , but also ER $\alpha$  mRNA and protein are expressed in rat Sertoli cells. The presence of both ER subtypes suggests a role for estrogen in the control of Sertoli cell function.

20.003

COMPARATIVE DISTRIBUTION OF RELAXIN RECEPTORS IN THE REPRODUCTIVE TRACT OF THE MALE RAT. Santos, M.F. <sup>\*\*\*</sup>; Cardoso, L. C. <sup>\*</sup>; Pimenta, M. T. <sup>\*\*</sup>; Avellar, M. C. W. <sup>\*</sup>; Lazari, M. F. M.; Farmacologia - Endocrino Exp.

**Objetivo:**

Relaxin, classically seen as a female hormone, is produced by the prostate and released into the seminal fluid. Relaxin acts on two G-protein coupled receptors, LGR7 and LGR8. While LGR7 binds only relaxin, LGR8 interacts both with relaxin and the Leydig insulin-like peptide. Whereas in vitro stimulation of both recombinant receptors with relaxin activates the same signaling pathway, disruption of the LGR7 gene in males causes reduction of spermatogenesis and fertility while disruption of LGR8 causes cryptorchidism. We have previously mapped the LGR7 mRNA presence in the reproductive tract of the male rat (Abstracts SBFTe 2004, p.185). The aim of the present work was to map the LGR8 mRNA presence and to compare the distribution of the two relaxin receptors in the reproductive tract of the male rat.

**Métodos e Resultados:**

Total RNA was extracted from tissues of the male reproductive tract of Wistar rats (testis, Sertoli cells, caput and cauda epididymis, vas deferens, prostate, seminal vesicle and spermatozoa). RT-PCR was conducted with primers that annealed to different exons of LGR8 gene. We also compared the presence of LGR8 transcripts in testis, deferens, and caput and cauda epididymis from 15, 28 and 120-day-old rats. The PCR products were visualized on agarose gel stained with ethidium bromide and subjected to Southern blot with a specific <sup>32</sup>P-labeled probe. LGR8 specific transcript was absent in prostate and spermatozoa and it was only visualized after Southern blot in Sertoli cells and seminal vesicle. Expression of specific transcripts was higher in caput epididymis and testis for LGR8, and in vas deferens and testis for LGR7. No correlation was found between level of LGR8 transcripts and stage of sexual development, while there was a significant increase of expression for LGR7 with maturation in testis and a decrease in caput epididymis.

**Conclusões:**

mRNAs for both relaxin receptors LGR7 and LGR8 are widely distributed in the reproductive tract of the male rat and no marked differences in expression were found to explain possible differences in the function of these two receptors.

20.004

ANÁLISE DOS MECANISMOS ENVOLVIDOS NAS RESPOSTAS CONTRÁTEIS INDUZIDAS PELO AGONISTA B<sub>1</sub> A DES-ARG<sup>9</sup>-BK NA ÍRIS ISOLADA DE PORCO. Sayah, M. E. <sup>\*</sup>; Calixto, J. B. <sup>\*</sup>; Farmacologia, UFSC

**Objetivo:**

O objetivo do presente estudo foi analisar através de técnicas farmacológicas, alguns dos mecanismos envolvidos nas respostas contráteis (RC) induzidas pela des-Arg<sup>9</sup>-BK (DARG), após a indução do RB<sub>1</sub> com lipopolissacarídeo (LPS) de *E. coli* na íris isolada de porco (IIP) como demonstrado por (Sayah El e Calixto, FESBE, 2004).

**Métodos e Resultados:**

A íris foi isolada de olhos de porco obtidos de abatedores locais. Preparações com cerca de 2 cm de comprimento por 2 mm de largura foram montadas em cubas de vidro contendo solução de Krebs Henseleit à 37° C sob tensão basal de 100 mg. Após a montagem das preparações, foi adicionado LPS (1  $\mu$ g/mL) nas preparações por um período de tempo de 4 h. Transcorrido este período, foram feitas CCR ao agonista seletivo do RB<sub>1</sub> a DARG na ausência e na presença dos antagonistas seletivos para o receptor B<sub>1</sub> a des-Arg<sup>9</sup>-Leu<sup>8</sup>-BK (3, 10 e 30 nM), R-715 (1, 3 e 10 nM), e o antagonista benzodiazepínico-1 (3, 10 e 30 nM). Todos os antagonistas analisados foram capazes de antagonizar de forma não competitiva a RC da DARG na IIP. Por outro lado, o antagonista do RB<sub>2</sub>, o HOE140 (30 nM) não interferiu de forma significativa na RC induzida pela DARG, nessa preparação. Quando foi analisado o envolvimento dos metabólitos da via do ácido araquidônico (AA), utilizou-se o SC560 (1  $\mu$  M, inibidor da COX-1) e o NS398 (1  $\mu$  M, inibidor da

COX-2), onde os resultados mostraram que ambos forma capazes de inibir de forma significativa a RC induzida pela DARG com IMax de ( $21 \pm 4$  e  $55 \pm 6$  %, respectivamente). Além disso, a pré-incubação com os inibidores da síntese do tromboxano A<sub>2</sub> e do leucotrieno D<sub>4</sub> (dazoxiben e MK571, 100 nM respectivamente) significativamente inibiram a RC induzida pela DARG com I<sub>max</sub> de  $54 \pm 2$  e  $49 \pm 2$  %, respectivamente. Além disso, os inibidores da proteína quinase C, PKC (GF109203X, 1 μM), p38 MAPK (SB203580, 10 μM) e da MEK-1 (PD98059, 10 μM) causaram inibição de  $30 \pm 2$ ,  $28 \pm 3$  e  $66 \pm 2$ %, respectivamente. Ainda foi analisado a participação do Ca<sup>2+</sup> nas RC induzidas pela DARG na presença e na ausência do Ca<sup>2+</sup> extracelular, e os resultados mostraram que a RC é dependente do Ca<sup>2+</sup> extracelular. Além disso, o inibidor de canal de Ca<sup>2+</sup> tipo L a nicardipina (1μM), causou inibição de  $28 \pm 3$ %, na RC induzida pela DARG. No entanto, os inibidores de canal de Ca<sup>2+</sup> do tipo N e P (0,1 μM, ω-agatoxina IVA e ω-agatoxina MVIIA, respectivamente) não causaram qualquer alteração na RC induzida pela DARG na IIP.

#### **Conclusões:**

Analisados em conjunto, esses resultados mostraram que a RC induzida pela DARG, parece ter o envolvimento dos metabólitos derivados do AA, e com a participação das MAPK (MEK-1, p38 MAPK), bem como da PKC. Além disso a RC induzida pela DARG é dependente do influxo de Ca<sup>2+</sup> do meio extracelular e da ativação de canais de Ca<sup>2+</sup> do tipo L, porém não do tipo N ou P.

20.005

O ENVOLVIMENTO DOS "LIPID RAFTS" NA PERMEABILIZAÇÃO INDUZIDA POR ATP EXTRACELULAR EM MACRÓFAGOS Vieira, F. S. \*; Marques, C.S.; Coutinho-Silva, R.; Biofísica CCS, UFRJ

#### **Objetivo:**

Os "lipid rafts" de membrana são microdomínios dinâmicos agregados de colesterol, proteínas e esfingolipídios. Recentemente foi demonstrado que alguns receptores, tais como TLR 4 e CD14, encontram-se associados aos "lipid rafts" em resposta a estimulação com LPS, sendo, portanto estes domínios de extrema relevância em fenômenos de sinalização e ativação celular. Sabe-se que drogas como a nistatina e a metil-β ciclodextrina (MCD) são capazes de romper a integridade dos "lipid rafts", podendo modular respostas celulares. Os receptores purinérgicos P2 induzem modulação da resposta imune e participam de processos de sinalização e ativação celular sendo potencializados por LPS. Objetivo: Investigar a presença de receptores purinérgicos (P2X<sub>7</sub>) nos "lipid rafts", além de investigar a participação de um receptor Toll na sinalização que leva a permeabilização celular.

#### **Métodos e Resultados:**

Utilizou-se macrófagos peritoneais (MØ) residentes de camundongo (Suíço) e linhagem de macrófagos (J774/G8). As células foram tratadas por 10 minutos com nistatina 10 e 50μg/ml ou MCD 10mM a 37°C. Posterior ao tratamento, foi feito um ensaio de permeabilização, no qual as células foram incubadas ou não com ATP 5mM na presença de um corante fluorescente Brometo de Etídeo (BE) a 37°C por 10 minutos. O mesmo ensaio com tratamento com ATP foi feito em MØ de camundongo TLR2/KO. Para medir a taxa de permeabilização celular utilizou-se microscopia óptica de fluorescência (contagem de aproximadamente 1000 células por experimento), para análise de célula J774, e citometria de fluxo, para MØ, utilizando BE 10μg/ml e 2.5μg/ml respectivamente.

Resultados: Observou-se que o pré-tratamento com nistatina levou a uma inibição de  $59 \pm 7$ % (n=5) na permeabilização induzida por ATP em macrófagos peritoneais. Já em macrófagos J774 a inibição foi de  $39 \pm 5$  % (n=8). O pré-tratamento com MCD inibiu a permeabilização em  $45.49 \pm 2$ % (n=3). A permeabilização em células de camundongos TLR2/KO foi  $37 \pm 6$ % (n=5) menor se comparada a camundongos selvagens.

#### **Conclusões:**

A nistatina e o MCD, possivelmente, ao romper a integridade dos "lipid rafts", modulam a resposta de MØ e de linhagem à ATP extracelular. O receptor TLR 2 pode estar envolvido em alguma via de sinalização que leva a permeabilização.

20.006

RELAXATIONS OF RABBIT (RbCC) AND HUMAN (HCC) CORPUS CAVERNOSUM BY BAY 41-2272: ROLE OF POTASSIUM CHANNELS AND SYNERGISM WITH ENDOGENOUS AND EXOGENOUS NITRIC OXIDE (NO) <sup>1</sup> Baracat, J. S. ; <sup>1</sup> Priviero, F. B. M. \*\*; <sup>2</sup> Claudino, M. A. \*\*; <sup>1</sup> Teixeira, C. E.; <sup>1</sup> Antunes, E. ; <sup>1</sup> de Nucci, G.; <sup>1</sup> Farmacologia, UNICAMP; <sup>2</sup> Ciências Médicas, UNICAMP

**Objetivo:**

BAY 41-2272 was recently identified as a potent sGC stimulator in a nitric oxide (NO)-independent manner. This study aimed to investigate the participation of potassium channel, NO donor and NANC fibres in the corpus cavernosum smooth muscle BAY 41-2272-evoked relaxations.

**Métodos e Resultados:**

Strips of RbCC and HCC were mounted in organ baths, and connected to isometric transducers to record BAY 41-2272-evoked relaxations in the absence and presence of the potassium channel blockers apamine (AP, 0.1 μM), charybdotoxin (ChTX, 0.1 μM), glibenclamide (10 μM), tetraetilamonium (TEA, 3 μM) and 4-aminopiridina (4-AP, 1 μM). Addition of BAY 41-2272 (0.01-10 μM) relaxed phenylephrine-precontracted RbCC (n=3) and HCC (n=3) in a concentration-dependent manner, with pEC<sub>50</sub> values of 6.70 ± 0.25 and 5.60 ± 0.10, respectively. The potassium channel blockers AP, ChTX, 4-AP, glibenclamide and TEA all failed to significantly affect the BAY 41-2272-evoked relaxations either in RbCC or HCC. In separate experiments, electrical field stimulation (EFS, 2-32 Hz, 50 V, 10s) caused frequency-dependent relaxations in RbCC and HCC, which were markedly potentiated by BAY 41-2272 (0.1 μM) in both tissues. Similarly, cavernosal relaxations evoked by either the NO donor sodium nitroprusside (SNP; 0.01-10 μM) or the authentic NO (1-100 μM) were greatly potentiated by BAY 41-2272 (0.1 μM).

**Conclusões:**

Our results indicate that BAY 41-2272-evoked relaxations are not modulated by potassium channels. On the other hand, relaxations by BAY 41-2272 synergize with endogenous and exogenous NO, causing a maximum erectile response.

20.007

THE TRUNCATED HEPATITIS C VIRUS CORE PROTEIN CAN ADOPT AN INTERMEDIATE STRUCTURE IN THE PRESENCE OF SEVERAL LIGANDS <sup>1</sup> Lima, S. M. B. \*\*; <sup>1</sup> Souza, T. L. F. ; <sup>1</sup> Vaz, A. C. Q. ; <sup>2</sup> Peabody, D. S. ; <sup>1</sup> Silva, J. L.; <sup>1</sup> Oliveira, A. C. ; <sup>1</sup> Bioquímica Médica - CCS, UFRJ; <sup>2</sup> Microbiology and Tumor Biology Center, University of New Mexico

**Objetivo:**

Many gene sequences in eukaryotic genomes encode entire proteins or large segments of proteins that lack a well-structured three-dimensional folding. Disordered regions can be highly conserved between species and contrary to the traditional view that the function of a protein is closely linked to its three-dimensional structure, disordered regions are often functional. Many disordered segments fold on binding to their biological targets (coupled folding and binding), whereas other ones constitute flexible linkers that have a role in the assembly of macromolecular arrays. The Hepatitis C virus core protein has a random structure in the absence of the C-terminal. This random structure seems to be responsible for modulation of several cellular processes or induction of hepatocellular carcinoma. Here we investigate the conformational changes of this protein in the presence of different ligands.

**Métodos e Resultados:**

To investigate the conformational changes of this protein in the presence of different sequences of nucleic acids, a hydrophobic probe bis-ANS, SDS monomers, TFE and butanol, we utilized fluorescence and circular dichroism spectroscopy. That compounds can induce changes in the secondary and tertiary structures of HCV core protein.

**Conclusões:**

The results show that HCV core protein can adopt an intermediate structure in the presence of several ligands. This structural studies are very important to understand the mechanisms of HCV infection and to the development of new drugs as a treatment of hepatitis C.

20.008

ALTERATIONS IN THE INSULIN SIGNALING AND ACTIN CYTOESKELETON IN ADIPOCYTES OF ADULT RATS UNDERNOURISHED DURING EARLY LACTATION. <sup>1</sup> Garcia-Souza, É. P. ; <sup>1</sup>

Silva, S. V. D. <sup>\*\*</sup>; <sup>1</sup> Baeta Rodrigues, D. S. <sup>\*</sup>; <sup>1</sup> Nascimento, A. B. <sup>\*</sup>; <sup>2</sup> Moura, A. S. <sup>\*</sup>; <sup>1</sup> Freitas, M. S. <sup>\*</sup>; <sup>1</sup> Barja-Fidalgo, C. <sup>\*</sup>; <sup>1</sup> Farmacologia e Psicobiologia, UERJ; <sup>2</sup> Fisiologia, UERJ

**Objetivo:**

Early postnatal nutrition has been associated with the long-term effects on glucose homeostasis in adulthood. Our group recently demonstrated that undernutrition during early lactation affects the expression and activation of key proteins of insulin signaling cascade in skeletal muscle of rats (*Bioch. Bioph. Acta*, 1639:8, 2003). To elucidate the molecular mechanisms by which undernutrition during early life leads to changes in insulin sensitivity in peripheral tissues, we investigated the insulin signaling in adipose tissue isolated from epididymal fat pads of rats

**Métodos e Resultados:**

Adipocytes were isolated from adult male offspring of rat dams fed either a normal or protein-free diet during the first 10 days of lactation. The cells were incubated with 100 nM of insulin before the assay for immunoblotting analysis, 2-deoxyglucose uptake or immunocytochemistry for GLUT-4 and actin filaments.

After insulin stimulation, IR and IRS-1 from adipocytes isolated from undernourished rats presented reduced tyrosine phosphorylation, when compared with controls. On the other hand, IRS-2 and Akt phosphorylation was increased in undernourished group. We also observed alterations in the actin cytoskeleton and in glucose transporter membrane expression, with increased levels of F-actin GLUT-4, which result in increased glucose uptake in adipocytes from undernourished rats (C:3±0,3; CI:10±0,2; U:5±0,4; UI:18±1,1; pmol/min/mg of protein).

**Conclusões:**

The data suggest that early postnatal undernutrition impairs insulin sensitivity in adulthood by promoting changes in critical steps of insulin signaling in adipose tissue, and leading to permanent changes in glucose metabolism and hormonal homeostasis.

20.009

VERSATILITY AND LIMITATIONS OF THE USE OF TAGGED G-PROTEIN COUPLED RECEPTORS (GPCRS). Pimenta, M. T.; Santos, M.F. <sup>\*\*</sup>; Porto, C. S. <sup>\*</sup>; Lazari, M. F. M. <sup>\*</sup>; Farmacologia - Endocrino Exp., UNIFESP

**Objetivo:**

GPCRs are membrane proteins usually expressed in very low levels. To facilitate functional studies they must be expressed as recombinant proteins in heterologous systems. The use of tagged receptors has become an important tool for the study of receptor expression, providing a way to link biochemical, pharmacological, and cell biology studies with receptor distribution and functional dynamics in cell culture. Our aim is to correlate function and subcellular distribution of the rat FSH receptor (FSHR), a member of the GPCR superfamily. With this purpose, we studied FLAG or GFP-tagged FSHRs expressed in HEK-293 cells.

**Métodos e Resultados:**

To express the native FSHR we used a construct with the cDNA encoding the open reading frame plus part of the 3' and 5'-untranslated regions, inserted into pcDNA1.1/amp vector. Using PCR strategies we introduced a FLAG epitope immediately after the sequence encoding the signal peptide, allowing the mature protein to contain the tag at its aminoterminal end. For the other construction, we removed the stop codon and replaced it with a *Bam*H I site, to allow insertion into pEGFPN1 vector and the expression of a protein with GFP fused at the carboxiterminal end. Identity of the constructs was confirmed by automated sequencing. HEK-293 cells were transiently transfected by the calcium phosphate method. Two days later, expression of the recombinant proteins was analyzed by Northern blot and fluorescence microscopy, and function was analyzed by binding assays and cAMP radioimmunoassay. Northern analysis showed the expression of the mRNAs for all constructs. Fluorescence microscopy revealed that the tagged receptors were predominantly expressed in intracellular compartments. High levels of binding and cAMP production were obtained with the native but not with the tagged FSHRs.

**Conclusões:**

The cDNAs encoding FSHRs with an aminoterminal FLAG or carboxiterminal GFP are expressed in HEK-293 cells, but their function is severely blunted compared to the native receptor. Blunted function seems due to the failure of the tagged receptors to reach the cell membrane. Posttranslational modifications may be compromised in these tagged proteins.

20.010

INTERAÇÃO DOS DERIVADOS DO [2-(4-BENZAMIDO) ETIL] BENZILDIMETILAMÔNIO COM OS RECEPTORES NICOTÍNICOS NEURONAIS <sup>1</sup> Ghedini, P. C. ; <sup>2</sup> Amaral, A. T. ; <sup>3</sup> Lima, T. C. D. ; <sup>1</sup> Lima-Landman, M. T. R. ; <sup>1</sup> Lapa, A. J. ; <sup>1</sup> Souccar, C. ; <sup>1</sup> Farmacologia e Toxicologia UNIFESP; <sup>2</sup> Química, USP; <sup>3</sup> Farmacologia, UFSC

**Objetivo:**

Na procura de compostos com ações específicas para a caracterização dos diferentes subtipos de receptores nicotínicos neuronais e sua importância fisiológica, foi analisada a interação de uma série de brometos de [2-(4-benzamido) etil] benzildimetilamônio com os análogos *para*-substituídos: 2-(4-bromo) (Br-Br), 2-(4-cloro) (Cl-Br) e 2-(4-hexil) (hexil-Br) com os receptores nicotínicos neuronais (NACHR) dos subtipos  $\alpha 7$  e  $\alpha 4\beta 2$ . Os mesmos derivados interagiram com o receptor nicotínico muscular e bloquearam a transmissão neuromuscular do diafragma isolado de camundongo (*Ghedini e col.*, SBFTE, 2004, res. 01.023).

**Métodos e Resultados:**

A interação dos compostos com os receptores nicotínicos  $\alpha 7$  e  $\alpha 4\beta 2$  foi analisada em curvas de competição com os ligantes específicos: [<sup>125</sup>I]  $\alpha$ -bungarotoxina ([<sup>125</sup>I]-BUTX: 2 nM, 60 min, 25°C) ou [<sup>3</sup>H]-Citisina (1 nM, 75 min, 4°C), respectivamente, em membranas extraídas de cérebro total de ratos. A incubação de concentrações crescentes dos derivados (0,1  $\mu$ M a 1 mM, n=3) reduziu a ligação específica da [<sup>125</sup>I]-BUTX com  $CI_{50}$  para Cl-Br = 145,4  $\mu$ M (84,9 – 248,7  $\mu$ M), Br-Br = 358,7  $\mu$ M (96,1–1339,0  $\mu$ M) e Hexil-Br = 179,0  $\mu$ M (36,9– 868,9  $\mu$ M). Na presença de concentrações iguais desses compostos, a ligação específica da [<sup>3</sup>H]-Citisina foi também reduzida com  $CI_{50}$  de: Cl-Br = 132,2  $\mu$ M (100,7 – 173,4  $\mu$ M), Br-Br = 287,1  $\mu$ M (155,5 – 530,2  $\mu$ M) e hexil-Br = 344,1  $\mu$ M (171,6 – 690,0  $\mu$ M). Comparativamente, a BUTX não radioativa e a nicotina, ligantes específicos dos receptores  $\alpha 7$  e  $\alpha 4\beta 2$ , reduziram a ligação da [<sup>125</sup>I]-BUTX e da [<sup>3</sup>H]-Citisina com  $CI_{50}$  de 6,0  $\eta$ M (3,4 – 10  $\eta$ M) e 1,06  $\eta$ M (0,77 -1,40  $\eta$ M), respectivamente.

**Conclusões:**

Os dados mostram que a potência relativa dos análogos na interação com os NACHR  $\alpha 7$  e  $\alpha 4\beta 2$  foi 30.000 a 300.000 vezes menor que a da BUTX e da nicotina, indicando a ligação dos derivados a sítios de baixa afinidade do receptor / canal iônico.

20.011

PARTICIPAÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO NA DISPERSÃO PIGMENTAR INDUZIDA PELA RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA EM MELANÓFOROS DO CARANGUEJO *CHASMAGNATHUS GRANULATA*. Vargas, M.A. <sup>\*\*</sup>; Cruz, B. P. <sup>\*</sup>; Maciel, F. E. <sup>\*\*</sup>; Geish, M. A. <sup>\*</sup>; Muccillo-Baisch, A. L. ; Nery, L. E. M. ; Ciências Fisiológicas, FURG

**Objetivo:**

O caranguejo *C. granulata* apresenta uma dispersão pigmentar dose-dependente nos seus melanóforos quando exposto a radiação ultravioleta (UVR) (Pigment Cell Res 17: 545, 2004). Esta dispersão pigmentar é independente dos neuro-hormônios do complexo órgão X – glândula do seio. Nos vertebrados vários trabalhos têm apontado o óxido nítrico (NO) como uma importante molécula sinalizadora para a resposta pigmentar induzida pela UVR. Portanto, este trabalho estudou a participação do NO na dispersão pigmentar induzida pela UVR nos melanóforos de *C. granulata*, através da verificação do efeito do bloqueador da óxido nítrico sintase, L-NAME.

**Métodos e Resultados:**

Machos adultos de *C. granulata* foram expostos durante 30 min a doses de UVA (6,4; 1,5; 0,6; 0,2; 0,07 J/cm<sup>2</sup>) e UVB (8,1; 3,1; 1,2; 0,9; 0,6; 0,03 J/cm<sup>2</sup>). Quinze minutos antes de serem expostos a UVR os animais receberam 100 $\mu$ L de L-NAME (5mM) ou solução fisiológica (SF). Um grupo embora não exposto a UVR, recebia o mesmo volume de SF ou L-NAME. O grau de dispersão pigmentar foi verificado antes da injeção, 15 min após injeção e nos tempos 0, 15, 30, 60, 90, 120 e 150 min após exposição a UVR. A dispersão pigmentar foi calculada na forma de resposta integrada padrão (SIR) (Experientia 23: 962, 1967) e comparados pela ANOVA de duas vias. Os animais que receberam L-NAME apresentaram uma menor dispersão pigmentar quando comparados com aqueles que receberam solução fisiológica, tanto para UVA (p=0,04) como UVB (p<0,01), apresentando valores de SIR, na maior dose de UVA para o grupo SF de 16,9  $\pm$  1,1 e

para o grupo L-NAME de  $13,1 \pm 0,7$  e na maior dose de UVB,  $13,7 \pm 1,4$  para SF e  $11,1 \pm 0,5$  para L-NAME.

**Conclusões:**

A dispersão pigmentar induzida pela UVR, tanto UVA como UVB, é dependente da via do NO como fonte sinalizadora para as células pigmentares.

20.012

EFFECTS OF FULVESTRANT ON MUSCARINIC ACETYLCHOLINE RECEPTOR EXPRESSION AND ACTIVATOR PROTEIN 1 IN RAT EFFERENT DUCTULES AND EPIDIDYMIS. Yasuhara, F.; Avellar, M. C. W. ; Porto, C. S.; Farmacologia - Endocrino Exp., UNIFESP

**Objetivo:**

Estrogens may modulate the activity of transcription factors and the expression of proteins in excurrent ducts, acting on estrogen receptors (ERs)  $\alpha$  and  $\beta$  of the male reproductive tract. The treatment of rats with the pure antiestrogen, fulvestrant, regulates the expression of proteins involved in fluid reabsorption in the efferent ductules, with eventual decrease of fertility (Trends in Endocrinol and Metab 13: 349, 2002; Reprod Biol Endocrinol 1: 52, 2003). Our laboratory has shown that the expression of muscarinic acetylcholine receptor (mAChR) transcripts in rat epididymis may be modulated by other factors besides androgens. The aim of this study was to investigate the action of estrogens on mAChR transcript expression in efferent ductules and on the activity of the AP-1 (activator protein 1) in epididymis using antiestrogen treatment.

**Métodos e Resultados:**

Male Wistar rats (30-day old) were treated with vehicle (soil oil) or fulvestrant (Faslodex, 10mg/rat, sc, once/week, 2 months). Control rats (30- and 90-day old) were also used. Ribonuclease protection assays were carried out using total RNA from efferent ductules and specific probes for m1, m2 and m3 mAChR transcripts. The levels of mAChR transcripts were similar between the control groups. Treatment with fulvestrant increased the levels of m2 transcript and reduced the expression of m1 and m3 transcripts. Gel shift assays were performed with  $^{32}\text{P}$ -AP-1 probe and nuclear extracts of caput, corpus and cauda epididymis from control and treated rats. Preliminary studies showed an activation of AP-1 in the corpus epididymis from treated rats. Further studies will be necessary to evaluate AP-1 pathway activation by estrogens in the caput and cauda epididymis.

**Conclusões:**

The results suggest that estrogens may regulate mAChR transcripts expression in rat efferent ductules and modulate the activity of AP-1 in corpus of epididymis.

20.013

PROTEÍNA DISSULFETO ISOMERASE (PDI): UMA NOVA PROTEÍNA REGULADORA NA GERAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO. <sup>1</sup> Silva, A. C. B. ; <sup>1</sup> Frey, G. P. ; <sup>1</sup> Verissimo, S. F. ; <sup>2</sup> Laurindo, F. R. M. ; <sup>1</sup> Lopes, L. R. ; <sup>1</sup> Farmacologia - ICB I, USP; <sup>2</sup> Faculdade Medicina, INCor

**Objetivo:** A NADPH oxidase é um complexo enzimático com subunidades de membrana (gp91<sup>phox</sup> e p22<sup>phox</sup>) e citosólicas (p40<sup>phox</sup>, p47<sup>phox</sup>, Rac2 e p67<sup>phox</sup>), responsável pela geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) com função microbicida em fagócitos. A PDI, enzima da família das tiol oxidorredutases, é responsável pelo controle do estado redox de grupos tióis em diversos sítios celulares. Estudos demonstram que a presença de grupos tióis no estado reduzido é importante para a atividade da NADPH oxidase. Como a reação de troca tiol-dissulfeto espontânea é lenta, postulamos que tiol oxidorredutases possam controlar o estado redox da NADPH oxidase e modular a sua atividade. O objetivo do estudo foi investigar o papel da PDI na regulação da atividade da NADPH oxidase de neutrófilos.

**Métodos e Resultados:** A interação física entre a PDI e as subunidades da NADPH oxidase foi estudada por técnicas de co-immunoprecipitação e co-imunofluorescência em microscopia confocal. Neutrófilos isolados do sangue de indivíduos normais foram submetidos a diferentes estímulos (acetato de forbol miristato, ácido araquidônico e peptídeo formilado) e incubados com anticorpos contra PDI (vermelho, rodamina) e p22<sup>phox</sup> (verde, FITC). Os lisados de neutrófilos, estimulados ou não, foram imunoprecipitados com anticorpo anti-PDI e analisados (western blotting) quanto à presença de componentes da NADPH oxidase. Os resultados sugerem a interação da PDI com as

subunidades p47<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup> e p22<sup>phox</sup>. A ativação da NADPH oxidase aumenta em 100% a marcação do p22<sup>phox</sup> e a sua co-localização com a PDI.

**Conclusões:** A proteína dissulfeto isomerase pode representar uma nova proteína reguladora da atividade da NADPH oxidase.

20.014

EFFECTS OF ESTROGEN ON SUBCELLULAR LOCALIZATION OF ESTROGEN RECEPTORS IN RAT SERTOLI CELLS. Lucas, T. F. G.; Lázari, M. F. M. ; Porto, C. S. ; Farmacologia, UNIFESP

**Objetivo:**

Estrogen plays a role in the regulation of the male reproduction. Classical actions of estrogen, referred as genomic actions, are mediated by two receptors, ER $\alpha$  and ER $\beta$ , acting through activation of gene transcription. In the last years, rapid actions have also been described for estrogen, but it remains to be elucidated the mechanism for these non genomic actions (Nature 390:509, 1997). 17 $\beta$ -estradiol (E2) induces a translocation of ER $\alpha$  to the cell membrane in MCF-7 cells (PNAS 101: 2076, 2004) and this mechanism could mediate nongenomic actions. We have detected both ER subtypes in Sertoli cells by RT-PCR and Western blot. The aim of the present work was to determine the expression of ER subtypes in Sertoli cells and the effect of E2 upon the subcellular distribution of these receptors.

**Métodos e Resultados:** Sertoli cells were obtained from 15-day-old Wistar rats. After plating on cover slips coated with 0.1% gelatin in 6-well plates, cultures were kept as previously described (Life Sci. 75:1761, 2004), using phenol red-free medium. After 5 min of incubation in the absence and presence of E2 (10<sup>-10</sup> M), cells were fixed in 2% paraformaldehyde. After blockade with PBS containing 1% BSA and 0.01% saponin for 15 min, cells were incubated with polyclonal antibodies against ER $\alpha$  and ER $\beta$  (1:50), for 60 min at room temperature, in the same buffer. The product of immune reactions was revealed by incubating the cells with Alexa Fluor 594 (1:300) for 45 min. Nuclei were visualized by staining with DAPI. The subcellular localization was assessed by fluorescence and confocal microscopy. In the absence of E2, a positive immunoreactivity was detected for both ER subtypes in the nucleus of Sertoli cells. After 5 min incubation with E2, there was a translocation of both ER subtypes from the nucleus to the plasma membrane.

**Conclusões:**

Estrogen treatment of Sertoli cells induces translocation of ER $\alpha$  and ER $\beta$  from the nucleus to the plasma membrane. The availability of ERs on the plasma membrane suggests a more complex role of the estrogen signaling in Sertoli cells, and that the two ER subtypes may be involved in non genomic actions of estrogen.

20.015

"O PORO CITOLÍTICO ASSOCIADO AO RECEPTOR P2X<sub>7</sub> NECESSITA DA AÇÃO DE SEGUNDOS MENSAGEIROS" Faria, R. X.; de Farias, F. P.; Alves, L. A.; Imunologia, FIOCRUZ

**Objetivo:**

A estimulação do receptor P2X<sub>7</sub> pelo ATP induz despolarização da membrana celular, aumento na concentração de Ca<sup>2+</sup> intracelular e, em muitos casos, permeabilização da membrana celular a moléculas de até 900 Da. Uma das questões mais intrigantes sobre o receptor P2X<sub>7</sub> ocorre após sua ativação, onde dois fenômenos distintos foram observados: a abertura de um canal catiônico de baixa condutância (8 pS) e a formação de um poro. Atualmente, há pelo menos duas hipóteses postuladas: 1) o poro P2X<sub>7</sub> é formado como resultado do aumento gradual da permeabilidade (dilatação) dos canais catiônicos; 2) o poro P2X<sub>7</sub> representa uma "canal distinto", ativado por um segundo mensageiro.

Baseado nessas propriedades, investigamos se existe um segundo mensageiro envolvido na formação do poro, e a via de sinalização intracelular.

**Métodos e Resultados:**

Estudamos as células 2BH4 que expressam o receptor P2X<sub>7</sub> usando a técnica *patch clamp* nas configurações *whole cell* e *cell attached*. Concomitantemente ao registro eletrofisiológico registramos a captação de brometo de etídeo (BE) após a adição de ATP.

Registramos correntes unitárias, após a aplicação de ATP com condutância de 445  $\pm$  8 pS (n= 12). Quantificamos a captação de (BE) com t<sub>1/2</sub> de 125  $\pm$  15 s (n= 12). Adicionando agonistas e antagonistas, confirmamos que o receptor P2X<sub>7</sub> era o responsável pela formação do poro.



Diminuindo a concentração intracelular de  $Ca^{2+}$ , usando quelante como, BAPTA-AM, ou aplicando ionóforos de  $Ca^{2+}$  como a ionomicina, demonstramos que o  $Ca^{2+}$  age como um segundo mensageiro para formação do poro associado ao receptor P2X<sub>7</sub> (Faria et al, 2005). E verificamos a participação de MAPK e o citoesqueleto após usarmos seus respectivos bloqueadores.

**Conclusões:**

Nossos dados suportam que o  $Ca^{2+}$  e MAPK podem ser segundos mensageiros associados com a formação do poro. E componentes do citoesqueleto são importantes para a formação do poro associado ao receptor P2X<sub>7</sub>.

20.016

“O PORO CITOLÍTICO DO RECEPTOR P2X<sub>7</sub> É REGULADO POR SEGUNDOS MENSAGEIROS”  
Faria, R. X.; de Farias, F. P. ; Alves, L.A. ; Imunologia, FIOCRUZ

**Objetivo:**

A estimulação do receptor P2X<sub>7</sub> pelo ATP induz despolarização da membrana celular, aumento na concentração de  $Ca^{2+}$  intracelular e, em muitos casos, permeabilização da membrana celular a moléculas de até 900 Da. Uma das questões mais intrigantes sobre o receptor P2X<sub>7</sub> ocorre após sua ativação, onde dois fenômenos distintos foram observados: a abertura de um canal catiônico de baixa condutância (8 pS) e a formação de um poro. Atualmente, há pelo menos duas hipóteses postuladas: 1) o poro P2X<sub>7</sub> é formado como resultado do aumento gradual da permeabilidade (dilatação) dos canais catiônicos; 2) o poro P2X<sub>7</sub> representa uma "canal distinto" que poderia ser ativado por um segundo mensageiro. Baseado nessas propriedades, investigamos se existiria um segundo mensageiro envolvido na formação do poro, e a via de sinalização intracelular.

**Métodos e Resultados:**

Estudamos as células 2BH4 que expressam o receptor P2X<sub>7</sub> usando a técnica *patch clamp* nas configurações *whole cell* e *cell attached*. Concomitantemente ao registro eletrofisiológico registramos a captação de brometo de etídeo (BE) após a adição de ATP.

Registramos correntes unitárias, após a aplicação de ATP com condutância de  $445 \pm 8$  pS (n= 12). Quantificamos a captação de (BE) com  $t_{1/2}$  de  $125 \pm 15$  s (n= 12). Adicionando agonistas e antagonistas, confirmamos que o receptor P2X<sub>7</sub> era o responsável pela formação do poro. Diminuindo a concentração intracelular de  $Ca^{2+}$ , usando quelante como, BAPTA-AM, ou aplicando ionóforos de  $Ca^{2+}$  como a ionomicina, demonstramos que o  $Ca^{2+}$  age como um segundo mensageiro para formação do poro associado ao receptor P2X<sub>7</sub>. E verificamos a participação de MAPK e o citoesqueleto após usarmos seus respectivos bloqueadores.

**Conclusões:**

Nossos dados indicam que o  $Ca^{2+}$  e MAPK são segundos mensageiros associados com a formação do poro. Além disso, componentes do citoesqueleto são importantes para a formação do poro associado ao receptor P2X<sub>7</sub>.

20.017

HO-1 EXPRESSION IN HUMAN T LYMPHOCYTES VIA INTEGRIN SIGNALING PATHWAY INDUCED BY RGD-DISINTEGRIN. <sup>1</sup> Lopes, C.V. ; <sup>2</sup> E., H. \*\*; <sup>1</sup> Arruda, M. A. \*\*; <sup>3</sup> Marcinkiewicz, C. ; <sup>1</sup> Barja-Fidalgo, C. ; <sup>1</sup> Freitas, M. S. ; <sup>1</sup> Farmacologia e Psicobiologia, UERJ; <sup>2</sup> Farmácia e Farmacologia, UERJ; <sup>3</sup> Biology, Temple University

**Objetivo:**

Dynamic regulation of integrins is critical for both adhesion and signaling in T-cell activation. Cell adhesion to extracellular matrix (ECM) is primarily mediated by binding integrins to RGD motif found on ECM proteins. Disintegrins contain the RGD sequence, which confers their selectivity to integrin interaction. In previous study, we have demonstrated that monomeric RGD-disintegrins, flavordin (Fl), kistrin (Kr) and echistatin (Ech) were able to modulate T-cell proliferation induced by Con A through integrin activation. Recently, it has been reported that human T cells expressing heme oxygenase 1 (HO-1) display lower proliferative response. In this work we investigated if these disintegrins were capable to induce HO-1 and ferritin expression.

**Métodos e Resultados:**

Disintegrins induced HO-1 and ferritin expression, by immunoblotting and immunocytochemistry assays. This HO-1 induction was partially dependent of NF- $\kappa$ B activation and also involved MAPK pathways. Furthermore, the lymphoproliferative state was measured by [<sup>3</sup>H]-thymidine incorporation

after 3 days. FI increased the proliferative response ( $28000 \pm 2300$ cpm) induced by CD3 while Kr had no significance effect ( $24000 \pm 1850$  cpm). In contrast, Ech diminished the CD3-induced T cell proliferation ( $18000 \pm 4250$  cpm). In group stimulated only with CD3 the response was around  $24000 \pm 1600$  cpm. To investigate the involvement of HO-1 activity in cell proliferation, T cells were treated with an HO-1 inhibitor, SnPP, during both stimuli with disintegrins and anti-CD3. HO-1 inhibition had no effect on the proliferative response.

**Conclusões:**

These findings show that integrin signaling mediated by RGD-disintegrins induce expression of HO-1 and ferritin in human T cells, in addition to its role in the regulation the proliferative response during TCR activation.

20.018

SLOW CALCIUM SIGNALING INDUCED BY BETA-ADRENOCEPTOR IN SNAKE VENOM GLAND. <sup>1</sup> Zablith, M. B. ; <sup>1</sup> Kerchove, C. M. ; <sup>2</sup> Smali, S. S. ; <sup>1</sup> Yamanouye, N. ; <sup>1</sup> Farmacologia, Butantan; <sup>2</sup> Farmacologia, UNIFESP

**Objetivo:**

AIM: The stimulation of beta-adrenoceptors present in *Bothrops jararaca* venom gland is important to trigger the venom production cycle. These receptors have a different pharmacological profile from those described in mammals but they are coupled to cAMP signaling pathway (Yamanouye et al, Life Sci, 67, 217, 2000). In this study, we are evaluating the participation of  $Ca^{2+}$  signaling during beta-adrenoceptor stimulation.

**Métodos e Resultados:**

METHODS AND RESULTS: *Bothrops jararaca* snakes (100g-400g) were used in this study. The intracellular  $Ca^{2+}$  was measured in dispersed secretory cells of snake venom gland by fluorimetric method, using fura-2-AM as a fluorophore. Isoprenaline was able to induce a slow dose-dependent increase in the intracellular  $Ca^{2+}$  concentration in both free ( $22.53 \pm 7.2\%$ , n=7) and 2.5mM  $Ca^{2+}$  medium ( $56.61 \pm 11.13\%$ , n=7) from the basal, and these values are significantly different ( $p < 0.05$ ). Diltiazem (L-type  $Ca^{2+}$  channel blocker) partially inhibited intracellular  $Ca^{2+}$  influx induced by isoprenaline ( $30.8 \pm 3.81\%$ , n=7) in cells in 2.5mM  $Ca^{2+}$  medium. We further verified whether Protein Kinase A (PKA) was involved in these effects. Surprisingly PKA inhibitor (PKI) by itself increased intracellular  $Ca^{2+}$  concentration in free ( $23.35 \pm 7.35\%$ , n=3) and 2.5mM  $Ca^{2+}$  medium ( $23.44 \pm 6.54\%$ , n=3) in the same magnitude.

**Conclusões:**

These data show that the stimulation of beta-adrenoceptors mobilized  $Ca^{2+}$  from intracellular stores and promoted extracellular  $Ca^{2+}$  influx partially through L-type  $Ca^{2+}$  channel, showing that the signaling pathways coupled to beta-adrenoceptors in the secretory cells of the venom gland of *Bothrops jararaca* are complex, and involve increases in the intracellular level of both cAMP and  $Ca^{2+}$ . In addition, PKA modulates intracellular  $Ca^{2+}$  channels in the basal condition of the secretory cells.

20.019

EFFECTS OF TESTOSTERONE ON MUSCARINIC ACETYLCHOLINE RECEPTOR SUBTYPES IN THE RAT SEMINAL VESICLE. Hamamura, M.; Yasuhara, F. ; Avellar, M. C. W. D. ; Porto, C. S. ; Farmacologia, UNIFESP

**Objetivo:**

The primary function of the autonomic innervation within the seminal vesicle is to mediate contraction, protein secretion and mitogenic effects (Arch int Pharmacodyn Ther 250:2043, 1981; Endocrinology 121:1678, 1987; Acta Physiol Scand 153:189, 1995; Life Sci. 75:1449, 2004). In our laboratory,  $M_2$ ,  $M_3$  and  $M_5$  muscarinic acetylcholine receptor (mAChR) subtypes, at RNA and protein level, were detected in the seminal vesicle from 120-days old rats. The aim of the present study was to further explore the effects of testosterone on mAChR subtypes expression in this tissue.

**Métodos e Resultados:**

Ribonuclease protection assays, using specific probes for m1-m5 mAChR transcripts, were carried out with seminal vesicle total RNA from 30, 90 and 120-day old rats. Tissues from 75-day old rats, submitted to castration and sacrificed 15 days after surgery, and from 68-day old rats castrated for 15 days and treated for further 7 days with testosterone propionate (0.5 mg/100 g body weight, s.c.,

daily) were also used. The presence of m2, m3 and m5 protected fragments was observed when labeled RNA probes were hybridized with total RNA from seminal vesicle of the different experimental groups. The presence of m1 transcript was only observed in seminal vesicle from 30-day old rats and from rats castrated for 15 days. No expression of m4 transcript was detected in rat seminal vesicle.

**Conclusões:**

These data suggest that testosterone down-regulated the level of m1 transcript in the rat seminal vesicle. Further studies will be necessary to evaluate the androgen dependence of m2, m3 and m5 transcript expression.

20.020

IMMUNOLocalIZATION OF ALPHA 1A ADRENOCEPTOR IN RHESUS MONKEY MALE REPRODUCTIVE TRACT Patrão, M. T. C. D. C. ; Queiróz, D. B. C. ; Lázari, M. F. M. ; Avellar, M. C. W. ; Farmacologia - Endocrino Exp., UNIFESP

**Objetivo:**

Different alpha 1A-adrenoceptor ( $\alpha_{1A}$ -ADR) variants, originated by splicing mechanisms, have been identified in different tissues from human. Although many of them codify non-functional truncated products ( $\alpha_{1a-2b}$ ,  $\alpha_{1a-2c}$ ,  $\alpha_{1a-3b}$ ,  $\alpha_{1a-3c}$ ,  $\alpha_{1a-5}$  and  $\alpha_{1a-6}$ ), four variants ( $\alpha_{1a-1}$ ,  $\alpha_{1a-2a}$ ,  $\alpha_{1a-3a}$  and  $\alpha_{1a-4}$ ) are functional, differing from the original  $\alpha_{1A}$ -ADR ( $\alpha_{1A-1}$ ) in length and sequence of the carboxy-terminal region. In our laboratory, different  $\alpha_{1A}$ -ADR splice variants have been cloned in rhesus monkey (*Macaca mulatta*) male reproductive tract, confirming that alternative splicing of this gene in primates are not exclusively detected in humans. In both species, variant  $\alpha_{1a-1}$  was the most abundant transcript in all tissues analyzed. Our aim in this study is to confirm the cellular localization of  $\alpha_{1A-1}$ -ADR in tissues from rhesus monkey male reproductive tract.

**Métodos e Resultados:**

Paraffin sections (6  $\mu$ m) of efferent ductules, caput and cauda epididymis and seminal vesicles from adult rhesus monkeys (12-year old) were used in immunohistochemical studies performed with an antibody against  $\alpha_{1A-1}$ -ADR (ADR-A). In all tissues a specific immunostaining was observed in smooth muscle cells, confirming the involvement of these ADR in contractile response. Specific intracellular immunostaining was also observed in epithelial cells of all tissues analyzed. In efferent ductules,  $\alpha_{1A-1}$ -ADR was localized in the apical region, while in the caput and cauda epididymis and in seminal vesicle, the presence of this receptor was homogenously distributed throughout the cytoplasm of epithelial cells. All immunostainings were significantly decreased when experiments were performed with primary antibody preadsorbed with blocking peptide.

**Conclusões:**

The results confirm the expression of  $\alpha_{1A-1}$ -ADR, at protein level, in different tissues of the rhesus male reproductive tract.

20.021

ASPIRIN-TRIGGERED LIPOXIN A<sub>4</sub> INDUCES IL4 GENE EXPRESSION ON ENDOTHELIA<sup>1</sup> Machado, A.S.C ;<sup>2</sup> Villela, C.G. ;<sup>3</sup> Fierro, I. M. ; Farmacologia e Psicobiologia, UERJ

**Objetivo:**

Angiogenesis plays an essential role during embryogenesis, adult vascular remodeling and in several pathological disorders. A switch of angiogenic phenotype in a tissue requires a local change in the balance between endogenous angiogenic factors and angiogenic inhibitors. Many factors can impact on this balance including members of the family of chemotactic cytokines. Furthermore, immuno-cytokines, such as interleukin-4 (IL-4), have been shown to possess anti-angiogenic properties. Lipoxins (LX) are arachidonic acid metabolites generated by the sequential action of 5 and 12 or 15 and 5 lipoxygenases that inhibit angiogenesis in vitro and in vivo. Here, we study the profile of IL-4 gene expression in endothelial cells treated with an aspirin-triggered LX synthetic analog.

**Métodos e Resultados:**

Sub-confluent human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) in serum-free M199 medium were treated with vehicle (0.01% ethanol) or 15-epi-16-p-fluoro-phenoxy-LXA<sub>4</sub> (ATL-1). Specific primers were synthesized and used for IL-4 gene amplification. Total RNA was isolated and used to cDNA

construction and amplification. The products amplified by RT-PCR were analyzed on agarose gel stained by ethidium bromide, quantified by densitometry using Scion Image software and the ratio *IL-4/GAPDH* was expressed in arbitrary units. Treatment of the cells with ATL-1 (100 nM) for 1h induced *IL-4* gene expression ( $0.105 \pm 0.02$  versus  $0.069 \pm 0.002$  in control cells).

**Conclusões:**

The results suggest that induction of *IL-4* gene expression may contribute to the anti-angiogenic effects of lipoxins, in a variety of pathological conditions.

20.022

PARTICIPAÇÃO DO CÁLCIO MITOCONDRIAL NA CONTRAÇÃO DE MÚSCULOS LISOS Correa, R.M. \*\*; Lafayette, S. S. L. ; Smali, S. S. ; Garcez-do-Carmo, L. ; Farmacologia, UNIFESP

**Objetivo:**

O  $Ca^{2+}$  é um importante íon modulador e essencial no processo de contração muscular. Evidências recentes mostram que a mitocôndria atua regulando a homeostase deste, captando-o ou liberando-o durante a sinalização celular. Isso auxilia na sincronização das ondas de  $Ca^{2+}$ , cujo padrão é imprescindível para a contração.

Assim, o objetivo deste trabalho é investigar o papel da mitocôndria na homeostase de  $Ca^{2+}$  e sua influência na contração de músculos lisos.

**Métodos e Resultados:**

Preparações de *fundus* gástrico de rato foram adaptadas para registro de contração isotônica. Para medidas de  $Ca^{2+}$  e morfologia celular, células do *fundus*, foram cultivadas e preparadas para ensaios de fluorescência. Para análise do  $Ca^{2+}$  as células foram encubadas com FURA-2 e analisadas por microscopia de alta resolução. Para localização da mitocôndria e do retículo endoplasmático (RE), as células foram encubadas com Mito-Tracker Red e ER-Tracker e analisadas em microscópio confocal. Tanto nos estudos de contração como nos celulares, foi testada a ação dos inibidores mitocondriais FCCP e antimicina A, além do agonista colinérgico carbacol (CCh).

Na presença de FCCP (50uM) e Antimicina A (40ug/ml), a contração promovida pelo CCh  $10^{-5}M$  foi bastante afetada (inibição de  $69,20 \pm 2,01\%$  e  $96,75 \pm 1,24\%$ , respectivamente). A análise dos transientes de  $Ca^{2+}$  intracelular mostrou que tanto o CCh (1uM), como o FCCP (0,1uM) e a Antimicina A (4ug/ml), induziram *per se* elevação dos níveis basais de  $Ca^{2+}$  citosólico em relação ao total de  $Ca^{2+}$  do sistema ( $15,66 \pm 2,41\%$ ;  $5,22 \pm 0,89\%$  e  $29,27 \pm 1,72\%$ , respectivamente). Na presença de FCCP, o transiente promovido pelo CCh foi seriamente inibido (63,60%). A Antimicina A não afetou a resposta do CCh, mas modificou seu perfil, tornando-o sustentado e não mais transiente. Os estudos de confocal mostraram que o RE é denso e distribuído por toda a célula, formando uma rede próxima às mitocôndrias. Estas são alongadas e estão agrupadas principalmente na região perinuclear.

**Conclusões:**

Sugerimos que no músculo liso a integridade da mitocôndria é importante para a homeostase de  $Ca^{2+}$  e para a contração, uma vez que a inibição causada pelo FCCP e pela Antimicina A afetou o processo contrátil e a cinética do  $Ca^{2+}$ .

20.023

DETERMINATION OF THE ACTIVITY OF ACE IN TRANSFECTED CELLS WITH B1 AND B2 RECEPTORS. Sabatini, R. A. ; Bersanetti, P.A. \*\*; Leite, S.F. \*\*; Carmona, A. K. ; Paiva, A. C M.; Pesquero, J.B.; Biofísica, UNIFESP

**Objetivo:**

Angiotensin I-converting enzyme (ACE) is a dipeptidyl carboxypeptidase which cleaves the C-terminus from angiotensin I as well as from bradykinin, thus generating the potent vasoconstrictor angiotensin II and degrading the vasodepressor bradykinin. ACE is considered to play a role in blood pressure regulation. The main aim of this study was to verify the activity of ACE in a biologically active state.

**Métodos e Resultados:**

We have explored this possibility in transfected Chinese hamster ovary cells (CHO) which stably express the full-length somatic form of this enzyme (WT-ACE) and compare the activity in these cells with the ACE activity of cells co-transfected with rat B1 or B2 kinin receptor cDNAs using the

internally quenched fluorogenic peptide AbzYRK(Dnp)P. Following transfection, cells were selected in Ham's F-12 medium containing 0.5 mg/mL hygromycin B and resistant clones were propagated. The functionality of both receptors were analyzed by the microphysiometer Cytosensor and the expression of the enzyme and the receptors was performed by RT-PCR. Cells expressing wild-type ACE and those expressing both B1 or B2 receptors and ACE were plated in 12-well plates at 0.5 x 10<sup>5</sup> cells per well so that they are 90% confluent on day of experiment. These cells were washed with HBSS buffer pH 7.4 containing 10 uM ZnCl<sub>2</sub> and incubated with the substrate. 1 mL aliquot were collected in different times and the fluorescence were determined. These activities were inhibited by 2 uM of specific inhibitor lisinopril. The Km value (5 uM) for the hydrolysis of this substrate by the ACE present in the cell membrane was similar to the kinetic parameter determined for other systems. ACE activity and mRNA levels were altered in the co-transfected cells with receptors in comparison with the wild-type. Surprisingly, ACE activity was inhibited by the B1 receptor antagonist desArg<sup>9</sup>-BK in the B1 co-transfected cells.

**Conclusões:**

These findings suggest the interaction between ACE and kinin receptors and that the regulation of the expression of enzyme occurred at the transcriptional level.

20.024

INVESTIGAÇÃO DOS MECANISMOS CELULARES RESPONSÁVEIS PELO AUMENTO DA REATIVIDADE VASCULAR A VASOCONSTRICTORES NA ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA. Gontijo, L.S ; Silva, C.L.M. ; Noël, F.; Farmacologia Básica e Clínica ICB-UFRJ

**Objetivo:** A esquistossomose mansônica é uma doença parasitária intravascular causada pelo *S.mansoni*. O objetivo deste projeto foi investigar se a infecção com vermes adultos machos poderia alterar os mecanismos de contração e relaxamento vascular fora do leito mesentérico.

**Métodos e Resultados:** Curvas cumulativas de noradrenalina (NOR) ( $10^{-9}$ - $3 \times 10^{-5}$  M) foram feitas em anéis de aorta de camundongos controles e infectados com *S. mansoni* antes e após incubação com nifedipina 10 nM ou glibenclamida 10 uM. Em outro protocolo, os anéis foram pré-contraídos com NOR  $10^{-6}$  M e no platô, foi adicionado cumulativamente acetilcolina e nitroprussiato de sódio. Verificou-se um maior valor de E<sub>max</sub> da NOR no grupo infectado ( $9,64 \pm 0,58$  mN; n=10) em relação ao controle ( $6,24 \pm 0,48$  mN; n=10;  $p < 0,05$ ). O antagonista de canal de Ca<sup>2+</sup> tipo L (nifedipina) reduziu cerca de 77% o valor de E<sub>max</sub> da NOR no grupo infectado, e apenas 30% no grupo controle. O bloqueio dos canais de K<sub>ATP</sub> com glibenclamida aumentou a eficácia da NOR apenas na aorta de animais controles (de  $6,03 \pm 0,21$  mN para  $7,68 \pm 0,28$  mN; n=7;  $p < 0,05$ ). O relaxamento endotélio-dependente mediado por acetilcolina foi maior no grupo controle ( $64,5 \pm 0,48\%$ ; n=10) em relação ao infectado ( $47 \pm 1,71\%$ ; n=10;  $p < 0,05$ ). Por outro lado, o relaxamento máximo endotélio-independente em resposta ao nitroprussiato de sódio não foi modificado pela patologia (100% controle e infectado).

**Conclusões:**

Os dados sugerem que a presença do *S.mansoni* induz alterações vasculares fora do leito mesentérico, caracterizadas por uma menor influência dos canais K<sub>ATP</sub> na regulação do tônus vascular acompanhada pela maior contribuição do canal de Ca<sup>2+</sup> tipo L no influxo de Ca<sup>2+</sup> com aumento da resposta contrátil ao vasoconstrictor NOR. A via de relaxamento dependente de GMPc está preservada.

20.025

CARACTERIZAÇÃO FARMACOLÓGICA DE NOVO DERIVADO CUMESTANO COM PROPRIEDADE VASODILATADORA <sup>1</sup>Zófoli, S. \*; <sup>1</sup>Noël, F. ; <sup>2</sup>Silva, A. J. M.; <sup>2</sup>Costa, P. R. R. ; <sup>1</sup>Silva, C.L.M. ; <sup>1</sup>Farmacologia Básica e Clínica ICB-UFRJ; <sup>2</sup>Produtos Naturais, UFRJ

**Objetivo:**

Como mostramos anteriormente que o cumestano LQBal93, derivado da wedelolactona, inibe a isoforma cardíaca da enzima Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup> ATPase, decidimos investigar um possível efeito sobre o tônus da musculatura lisa vascular.

**Métodos e Resultados:**

Utilizamos o modelo de aorta de rato, como descrito anteriormente (Silva et al, 2002, Br. J. Pharmacol. 135: 293-298). Os segmentos com endotélio foram colocados em cubas contendo solução fisiológica, e submetidos a uma pré-carga de 20 mN por 60 min. Após contração induzida

por noradrenalina 1  $\mu\text{M}$  foram realizadas curvas cumulativas com o LQBa93 (1 – 300  $\mu\text{M}$ ). Para investigar o mecanismo de ação do LQBa93 avaliamos o efeito de LQBa93 (30  $\mu\text{M}$ ) antes e após tratamento com as seguintes ferramentas farmacológicas: propranolol 1  $\mu\text{M}$  (antagonista  $\beta$ -adrenérgico), L-NAME 100  $\mu\text{M}$  (inibidor da enzima óxido nítrico sintase), flumazenil 1  $\mu\text{M}$  (antagonista benzodiazepínico) ou ODQ 1  $\mu\text{M}$  (inibidor da enzima guanilato ciclase). Em ensaios de *binding* utilizamos a [ $^3\text{H}$ ]-prazosina como marcador dos receptores  $\alpha_1$  adrenérgicos expressos em fígado de rato. A adição cumulativa do LQBa93 relaxou a aorta de forma concentração-dependente, apresentando  $\text{CE}_{50}$  de 12  $\mu\text{M}$  [intervalo de confiança 6 -19  $\mu\text{M}$ ,  $n = 6$ ]. Ao investigarmos o mecanismo de ação, verificamos que o relaxamento observado com LQBa93 (30  $\mu\text{M}$ ) nos segmentos pré-incubados com propranolol, foi significativamente inferior à condição controle ( $29,73 \pm 4.18\%$  e  $53,46 \pm 4.03\%$ , respectivamente;  $p = 0.006$ ) ( $n = 4$ ), sendo esse um indicativo de relaxamento via receptores  $\beta_2$ -adrenérgicos. Nas demais condições farmacológicas não foi observada diferença significativa. O LQBa93 também não inibiu a ligação da [ $^3\text{H}$ ]-prazosina ao receptor  $\alpha_1$  adrenérgico.

#### **Conclusões:**

Nossos dados sugerem que o LQBa93 promove relaxamento vascular, pelo menos parcialmente, através da ativação de receptores  $\beta$ -adrenérgicos.

20.026

LIPOXIN  $\text{A}_4$  RECEPTOR MEDIATES ANTI-ANGIOGENIC EFFECTS OF A STABLE 15-EPI-LXA $_4$  ANALOG; Cezar-de-Mello, P F T; Nascimento-da-Silva, V ;Fierro , I. M.; Farmacologia e Psicobiologia, UERJ

#### **Objetivo:**

Lipoxins (LX) are arachidonic acid metabolites generated by action of lipoxygenases during cell-cell interactions. We have previously shown that a LX stable analog, 15-epi-16(*para*-fluoro) phenoxy-lipoxin  $\text{A}_4$  (ATL-1) inhibits endothelial cell (EC) actin cytoskeleton reorganization and focal adhesion kinase (FAK) phosphorylation. Furthermore ATL-1 also inhibits EC proliferation both *in vitro* and *in vivo*. These results show an important role of these lipids in the growing of new vessels from pre-existing ones, a process knowed as angiogenesis. In the present work we sought to investigate if the analog effects depend on its interaction with the LX receptor (ALXR), a G protein-coupled receptor (GPCR).

#### **Métodos e Resultados:**

Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) were pre-treated with Boc-2 (1 $\mu\text{M}$ ), an ALXR antagonist, or pertussis toxin (PTX) (1 $\mu\text{g/ml}$ ) for 10 and 15 minutes, respectively, prior to the treatment with ATL-1 (100nM) for 30 minutes and further stimulation with vascular endothelial growth factor (VEGF) (3ng/ml) for 15 minutes. F-actin content was detected using rhodamin-conjugated phalloidin. The FAK association to F-actin was assessed by western blot. Cell proliferation was assessed using MTT assay after 48h treatment. Our results show that ATL-1 inhibition of VEGF-induced actin mobilization was sensitive to both PTX and Boc-2 treatment. Also, FAK association to F-actin was inhibited by ATL-1 and this effect was reverted by the prior treatment of the cells with Boc-2.

**Conclusões:** These preliminary results show that ATL-1 exerts its effects through interaction with a Gi-protein coupled receptor, probably ALXR.

20.027

INTERAÇÃO DO FENTÔNIO [N-(4-FENIL) FENACIL L-HIOSCIAMINA] COM RECEPTORES NICOTÍNICOS NEURONAIS (NACHR). <sup>1</sup> Munhoz, E. ; <sup>2</sup> Ghedini , P. C. \*\*; <sup>2</sup> R.M., F. \*\*; <sup>2</sup> Caricati-Neto, A. ; <sup>3</sup> Lima, T. C. M. d. ; <sup>2</sup> Souccar , C. ; <sup>2</sup> Lapa , A. J. ; <sup>2</sup> Lima-Landman, M. T. R. ; <sup>1</sup> Farmacologia e Toxicologia - Setor Produtos Naturais, UNIFESP; <sup>2</sup> Farmacologia, UNIFESP; <sup>3</sup> Farmacologia, UFSC

#### **Objetivo:**

Dados anteriores demonstraram que o fentônio (Fent 100 $\mu\text{M}$ ) bloqueia receptores nicotínicos musculares (*Br.J.Pharmacol.* 124: 1270, 1998), não inibe a acetilcolinesterase (SBFTE, Res. 01.036, 2004), mas duplica a liberação de ACh do neurônio motor (*Gen.Pharmacol.* 25:1397, 1994). Este trabalho comparou a interação do Fent com os receptores nicotínicos neuronais (NACHR) de cérebro e de adrenal de rato.

**Métodos e Resultados:** A interação do FENT com NACHR subtipo  $\alpha 3\beta 4$  ganglionar foi avaliada na liberação de catecolaminas induzida por DMPP (0.1 – 10 $\mu$ M) em glândulas adrenais isoladas de rato. A interação do Fent com os NACHR subtipos  $\alpha 7$  e  $\alpha 4\beta 2$  de membranas de cérebro de rato foi analisada em curvas de competição com a [<sup>125</sup>I]-BUTX (2 nM, 60 min, 25°C) ou com a [<sup>3</sup>H]-citisina (1nM, 75min, 4°C), respectivamente. A liberação de catecolaminas medida por amperometria foi proporcional à concentração de DMPP com máximo de 546,7 $\pm$ 52,1 nA (n=3). Hexametônio 0,1  $\mu$ M, reduziu de 50% a liberação induzida por DMPP 10  $\mu$ M (n=3). O Fent (100  $\mu$ M) aumentou a liberação de catecolaminas a 286,7 $\pm$ 83,5 nA, n=3 e reduziu a 50% o efeito do DMPP 10  $\mu$ M. Concentrações menores de Fent foram ineficazes. Em membranas de cérebro de rato, o Fent (10  $\eta$ M a 0,1 mM) reduziu a ligação específica da [<sup>125</sup>I]-BUTX aos receptores  $\alpha 7$  com  $Cl_{50}$ =5,8  $\mu$ M (LC:3,9–8,8  $\mu$ M, n=3), 1000 vezes menor que a da toxina fria. A ligação da [<sup>3</sup>H]-citisina aos receptores  $\alpha 4\beta 2$  foi reduzida na presença do Fent com  $Cl_{50}$ =14,8  $\mu$ M (LC: 7,6-28,9  $\mu$ M, n=3).

**Conclusões:**

O Fent interage com os NACHR musculares e neuronais  $\alpha 7$  e  $\alpha 4\beta 2$  com afinidade baixa e comparável. Os dados também sugerem que o Fent bloqueia a ação do DMPP em  $\alpha 3\beta 4$ . Portanto, a liberação de aminas adrenais pelo Fent não parece estar relacionada à interação com estes receptores ganglionares.

20.028

EFEITO DO TREINAMENTO À RESTRIÇÃO ALIMENTAR (“MEAL-FEEDING”) NA TRANSDUÇÃO DO SINAL INSULÍNICO E EXPRESSÃO DA PROTEÍNA TRANSPORTADORA DE GLICOSE GLUT4 <sup>1</sup> Puerro Neto, A. <sup>1</sup>; <sup>1</sup> Brogin, F.F. <sup>2</sup>; <sup>2</sup> Okamoto, M. M. <sup>2</sup>; <sup>2</sup> Carvalho, C.R.O. <sup>2</sup>; <sup>2</sup> Machado, U. F. <sup>1</sup>; <sup>1</sup> Sumida, D. H. <sup>1</sup> Ciências Básicas, UNESP - Araçatuba; <sup>2</sup> Biofísica e Fisiologia - ICB1, USP

**Objetivo:**

A ligação da insulina ao seu receptor (IR) induz à fosforilação dos IRSs, que podem se associar e ativar a PI 3-K, vias essenciais para o transporte de glicose. Estudos anteriores demonstraram aumentos no conteúdo do GLUT4 e no grau de fosforilação do IR e IRS-1 em tecido adiposo branco (TAB) de ratos submetidos ao treinamento à restrição alimentar (“meal-feeding”-MF-refeição diária das 8:00 às 10:00 AM durante 4 semanas) quando comparados com ratos ad libitum (AL). Por outro lado, estudos em ratos Wistar obesos revelaram que a restrição calórica sem MF melhorou a sensibilidade insulínica, sem alterar a expressão do gene do GLUT4. O objetivo do presente estudo é averiguar se o aumento na expressão do GLUT4 e as alterações nas vias da insulina em animais MF são consequências do processo adaptativo imposto pelo treinamento alimentar ou são decorrentes da redução do peso corpóreo.

**Métodos e Resultados:**

As análises pela técnica de “Western Blotting” de GLUT4 e grau de fosforilação de IR e IRS-1 foram realizadas no TAB dos grupos AL, MF e “*calorie restriction*” (CR- no qual a oferta de ração foi realizada em horários aleatórios, em quantidade regulada para manter o mesmo peso corporal do grupo MF). Observaram-se aumentos ( $p < 0,05$ ) no conteúdo de GLUT4 (na membrana plasmática – PM e no microsoma-M) e no grau de fosforilação do IR e IRS-1 em ratos MF quando comparados com ratos AL e CR. Entretanto, não houve diferença entre os grupos AL e CR (**AL**: PM=100 $\pm$ 12; M=216 $\pm$ 16; IR=100 $\pm$ 12; IRS-1=100 $\pm$ 6 vs **MF**: PM=193 $\pm$ 13; M=448 $\pm$ 70; IR=145 $\pm$ 11; IRS-1=131 $\pm$ 7 vs **CR**: PM=145 $\pm$ 12; M=350 $\pm$ 45; IR=105 $\pm$ 5; IRS-1=106 $\pm$ 4 unidades arbitrárias/ $\mu$ g de proteína, n=7).

**Conclusões:**

O esquema de treinamento à restrição alimentar desempenha um papel importante na expressão gênica do GLUT4 e na ativação das vias da insulina.

20.029

DESENVOLVIMENTO DE PLATAFORMA PARA ANÁLISE MOLECULAR DE NOVOS FARMACOS Cunha, F. M.; Ferro, E. S.; Biologia Celular e do Desenvolvimento, USP

**Objetivo:**

Os avanços na biologia molecular e genômica aceleraram a identificação de potenciais alvos para intervenção terapêutica, como por exemplo os receptores acoplados a proteína G (GPCR), estimulando novas estratégias para a análise da atividade biológica de fármacos. A ativação de GPCR altera cascatas de sinalização intracelular, levando à modulação da taxa transcricional de

genes específicos. Desta forma, ensaios de atividade farmacológica baseados em genes repórteres podem ser úteis no monitoramento das respostas induzidas via GPCR.

**Métodos e Resultados:** Baseando-se em trabalho anterior (Anal. Biochem. 275: 54, 1999), a região correspondente ao elemento responsivo ao AMP cíclico (CRE) contido na região promotora do gene do peptídeo vasoativo intestinal foi amplificado a partir do DNA genômico humano. A seguir, esta porção de DNA foi clonada no vetor pGL3 (Promega), previamente digerido com as enzimas de restrição XhoI e HindIII. A seguir, três cópias do elemento de múltipla resposta (MRE), obtidas comercialmente, foram igualmente inseridas no vetor com o CRE, entre os sítios das enzimas MluI e XhoI. Para uma análise mais fina das vias de transdução, foram construídos um vetor contendo somente o CRE e outro contendo apenas os MREs. O controle das clonagens se fez através de gel de agarose corado com brometo de etídio e reações de seqüenciamento automático de DNA. Confirmadas as seqüências de cada vetor, procedeu-se à preparação destes em larga escala, assim como dos vetores controle negativo (pGL3 vazio) e positivo (pGL3-CMV), para transfecção em células HEK293.

**Conclusões:**

Os vetores plasmidiais contendo o gene da luciferase necessários para a criação de uma plataforma de análise molecular de fármacos foram construídos e amplificados. A transfecção de células HEK293 e a análise de ativação celular por compostos conhecidos ou novos peptídeos identificados em nosso laboratório estão em andamento.

20.030

VIRUS STABILITY AND PROTEIN-NUCLEIC ACID INTERACTIONS AS STUDIED BY HIGH-PRESSURE EFFECTS ON NODAVIRUSES <sup>1</sup> Schwarcz, W. D. ; <sup>2</sup> Barroso, S. ; <sup>1</sup> Gomes, A. M. O. ; <sup>3</sup> Schneemann, A. ; <sup>1</sup> Oliveira, A. C. ; <sup>1</sup> Silva, J. L.; <sup>1</sup> Bioquímica Médica - CCS, UFRJ; <sup>2</sup> Bioquímica - CCS, UFRJ; <sup>3</sup> Department of Molecular Biology, The Scripps Research Institute

**Objetivo:**

The Flock House Virus (FHV) is an RNA insect virus, nonenveloped, member of the family *Nodaviridae*. Its icosahedral capsid is composed by 180 copies of an identical protein (alpha protein) which matures to an infectious virion by cleavage of alpha protein into beta and gamma subunits. In order to evaluate the stability, dynamics and protein-nucleic acid interactions on FHV we used high pressure, temperature and chemical denaturing agents to promote perturbation of the viral capsid.

**Métodos e Resultados:**

The virus stability was monitored by spectroscopy measurements (fluorescence, light scattering and CD) and HPLC. The data showed that FHV was stable to pressures up to 3.0kbar at room temperature. The fluorescence emission and light scattering values showed small changes that were reversible after decompression. When we combined pressure and sub denaturing urea concentrations, the changes were more drastic, suggesting dissociation of the capsid. However these changes were also reversible after pressure release. The complete dissociation of FHV could be observed only under high urea concentrations. FHV was also stable when we used temperature treatments (high and low).

**Conclusões:**

We compared the effects of urea and pressure on FHV authentic and VLPs (virus-like particles). The VLPs and authentic particles are distinguishable by protein-RNA interactions, (VLPs pack cellular RNA and native particles contain viral RNA) Our results demonstrated that native particles were more stable than VLPs to physical and chemical treatments. We attempt to understand these changes in stability and dynamics caused by protein-RNA interactions, then we performed experiments in the presence of RNase. Our data point to the specificity of the interaction between the capsid protein and the viral RNA. This specificity is crucial to the stability of the particle, which makes this interaction an excellent target for drug development.

20.031

EFFECTS OF ATP IN CYTOSOLIC CALCIUM CONCENTRATION IN CULTURE HUMAN PANCREATIC CELLS BY HIGH RESOLUTION MICROSCOPY. <sup>1</sup> Chinen, E. ; <sup>1</sup> Servilieri, K.M. \*\*; <sup>1</sup> Cardoso, D.E. \*\*; <sup>1</sup> Silva, M.S.S. ; <sup>1</sup> Moraes, A.A.F.S. \*\*; <sup>2</sup> Sogayar, MC ; <sup>1</sup> Oshiro, M.E.M. ; <sup>1</sup> Ferreira, A.T. ; <sup>1</sup> França, J.P. ; <sup>1</sup> França, L.P. ; <sup>1</sup> Biofísica, UNIFESP; <sup>2</sup> Química, USP



**Objetivo:**

To study the effects of ATP in response cytosolic calcium concentration in culture human pancreatic beta cell by fluorescence microscopy high resolution.

**Métodos e Resultados:** Cultured cells were incubated at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> and 95% O<sub>2</sub>. These cells were cultured in CMRL culture medium with 5,5mM of glucose, supplemented with 10% fetal bovine serum with stimulation 20mM glucose and 100µM of ACh for 2 min. It was done each 48 hours in the substitution culture medium. The cells cultured on coverslips as described by Eur. J. Pharmacol. 439:13-9, 2002. Intracellular Ca<sup>2+</sup> measurements were made using confluent human pancreatic cells loaded with the Ca<sup>2+</sup> fluorophore fura-2 for high resolution fluorescence microscopy. The fluorescence ratio was determined at 3s intervals. At the end of each experiment, the maximum and minimum ratios for calcium-bound and free fura-2 were obtained by adding 50 µM digitonin and 2 mM MnCl<sub>2</sub> at final concentrations and calculated as been described by J. Biol. Chem. 260:3440-50, 1985. Analyzed the response of the 0.5-500 µM ATP in culture human pancreatic cell intracellular Ca<sup>2+</sup> measurements by fluorescence microscopy. The actions of ATP showed that a P2-type of purinergic receptor operates in these cells. The increase Ca<sup>2+</sup> concentration was transient in these cells after stimulation with ATP. We observed the maximal change in the cytosolic Ca<sup>2+</sup> in these cells was 154 ± 10% relative to the basal Ca<sup>2+</sup> level.

**Conclusões:**

ATP induced increase in the cytosol concentration calcium on pancreatic cells by induced IP<sub>3</sub> production and Ca<sup>2+</sup> influx. This effect is possibility involved in homeostasis of Ca<sup>2+</sup> in secretory cells.

20.032

RELAXANT EFFECTS OF PHOSPHODIESTERASE 5 INHIBITORS IN THE RAT ANOCOCCYGEUS MUSCLE. <sup>1</sup> Flores, H. A. ; <sup>1</sup> Priviero, F. B. M. ; <sup>2</sup> Webb, R. C. ; <sup>1</sup> Teixeira, C. E. ; <sup>1</sup> Farmacologia, UNICAMP; <sup>2</sup> Farmacologia, UFMG

**Objetivo:** Stimulation of nitrgergic nerves in the anococcygeus muscle (AcM) leads to nitric oxide (NO) release and subsequent activation of the soluble guanylyl cyclase (sGC), causing cGMP levels to increase and the smooth muscle to relax. Since phosphodiesterase 5 (PDE5) inhibitors enhance and prolong the cellular effects of cGMP, this work aimed to characterize and compare the effects of 3 PDE5 inhibitors, sildenafil (SILD), tadalafil (TADA) and vardenafil (VARD) in the AcM.

**Métodos e Resultados:** Strips of AcM were mounted in 4-ml organ baths containing Krebs solution and changes in isometric force were recorded in a Powerlab system. Tissues were precontracted with carbachol (10 µM) and concentration-response curves (CRC) for SILD, TADA and VARD (1 nM-10 µM) were constructed in the absence or in the presence of the NO synthesis inhibitor L-NAME (100 µM) or the sGC inhibitor ODQ (10 µM). SILD, TADA and VARD caused concentration-dependent relaxations with similar maximal responses (84 ± 5%, 84 ± 4% and 96 ± 3%, respectively) and pEC<sub>50</sub> values (8.05 ± 0.04, 7.79 ± 0.06 and 8.06 ± 0.07, respectively). Addition of L-NAME caused rightward shifts in the CRC for SILD, TADA and VARD (pEC<sub>50</sub>: 7.80 ± 0.04, 6.86 ± 0.05 and 7.82 ± 0.07, respectively). Similar results were obtained with ODQ (pEC<sub>50</sub>: 7.59 ± 0.04, 7.24 ± 0.17 and 7.12 ± 0.10, respectively for SILD, TADA and VARD). Although SILD, TADA and VARD showed similar potencies and maximal responses, inhibition of NO synthesis caused a 2-fold rightward shift in the curves to SILD and VARD, whereas the relaxant responses evoked by TADA were approximately 9-fold shifted to the right.

**Conclusões:** The findings that inhibition of the NO/cGMP signaling pathway markedly affected TADA-induced relaxations, but not those in response to SILD and VARD, suggest that the later inhibitors partially relax the AcM through NO-independent mechanisms.

20.033

NITRIC OXIDE INHIBITS CULTURED RAT UTERINE SMOOTH MUSCLE CELL PROLIFERATION THROUGH ADENYLATE CYCLASE ACTIVATION <sup>1</sup> Costa, R. S. A. ; <sup>2</sup> Villela, C.G. ; <sup>2</sup> Barja-Fidalgo, C. ; <sup>1</sup> Assrey Filho, J. ; <sup>1</sup> Farmacologia, UFSC; <sup>2</sup> Farmacologia, UERJ

**Objetivo:**

Myometrial cell proliferation is an important event in physiology and pathology. Since we and others have previously showed that nitric oxide (NO) inhibited vascular smooth muscle cell (VSMC)

proliferation, in this report we studied the effects of NO on the proliferation of uterine smooth muscle cell (USMC).

**Métodos e Resultados:**

Myometrial cells were isolated from female Wistar rat (20-day old) uterus. A total of  $5 \times 10^3$  viable cells/well were seeded in 96-well plates and test compounds were added after 24 h. Cell proliferation and viability were evaluated 5 days after seeding and the results were expressed as cell number/mm<sup>3</sup>. PCR analysis was performed to assess the soluble guanylate cyclase alpha-1 subunit mRNA abundance in USMC, compared to VMSC and a cell line A7r5 as control cells. NO donor SNAP (S-nitroso-acetyl-DL-penicillamine; 10-100  $\mu$ M) inhibited cell proliferation concentration-dependent manner ( $IC_{50}$  ~90  $\mu$ M), without cell death. SQ22536 (a selective adenylate cyclase inhibitor; 50  $\mu$ M) and KT-5720 (a selective cAMP-dependent protein kinase inhibitor; 0.1  $\mu$ M) prevented NO-induced inhibition of cell proliferation (control  $76 \pm 1.5$ ; SNAP  $36 \pm 1$ ; SNAP + SQ22536  $75 \pm 0.5$ ; SNAP + KT5720  $77 \pm 1 \times 10^3$  viable cells/well). Dibutiryl-cAMP (a membrane permeant analogue of cAMP; 10-100  $\mu$ M) was 20-fold more potent as an anti-proliferative agent ( $IC_{50}$  ~ 50  $\mu$ M) than 8-Br-cGMP (100-1000  $\mu$ M;  $IC_{50}$  >1 mM) and its effect was prevented by 1  $\mu$ M KT-5720 (control  $71 \pm 2$ ; Db-cAMP  $38 \pm 1$ ; Db-cAMP + KT5720  $64 \pm 5.5 \times 10^3$  viable cells/well). The abundance of USMC guanylate cyclase mRNA was identical to that of primary rat VSMC or rat aorta A7r5 cell line.

**Conclusões:**

Contrary to the paradigm NO/cGMP, NO inhibits USMC proliferation by a cAMP-dependent, but cGMP-independent pathway. The elucidation of molecular mechanisms responsible for the cGMP-independent NO effects these type of smooth muscle may offer new insights in the physiology of cell proliferation as well as new potential therapeutic use of NO donors.

20.034

CHARACTERIZATION OF [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S BINDING TO RAT SKELETAL MUSCLE MEMBRANES: A FUNCTIONAL APPROACH TO ASSESS THE COUPLING OF MEMBRANE RECEPTORS TO G-PROTEINS. Andrade Lopes, A. L.; Chiavegatti, T. \*; Godinho, R. O. ; Farmacologia, UNIFESP

**Objetivo:**

Many physiological processes in skeletal muscle are mediated by activation of membrane receptors coupled to heterotrimeric G-proteins. Activation of these receptors by agonists induces the GDP/GTP exchange and subsequent dissociation of G $\alpha$  subunit from G $\beta\gamma$  dimer. The G-protein inactive state (heterotrimer) is recovered after hydrolysis of GTP to GDP by G $\alpha$  GTPase activity. To establish a functional assay to assess the coupling of skeletal muscle receptors to activated G-proteins we determined the optimal conditions for binding of the non-hydrolysable GTP analogue [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S to G-proteins in active and inactive conformational states.

**Métodos e Resultados:**

The influence of membrane concentration (5-250 $\mu$ g/ml), incubation time (15min-2h) and GDP concentration (0-200 $\mu$ M) on [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S (0.1nM) binding to rat diaphragm membranes (n=4) was determined in 50mM Tris buffer containing 0.2mM EGTA, 3mM MgCl<sub>2</sub>, 100mM NaCl (pH=7.4). Nonspecific [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S binding was obtained in the presence of 10 $\mu$ M GTP $\gamma$ S. The [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S specific binding increased linearly with membrane concentration ( $r^2=0.95$ ) in the presence of 50 $\mu$ M GDP, whereas it fitted to an hyperbolic curve ( $r^2=0.89$ ) in the absence of GDP. 50 to 100 $\mu$ M GDP improved the assay specificity reducing by 87% the [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S binding to G-proteins at inactive conformation (10.8 $\pm$ 1.0 fmols/mg). Incubation of membranes with the  $\beta$  adrenoceptor agonist isoproterenol (ISO; 10 $\mu$ M) increased by 6 fold the basal [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S binding in the presence of 100 $\mu$ M GDP (1.4 $\pm$ 0.3 fmols/mg). The maximum stimulated/basal ratio of [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S binding was obtained after 2h incubation of ISO.

**Conclusões:**

Our results showed that the [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S binding assay is a sensitive and valuable method to analyze the conformational changes in G-protein (active and inactive states) in rat skeletal muscle membranes mediated by receptor activation. The optimal conditions for the assays were: 250 $\mu$ g/mL of membrane, 2h incubation and 100 $\mu$ M GDP.

20.035

ATIVIDADE DO ALCALÓIDE L-BEBEERINA NA ACETILCOLINESTERASE E SUA INTERAÇÃO COM OS RECEPTORES NICOTÍNICOS NEURONAIS <sup>1</sup> Ghedini, P. C. ; <sup>1</sup> Munhoz, E. \*\*; <sup>1</sup> Lima-Landman, M. T. R. ; <sup>2</sup> Lima, T. C. D. ; <sup>1</sup> Lapa, A. J. ; <sup>1</sup> Souccar, C. ; <sup>1</sup> Farmacologia e Toxicologia - Setor Produtos Naturais, UNIFESP; <sup>2</sup> Farmacologia, UFSC

**Objetivo:**

O alcalóide terciário isolado das raízes de *Chondrodendron platyphyllum*, l-bebeerina (BB), bloqueou a transmissão neuromuscular do diafragma isolado de rato, inibiu a ligação da [<sup>125</sup>I]- $\alpha$ -bungarotoxina ([<sup>125</sup>I]-BUTX) e facilitou a abertura do receptor nicotínico/canal iônico em cultura de células musculares (*Souccar e col.*, *APPTLA* 49: 268, 1999). Este trabalho analisou a interação da BB com os receptores nicotínicos neuronais (NACHR) dos subtipos  $\alpha 7$  e  $\alpha 4\beta 2$  e com a acetilcolinesterase (AChE) cerebral.

**Métodos e Resultados:**

A interação da l-bebeerina (BB) com os NACHR  $\alpha 7$  e  $\alpha 4\beta 2$  foi analisada em curvas de competição com a [<sup>125</sup>I]-BUTX (2 nM, 60 min, 25°C) ou com a [<sup>3</sup>H]-citisina (1 nM, 75 min, 4°C), respectivamente, em membranas de cérebro de ratos. Na presença da BB (0,1  $\mu$ M a 1 mM), a ligação específica da [<sup>125</sup>I]-BUTX e da [<sup>3</sup>H]-citisina foi reduzida com CI<sub>50</sub> de 59,8  $\mu$ M (LC: 42,6- 84,1  $\mu$ M) e 70,8  $\mu$ M (45,2 – 111,0  $\mu$ M), respectivamente. Esses valores foram 10 e 12 vezes maiores que os determinados em receptores nicotínicos musculares. Comparativamente, os ligantes específicos dos receptores  $\alpha 7$  e  $\alpha 4\beta 2$ , BUTX e nicotina, reduziram a ligação da [<sup>125</sup>I]-BUTX e da [<sup>3</sup>H]-Citisina com CI<sub>50</sub> de 6,0 nM (3,4 – 10 nM) e 1,06 nM (0,77-1,40 nM), respectivamente. A BB (1 a 300  $\mu$ M) também inibiu a atividade AChE de homogenatos de estruturas cerebrais de ratos com CI<sub>50</sub> de 14,7  $\mu$ M (córtex); 23,2  $\mu$ M (hipocampo) e 26,2  $\mu$ M (estriado). Esses valores foram 6 a 8 mil vezes maiores do que os obtidos com a neostigmina nas mesmas estruturas.

**Conclusões:**

Os dados relativos à interação da BB com os receptores nicotínicos muscular e neuronais e à AChE indicam que o alcalóide parece interagir com dois sítios do receptor/canal iônico: um relacionado à modulação alostérica negativa e outro associado à ativação do canal iônico.

20.036

DEVELOPMENTAL PROFILE OF MELATONIN RECEPTORS IN CHICK RETINA Sampaio, L. F. S.; Fisiologia - CCB, UFPA

**Objetivo:**

Melatonin is the neurohormone produced in the pineal gland and in the photoreceptors in the retina. In the cultured retinal cells melatonin influence the development of the nicotinic acetylcholine receptors, however the neurodevelopmental profile of melatonin receptors in chick retina until the present work was unknown. In this work was investigated the developmental profile of the melatonin receptors in embryonic chick retina using the general effect of this hormone on adenylate cyclase enzyme.

**Métodos e Resultados:**

The retinas were assayed in the embryonic days 8, 12, 14, 16 and in post-hatching (E8, E12, E14, E16 and PH), in a medium containing 4-(3-butoxi-4-methoxy-benzyl) imidazolidin-2 one ( $0.5 \times 10^{-3}$  M) and stimulated with melatonin ( $10^{-12}$  to  $10^{-6}$  M, 30 min), forskolin ( $5 \times 10^{-6}$  M, 20 min) and luzindole ( $5 \times 10^{-6}$  M, 40 min), as appropriated. The cAMP extraction was done by liquid phase and the measured was done by cAMP Biotrak EIA (amersham) protocol. The basal cAMP contend is inhibited by melatonin at E8 ( $83.69 \pm 6.40\%$ ; n = 3; p < 0.05), E12 ( $84.40 \pm 12.48\%$ ; n = 3; p < 0.05) and in PH retinas ( $93.62 \pm 4.30\%$ ; n = 3; p < 0.05). The forskolin-stimulated cAMP contend is inhibited by melatonin in all embryonic stages tested (E8:  $81.25 \pm 11.54\%$ ; n = 3; p < 0.05; E12:  $59.03 \pm 16.66\%$ ; n = 3; p < 0.05; E14:  $35.73 \pm 14.89\%$ ; n = 3; p < 0.05; E16:  $35.73 \pm 14.89\%$ ; n = 3; p < 0.05; PH:  $90.51 \pm 4.37\%$ ). Melatonin concentration-effect curves obtained at E8 retinas, with or without luzindole pre-treatment present inhibition concentration-dependent of the basal cAMP (curves without the pre-treatment:  $-\log EC_{50} = 8.97 \pm 0.79$ ;  $r^2 = 0.86$  and with the pre-treatment:  $-\log EC_{50} = 9.69 \pm 0.37$ ;  $r^2 = 0.97$ ; nH = 1.8; n = 3). At E14 retinas, the melatonin concentration-effect curves ( $-\log EC_{50} = 6.94 \pm 0.31$ ; nH = 2;  $r^2 = 0.95$ ; n = 3) with luzindole pre-treatment ( $-\log EC_{50} = 7.98 \pm 0.17$ ; nH = 2;  $r^2 = 0.96$ ; n = 3) presented a little but significant inhibition of the melatonin maximal inhibitory effect on cAMP forskolin-stimulated contend ( $31.23 \pm 9.5\%$ ; p < 0.05, n = 3).

**Conclusões:**

In conclusion, melatonin receptors are expressed in precocious embryonic stages in chick retina and the melatonin potency and efficacy were different in the embryonic stages tested suggesting presence of the different melatonin receptors in chick retina development.

20.037

MAS-RECEPTOR MEDIATES ENDOTHELIAL NITRIC OXIDE SYNTHASE ACTIVATION BY ANGIOTENSIN-(1-7). <sup>1</sup> Sampaio, W ; <sup>2</sup> Santos, R. A. ; <sup>3</sup> Gratton, J. P. ; <sup>3</sup> Schiffrin, E. L. ; <sup>3</sup> Touyz, R. ; <sup>1</sup> Ciências Fisiológicas, UFMG; <sup>2</sup> Fisiologia, UFMG; <sup>3</sup> Physiologie, Université de Montreal

**Objetivo:** Angiotensin-(1-7) [Ang-(1-7)] causes endothelial-dependent vasodilatation mediated, in part, by nitric oxide (NO) release. However, the molecular mechanisms involved in endothelial nitric oxide synthase (eNOS) activation by Ang-(1-7)-Mas Receptor coupling remain unclear. Using CHO-Mas stably transfected with *Mas* cDNA, we evaluated the underlying mechanisms related to Mas-receptor mediated posttranslational eNOS activation and NO release. We further examined the Ang-(1-7) profile of eNOS activation in human aortic endothelial cells (HAEC), which constitutively express the Mas receptor.

**Métodos e Resultados:** CHO-Mas cells and HAEC were stimulated with Ang-(1-7) in a time course or in a dose-dependent manner ( $10^{-5}$  to  $10^{-9}$ M) in the presence or absence of A779. In CHO-Mas cells, additional experiments were performed in the presence of the PI3K inhibitor, wortmannin ( $10^{-6}$ M). Phosphorylation of eNOS (at S1179/Thr495 residues) and AKT was assessed by immunoblotting. NO release was measured using both the Fluorochrome 2,3-Diaminonaphthalene (DAN) and a NO analyzer. In CHO-Mas cells Ang-(1-7) significantly stimulates eNOS activation (reciprocal phosphorylation/dephosphorylation at S1179/Thr495) and AKT phosphorylation. The coordinate phosphorylation/dephosphorylation was more pronounced at five minutes. Concomitantly, a significant increase in NO release was observed. These effects were blocked by A779. Wortmannin suppressed the eNOS activation in CHO-Mas cells. Similarly, Ang-(1-7) coordinately regulated the S1179/Thr495 phosphorylation and increased NOS activity in HAEC. A sustained AKT phosphorylation was also observed.

**Conclusões:**

These results suggest that Mas mediates Ang-(1-7)-stimulated NO production in part via the PI3K pathway and provides, for the first time, a molecular basis for Ang-(1-7)-mediated NO release.

20.038

C-SRC MEDIATES ANGIOTENSIN II BUT NOT ENDOTHELIN-1-INDUCED ACTIVATION OF MAP KINASES IN VASCULAR SMOOTH MUSCLE CELLS <sup>1</sup> Yogi, A. ; <sup>1</sup> Callera, G. E. ; <sup>1</sup> Tostes, R. C. ; <sup>2</sup> Touyz, RM ; <sup>1</sup> Farmacologia - ICB I, USP; <sup>2</sup> IRCM, University of Montreal

**Objetivo:** Endothelin-1 (ET-1) and angiotensin II (Ang II) are potent vasoactive molecules, which are also able to induce phosphorylation of mitogen-activated protein kinases (MAPKs). These peptides mediate their action through activation of G protein-coupled receptors (GPCR). Since these receptors lack intrinsic kinase activity we sought to determine whether ET-1 and Ang II activate MAPKs through c-Src dependent pathways.

**Métodos e Resultados:** In our study vascular smooth muscle cells (VSMC) from mice (8 to 10 weeks old) with different levels of disruption in the c-Src gene (c-Src<sup>+/-</sup> and c-Src<sup>-/-</sup>) and wild-type (c-Src<sup>+/+</sup>) were studied. Cells were stimulated with ET-1 ( $10^{-7}$  M, 2 to 30 minutes) or Ang II ( $10^{-7}$  M, 2 to 10 minutes). Protein was extracted and western blots were performed for total and phosphorylated forms of ERK 1/2 (Extracellular signal-regulated kinase 1/2) and SAPK/JNK (Stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase). Both peptides mediated phosphorylation of ERK 1/2 in VSMCs from c-Src<sup>+/+</sup> mice, with a maximal response within 2 minutes of stimulation. In c-Src<sup>+/-</sup> and c-Src<sup>-/-</sup>, ET-1 but not Ang II induced the same level of activation. Similar results were observed when we studied ET-1 and Ang II-mediated activation of SAPK/JNK.

**Conclusões:** Our findings demonstrate that whereas MAP kinase activation by Ang II is c-Src-sensitive, ET-1-mediated actions are c-Src-insensitive. These data indicate differential activation of MAP kinase signaling by Ang II and ET-1 in VSMCs and suggest that different ligands to GPCR can activate similar signaling pathways through unrelated mechanisms. These processes—may contribute to unique actions of Ang II and ET-1 in VSMCs.

20.039

UPREGULATION OF c-Src-DEPENDENT NON-GENOMIC SIGNALING BY ALDOSTERONE IN VASCULAR SMOOTH MUSCLE CELLS FROM SPONTANEOUSLY HYPERTENSIVE RATS. <sup>1</sup>

Montezano, A. C. <sup>\*\*</sup>; <sup>2</sup> Callera, G. E. ; <sup>1</sup> Yogi, A. <sup>\*\*</sup>; <sup>1</sup> Tostes, R. C. ; <sup>2</sup> Schiffrin, E.L. ; <sup>2</sup> Touyz, R.M. ; <sup>1</sup> Farmacologia - ICB I, USP; <sup>2</sup> IRCM, University of Montreal

**Objetivo:**

Aldosterone plays an important role in the pathogenesis of hypertension. We previously demonstrated that non-genomic signaling by aldosterone occurs through c-Src-dependent pathways. In addition, endothelin-1 (ET-1) has been implicated as a mediator of aldosterone-induced oxidative stress and vascular remodeling. We tested the hypothesis that aldosterone-induced activation of vascular MAP kinases, collagen synthesis and NADPH oxidase via c-Src-dependent mechanisms is increased in cultured SHR vascular smooth muscle cells (VSMCs). We further investigated the role of ET-1 receptors in these processes.

**Métodos e Resultados:**

Time-course c-Src phosphorylation by aldosterone was shifted to the right in VSMCs from SHR (15 min: SHR - 157±5 vs. WKY - 111±6, arbitrary units). Aldosterone rapidly increased phosphorylation of p38MAP kinase and ERK1/2 with significantly greater effects in SHR vs WKY cells. Aldosterone increased NADPH oxidase activity with significantly greater responses (% of basal) in VSMC from SHR vs WKY (60 minutes: 277±37 vs. 170±15, p<0.05). These events were associated with enhanced [3H]proline incorporation (collagen synthesis index, % of basal) in SHR (137±5%) vs. WKY (119±4%, p<0.05). Increase in NADPH oxidase activity, collagen synthesis, c-Src and MAP kinase phosphorylation induced by aldosterone were significantly reduced by eplerenone (selective mineralocorticoid receptor blocker), PP2 (selective Src inhibitor), bosentan (ET<sub>A</sub>/ET<sub>B</sub> receptor blocker) and BMS182874 (ET<sub>A</sub> receptor blocker) (p<0.05).

**Conclusões:**

In conclusion, non-genomic signaling by aldosterone, mediated through c-Src is increased in SHR VSMCs. Upregulation of c-Src pathway may play a role in aldosterone-stimulated collagen synthesis and vascular fibrosis in hypertension. Cross-talk through ET<sub>A</sub> receptors may be important in these events.

20.040

SKELETAL MUSCLE DAMAGE INDUCED BY CRYOLESION IS ATTENUATED IN THE INDUCED 70-KD HEAT SHOCK PROTEIN (HSP70i) TRANSGENIC MOUSE. <sup>1</sup> Miyabara, E. H. ; <sup>2</sup> Griffin, T. ;

<sup>2</sup> Martin, O.L. ; <sup>2</sup> Mestril, R. ; <sup>1</sup> Moriscot, A. S. ; <sup>1</sup> Biologia Celular e do Desenvolvimento, USP; <sup>2</sup> Physiology, University of Chicago, USA

**Objetivo:** It is well known that certain hsp70i have been for long recognized as tissue protectors, however, their role on skeletal muscle damage and regeneration is still unclear. This work examined the role of the hsp70i in cryolesioned skeletal muscles.

**Métodos e Resultados:** Transgenic mice overexpressing hsp70i and age-matched controls were submitted to cryolesion of soleus and tibialis anterior (TA) muscles and were evaluated at 1, 10 and 21 days after lesion. Another group of control mice was treated with radicicol (0.1 mg/20 g of body weight), an inductor of heat shock response, immediately after cryolesion. The muscles were stained with toluidine blue and ac-phosphatase and immunostained with antibodies against N-CAM, Ki-67 and MHCd/n. The results clearly show that hsp70i mice and radicicol treated mice had reduced incidence of necrosed myofibers in soleus (41.4% and 37%, respectively) and TA (53.5% and 55%, respectively) muscles when compared to control mice at 1day post lesion. The percentages of N-CAM-positive satellite cells (SCs) were increased at 1 and 10 days post lesion in soleus (2.6 and 3.9 fold, respectively) and TA (6.9 and 3.9 fold, respectively) muscles only in control mice. The ratio between the fiber cross-section area and body weight (CSA/bw; um<sup>2</sup>/g) was reduced at 10 days after cryolesion only in soleus (2.6 fold) and TA (1.6 fold) muscles from control mice. HSP70i transgenic mice had neither cryolesion-induced reduction in fiber CSA nor increased N-CAM positive SCs. Finally, the expression of Ki-67-positive proliferating cells and MHCd/n-positive differentiating cells at 10 days were decreased in Hsp70i mice when compared to that of control mice.

**Conclusões:** These results suggest that hsp70i attenuates skeletal muscle damage induced by cryolesion.

20.041

Pressure Stability of Smac/Diablo, a Pro-Apoptotic Protein. Sanches, D. ; Gonçalves, R. B. \*\*; Souza, T. L. F. \*\*; Silva, J. L. ; Oliveira, A. C.; Bioquímica Médica - CCS, UFRJ

**Objetivo:**

Apoptosis has an essential role in the development and homeostasis of all multicellular organisms. The inhibition of apoptosis can cause cancer and excessive cell death is implicated in neurodegenerative diseases. IAPs (Inhibitors of Apoptosis Proteins) suppress apoptosis by preventing the activation of procaspases and inhibiting the enzymatic activity of mature caspases. Another important regulator of apoptosis is released from mitochondria. This novel protein is called Smac/DIABLO, and promotes caspase-9 activation by binding to IAPs and removing their inhibitory activity. Its 3D structure has shown as a dimer with high hydrodynamic radius. Studies reveal that dimerization is required for its function. Here we investigate its structural and dynamics features as folding and dimerization processes.

**Métodos e Resultados:**

To promote disturbances in the protein structure, we have used high pressure, temperature and chemical denaturing agents, and changes were monitored by using spectroscopic techniques, as fluorescence and circular dichroism, besides chromatography. Our data showed that Smac/DIABLO is very stable under pressures up to 3.0 kbar, even at subzero temperatures. A denaturation/dissociation process was obtained when we used high concentrations of urea or guanidine. The CD data showed that both agents affect its secondary structure.

**Conclusões:**

The results suggest that most of the treatments lead to disruption of the dimeric structure, although it seems to be a reversible process. The association of pressure and subdenaturing urea concentrations was the only condition that leads the protein to complete denaturation/dissociation, where this process shows concentration dependence, what is in accordance with dimer-monomer dissociation equilibrium. The characterization of Smac/DIABLO is essential to understand its binding to IAPs and it is consequently important on development of new drugs that block IAPs, leading cancer cells to apoptosis.

20.042

PAPEL DAS CINASES DEPENDENTES DOS NUCLEOTÍDIOS CÍCLICOS NA ATIVAÇÃO DE CÉLULAS Y-1 DERIVADAS DE CÓRTEX SUPRARRENAL DE CAMUNDONGO Campos, T.S.; Castro, N. G.; Farmacologia Básica e Clínica ICB-UFRJ

**Objetivo:** O estímulo da adenilato ciclase pela forskolina (FK) e a conseqüente produção de AMPc estimulam a esteroidogênese e geram o arredondamento dessas células, que têm como característica inicial o formato poligonal. Visamos estudar o papel das proteínas cinases nos efeitos do AMPc e GMPc nas células da linhagem Y-1.

**Métodos e Resultados:** Os fármacos foram aplicados 48 h após o plaqueamento com uma densidade de 1000 céls./mm<sup>2</sup> e as observações foram feitas após 1 h de incubação. Células redondas em cada poço foram contadas em um fotomicroscópio invertido. Na ausência de FK, 19,8 ± 0,1% das células apresentavam-se redondas, enquanto que praticamente todas (98,5 ± 0,9%) mudaram de forma quando expostas à FK 1 µM. Utilizamos então concentrações de 3 e 0,2/0,3 µM para obtermos arredondamento total e parcial, respectivamente. Para estudar a via do AMPc no arredondamento utilizamos um inibidor da PKA, KT2750 em diferentes concentrações. O KT2750 1µM inibiu em mais de 51,4% (n=3) o arredondamento parcial. O estímulo da guanilato ciclase de membrana pelo ANP inibiu o arredondamento promovido pela FK em 60,5% (n=3). O inibidor de PKG, Rp-8-CPT-cGMPS 10µM, não teve efeito sozinho, porém quando associado à FK inibiu o arredondamento em 59,2% (n=4). Quando associamos o ANP ao Rp-8-CPT-cGMPS, este não conseguiu reverter o efeito da inibição pelo ANP.

**Conclusões:** O arredondamento dessas células e possivelmente a produção de esteróides dependem da ativação de proteínas cinases. Apesar de FK e ANP terem efeito antagônico, inibidores de PKA e PKG tiveram efeito semelhante inibindo o arredondamento. Portanto a atividade da PKG promove o arredondamento e a inibição das células Y-1 pelo ANP deve envolver vias independentes de PKG.

20.043

REATIVIDADE FARMACOLÓGICA DA MUSCULATURA LISA DE FILHOTES APÓS TRATAMENTO DAS MÃES COM FLUOXETINA DURANTE PREENHEZ E ALEITAMENTO. Pereira, J. D. ; Caricati-Neto, A. ; Jurkiewicz , A. ; Jurkiewicz, N.H.; Farmacologia, UNIFESP

**Objetivo:**

A fluoxetina é o fármaco mais utilizado atualmente no tratamento da depressão, exercendo esse efeito através da inibição da recaptção de serotonina no sistema nervoso central. Por outro lado, segundo Borda *et al* (Life Sci:64,n.10,1999) também a neurotransmissão periférica alterou-se após o tratamento crônico (21 dias) em ratos com 10mg/kg/dia via IP. Estudar a reatividade farmacológica em filhotes com 30 dias de idade de ratas Wistar tratadas durante prenhez e aleitamento com cloridrato de fluoxetina, em ducto deferente (DDR), jejuno e *fundos* de estômago.

**Métodos e Resultados:**

Ratas Wistar (n=10/grupo) foram tratadas via IP com cloridrato de fluoxetina (F) 10mg/kg/dia durante todo o período de prenhez e aleitamento e comparadas com o grupo controle (C) tratado com o veículo (salina+DMSO) em igual volume (1mL/kg). As ratas e os filhotes foram avaliados em relação ao desenvolvimento ponderal e massa dos órgãos após o sacrifício. O estudo da reatividade farmacológica por curvas dose-efeito para Ba<sup>++</sup>, agonistas adrenérgicos (serotonina, fenilefrina, noradrenalina, dopamina e clonidina), através dos parâmetros farmacológicos Emax, PD<sub>2</sub>,  $\alpha$  e  $\rho$ , bem como tiramina e curvas tempo-efeito para Ca<sup>++</sup>, avaliando-se os componentes fásico e tônico. O ganho de massa corporal das mães durante aleitamento foi significativamente maior (C=6,76±3,67, F=16,52±2,34), com diminuição do PD<sub>2</sub> para clonidina (C=7,9±0,25, F=6,70±0,25) e fenilefrina (C=7,01±0,09, F=5,8±0,18) em DDR e diminuição das fases fásica (C=60,77±3,6, F=37,0±3,71) e tônica (C=60,27±3,93, F=33,27±6,88) para Ca<sup>++</sup> em *fundos* nos filhotes. Não houve diferença estatística para os outros agonistas estudados.

**Conclusões:**

O tratamento de ratas Wistar com fluoxetina durante prenhez e aleitamento provocou aumento da massa corporal das mães durante o aleitamento dos filhotes e alteração da reatividade farmacológica para fenilefrina e clonidina em DDR. O efeito em *fundus* poderia ser uma indicação da ação da fluoxetina sobre os processos dependentes de Ca<sup>++</sup> nessas preparações.

20.044

INIBIÇÃO DA Na<sup>+</sup>-ATPASE DE TÚBULO PROXIMAL POR ADENINA: ENVOLVIMENTO DA PROTEÍNA G<sub>i</sub> E INIBIÇÃO DA ADENILATO CICLASE. <sup>1</sup> Adão-Novae,J. ; <sup>2</sup> Wengert , M. <sup>\*\*</sup>; <sup>2</sup> Lopes, A.G. ; <sup>2</sup> Caruso-Neves, C. ; <sup>3</sup> Leão-Ferreira, L. R. ; <sup>1</sup> Biologia Celular, UFF; <sup>2</sup> IBCCF, UFRJ; <sup>3</sup> Biologia, UFF

**Objetivo:** Por muito tempo acreditou-se que a adenina (Ade), um produto metabólico da adenosina (Ado), não possuía efeito biológico. Dados recentes da literatura identificaram a Ade como um ligante endógeno de um receptor órfão metabotrópico. Resultados do nosso laboratório demonstraram que Ade, inibe de maneira dose-dependente a atividade Na<sup>+</sup>-ATPásica de membrana basolateral (MBL) isolada de túbulo proximal de rim de porco, atingindo efeito inibitório máximo de 55%, na concentração de 10<sup>-5</sup>M, via um receptor metabotrópico, sensível ao DPCPX (antagonista de receptor A1). Este trabalho teve como objetivo estudar os mecanismos de modulação da atividade Na<sup>+</sup>-ATPásica por Ade, considerando o tipo de Proteína G e seu efeito sobre a adenilato ciclase.

**Métodos e Resultados:**

Os ensaios de atividade Na<sup>+</sup>-ATPásica foram realizados segundo o método descrito por Grubmeyer e Penefsky (J.Biol.Chem.1981; 256:3718-3727). A inibição da atividade Na<sup>+</sup>-ATPásica (de 22,59±3,93 para 10,27±1,71nmol Pixmg<sup>-1</sup>xmin<sup>-1</sup>) promovida por adenina (10<sup>-5</sup>M) foi revertida ao controle pela toxina Pertussis (1µg/ml), um inibidor da Proteína G<sub>i</sub>, indicando o envolvimento desta proteína. A participação da adenilato ciclase foi avaliada através da incubação da MBL com adenina (10<sup>-5</sup>M) e forskolina (FSK;10<sup>-6</sup>M), um ativador da enzima. Nossos resultados demonstraram que a Ade inibiu a Na<sup>+</sup>-ATPase (de 21,8±0,24 para 12,21±1,61 nmol Pixmg<sup>-1</sup>xmin<sup>-1</sup>) e que a FSK foi capaz de reverter o efeito inibitório da adenina, indicando uma relação direta entre a inibição da adenilato ciclase e da Na<sup>+</sup>-ATPase.

**Conclusões:** Os resultados acima indicam, que a adenina modula a Na<sup>+</sup>-ATPase, através da inibição da adenilato ciclase, mediada por um receptor sensível ao DPCPX e acoplado à proteína

Gi, sugerindo um provável papel para esta purina na modulação da reabsorção de Na<sup>+</sup> no túbulo proximal.

20.045

MECANISMOS MOLECULARES ENVOLVIDOS NA INIBIÇÃO DA ATIVIDADE Na<sup>+</sup>-ATPÁSICA DE TÚBULO PROXIMAL – PARTICIPAÇÃO DA VIA PLA<sub>2</sub>/PGE<sub>2</sub> Líbano-Soares, J. D.; Lopes-Lima, D. K.; Lopes, A. G.; Neves, C. C.; IBCCF-UFRJ

**Objetivo:**

A bradiginina (BK) atua como um mediador em uma grande variedade de respostas fisiológicas e fisiopatológicas, dentre elas o balanço de Na<sup>+</sup>, acarretando na regulação do volume extracelular. BK 10<sup>-9</sup>M, através da interação com receptores B<sub>2</sub>, modula a atividade Na<sup>+</sup>-ATPásica em membrana basolateral de forma tempo dependente. Nesta condição, foram observadas duas fases: uma rápida estimulatória mediada pela ativação da via PLC/PKC e outra lenta inibitória, cujos mecanismos moleculares não são bem conhecidos. Dados anteriores mostraram que a inibição da atividade Na<sup>+</sup>-ATPásica promovida por BK é revertida pelos inibidores da PLA<sub>2</sub> e ciclooxigenase. O objetivo deste trabalho foi investigar o acoplamento entre as vias PLC/PKC e PLA<sub>2</sub>/PGE<sub>2</sub>.

**Métodos e Resultados:**

As atividades Na<sup>+</sup>-ATPásica e PLA<sub>2</sub> foram medidas segundo os métodos de Grubmeyer e Penefsky (J. Biol. Chem. 256:3718-3721, 1981) e Yang et al. (Analyt. Biochem. 269:278-288, 1999), respectivamente. Foi observado que BK 10<sup>-9</sup>M estimula a atividade PLA<sub>2</sub> em 132,38 ± 29,69%, sendo completamente revertido pelo PACOCF<sub>3</sub> 10<sup>-6</sup>M (inibidor da PLA<sub>2</sub>). Em adição, U73122 5x10<sup>-8</sup>M e calfofistina C 10<sup>-8</sup>M (inibidores de PLC e PKC, respectivamente) bloqueiam a estimulação da atividade PLA<sub>2</sub> promovida por BK. O ácido araquidônico (produto da ativação desta enzima) e PGE<sub>2</sub> mimetizam o efeito inibitório de BK sobre a atividade Na<sup>+</sup>-ATPásica. Tem sido mostrado que PGE<sub>2</sub> atua autócrina ou paracrinamente através de receptores metabotrópicos designados EP. Nosso modelo mostra que o GDPβs (inibidor de proteína G) reverte o efeito inibitório de PGE<sub>2</sub> sobre a atividade Na<sup>+</sup>-ATPásica.

**Conclusões:**

Estes dados indicam que BK ativa inicialmente a via PLC/PKC promovendo o estímulo de PLA<sub>2</sub> e formação de PGE<sub>2</sub>. Posteriormente, este prostanóide atua via receptor acoplado a proteína G inibindo a atividade Na<sup>+</sup>-ATPásica. Podemos propor que o controle de múltiplas vias de sinalização ativadas por BK contribui para a regulação do transporte renal de Na<sup>+</sup>.

20.046

MECANISMOS MOLECULARES ENVOLVIDOS NA INIBIÇÃO DA Na<sup>+</sup>-ATPASE PELA ANGIOTENSINA-(1-7): PARTICIPAÇÃO DA VIA PLC/PKC .Cavalcante, F.; Lara, L. S.; Lopes, A. G.; Neves, C. C.; IBCCF-UFRJ

**Objetivo:**

O rim é um órgão fundamental para a produção e ação da angiotensina-(1-7) [Ang-(1-7)]. Tem sido proposto que parte de seus efeitos esteja associado à modulação da excreção renal de Na<sup>+</sup>. Foi mostrado em nosso laboratório que Ang-(1-7) inibe a atividade Na<sup>+</sup>-ATPásica através da via GMPc/PKG. Dados prévios, indicam o envolvimento do receptor AT<sub>2</sub> nesse fenômeno. O objetivo deste estudo foi confirmar o envolvimento desse receptor e determinar os mecanismos moleculares ativados pela Ang-(1-7) na inibição da atividade Na<sup>+</sup>-ATPásica.

**Métodos e Resultados:**

A atividade Na<sup>+</sup>-ATPásica foi medida na presença de losartan (antagonista do receptor AT<sub>1</sub>) segundo Grubmeyer e Penefsky (J. Biol. Chem. 256: 3718-3727, 1981). Foi observado que AVE0991 e A-779, agonista e antagonista dos receptores AT<sub>1</sub>(1-7) não modificam o efeito inibitório de Ang-(1-7) sobre a atividade da enzima. Além disso, foi identificada a presença do receptor AT<sub>2</sub> na preparação de membrana basolateral através da técnica de Western blotting. Foi mostrado que este receptor está acoplado a proteína Gi, pois toxina pertussis (10µg/ml), reverte a inibição da atividade Na<sup>+</sup>-ATPásica promovida pela Ang-(1-7). O envolvimento da via PLC/PKC foi determinado a partir das seguintes observações: (1) AMPc não mimetiza o efeito de Ang-(1-7) sobre a atividade Na<sup>+</sup>-ATPásica; (2) U73122, 5x10<sup>-8</sup>M e calfofistina C, 10<sup>-8</sup>M, antagonistas de PLC e PKC, respectivamente, revertem o efeito inibitório da Ang-(1-7).



**Conclusões:**

Podemos propor que o efeito bifásico de Ang-(1-7) sobre a reabsorção de Na<sup>+</sup> e fluido pode ser devido ao efeito semelhante deste peptídeo sobre a Na<sup>+</sup>-ATPase, sendo a fase estimulatória bem estudada. Nossos dados sugerem a fase inibitória ocorra através da ativação de AT2 acoplado a proteína Gi, acarretando na ativação do sistema PLC/PKC. No entanto, ainda não é sabido como esta via interage com a via GMPc/PKG, previamente estudada.

20.047

MODULAÇÃO DA ATIVIDADE NA<sup>+</sup>-ATPÁSICA PELA BRADICININA EM TÚBULO PROXIMAL DE RATOS SHR. <sup>1</sup> Pech, G. <sup>\*</sup>; <sup>2</sup> Freitas, J. J. <sup>\*</sup>; <sup>2</sup> Soutinho, E. <sup>\*</sup>; <sup>2</sup> Sampaio, M. S.; <sup>2</sup> Quintana, E. G. <sup>\*\*</sup>; <sup>2</sup> Lara, L. D. S.; <sup>1</sup> Caruso-Neves, C.; <sup>1</sup> Lopes, A. G.; <sup>1</sup> Biofísica-UFRJ; <sup>2</sup> IBCCF-UFRJ

**Objetivo:**

Os processos de regulação da pressão arterial (PA) envolvem dois parâmetros: a resistência vascular periférica (RVP) e o volume do fluido extracelular (VEC). Os transportadores renais de Na<sup>+</sup> são determinantes na regulação do VEC e alvos de sistemas reguladores da PA. Tem sido mostrado que a disfunção do sistema caliceína-cinina é um dos fatores responsáveis pela gênese da hipertensão arterial. Embora os efeitos de bradicinina (BK) sobre a RVP em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) sejam bem descritos, pouco se sabe sobre sua ação no transporte renal de Na<sup>+</sup>. Este trabalho tem como objetivo estudar o efeito de BK sobre a atividade Na<sup>+</sup>-ATPásica ao longo do crescimento em ratos SHR.

**Métodos e Resultados:**

A atividade Na<sup>+</sup>-ATPásica foi medida segundo o método de Grubmeyer e Penesky (1981) e expressa em nmoles Pi x mg<sup>-1</sup> x min<sup>-1</sup>. Para estudar o efeito de BK sobre a atividade Na<sup>+</sup>-ATPásica, foram realizados experimentos de dose dependência (10<sup>-16</sup> – 10<sup>-6</sup>M) em ratos Wistar e SHR de 3, 8 e 16 semanas. Foi observado que em ratos Wistar de 8 e 16 semanas, BK estimula a atividade da enzima, sendo o efeito máximo observado na concentração de 10<sup>-10</sup> M (50 e 80% de aumento, respectivamente). Além disso, em animais de 3 semanas, BK, não modifica a atividade da enzima. Por outro lado, em ratos SHR, BK inibe a atividade da enzima apenas em 8 semanas. Nesta condição a atividade da enzima que era, 140,1 ± 16,97 (controle) passou para 82,4 ± 10,9 (BK 10<sup>-10</sup>M). Nos ratos SHR de 3 e 16 semanas não foi observado modificação da atividade Na<sup>+</sup>-ATPásica.

**Conclusões:**

Este trabalho sugere que BK perde a capacidade de modular o transporte de Na<sup>+</sup> em ratos SHR de 16 semanas. Este fenômeno pode ser devido a uma diminuição nos sítios de ligação para BK ou a uma disfunção na sua via de sinalização. Estes dados sugerem que BK poderia ser um importante fator envolvido na gênese da hipertensão arterial.

20.048

REGULAÇÃO DA NA<sup>+</sup>-ATPASE RENAL POR ANGIOTENSINA II EM RATOS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS. Queiroz-Madeira, EP <sup>\*\*</sup>; Figueroa, J. D. L. P. <sup>\*</sup>; Murad, F. <sup>\*</sup>; Lara, L. D. S.; Neves, C. C.; Lopes, A. G.; IBCCF-UFRJ

**Objetivo:**

Recentemente foi mostrado em nosso laboratório que ratos espontaneamente hipertensos (SHR) adultos apresentam atividade Na<sup>+</sup>-ATPásica máxima em concentrações de Na<sup>+</sup> equivalentes às intracelulares fisiológicas, justificando o aumento de sua atividade comparado aos ratos controle. Em adição, foi observado que a atividade da enzima está aumentada de acordo com o aumento da idade do animal SHR de forma paralela ao estabelecimento da hipertensão. Tem sido proposto que o Sistema Renina Angiotensina seja um dos fatores envolvido neste fenômeno, através da sua ação sobre transportadores renais de Na<sup>+</sup>. Assim, este trabalho tem como objetivo estudar efeitos da angiotensina II (Ang II) sobre a modulação da atividade Na<sup>+</sup>-ATPásica em ratos SHR.

**Métodos e Resultados:**

A atividade Na<sup>+</sup>-ATPásica foi medida segundo o método de Grubmeyer e Penesky (J. Biol. Chem. 256 :3718-3721, 1981). Foi verificado que ao contrário do efeito observado em ratos Wistar, Ang II promove uma inibição dose dependente da atividade Na<sup>+</sup>-ATPásica em ratos SHR adultos. O efeito inibitório máximo ocorre na concentração de 10<sup>-9</sup>M na qual atividade que era de 83,91 ± 11,9 nmoles Pi x mg<sup>-1</sup> x min<sup>-1</sup> (controle) passou para 75,13 ± 13,70 nmoles Pi x mg<sup>-1</sup> x min<sup>-1</sup>. Esse

efeito de Ang II 10-9M não foi modificado por losartan (antagonista do receptor AT<sub>1</sub>), como observado nos ratos Wistar. Por outro lado, PD123319, antagonista do receptor AT<sub>2</sub>, reverte esse fenômeno. Além disso, foi observado que Ang II não modifica a atividade Na<sup>+</sup>-ATPásica nos ratos SHR jovens (3 e 8 semanas).

**Conclusões:**

Estes dados mostram que o efeito de Ang II sobre a atividade Na<sup>+</sup>-ATPásica é dependente da idade assim como o desenvolvimento da hipertensão arterial. Em ratos SHR adultos Ang II 10-9M inibe a atividade da enzima através da ativação de receptores AT<sub>2</sub>, sugerindo a ativação uma via contrareguladora da excreção renal de Na<sup>+</sup>.

20.049

ATIVACÃO CONSTITUTIVA E INTERNALIZAÇÃO DO RECEPTOR AT<sub>1</sub> DA ANGIOTENSINA II: PAPEL DA PONTE DISSULFETO CYS18-CYS274 E DA TERCEIRA ALÇA EXTRACELULAR. <sup>1</sup> Corrêa, S. A. A. ; <sup>1</sup> Pignatari, G. \*\*; <sup>1</sup> Pacheco, N. A. S. ; <sup>1</sup> Pesquero, J. B. ; <sup>1</sup> Oliveira, L.; <sup>1</sup> Paiva, A. C. M. ; <sup>2</sup> Ferro, E. S. ; <sup>1</sup> Shimuta, S. I. ; <sup>1</sup> Biofísica, UNIFESP; <sup>2</sup> Histologia e Embriologia, USP

**Objetivo:** O octapeptídeo angiotensina II (All) está envolvido na hipertensão e em outras doenças cardiovasculares, mediado pelo receptor AT<sub>1</sub>. Investigou-se o papel da terceira alça extracelular (EC-3) e a possível formação da ponte S-S entre as Cys18 e 274, com o objetivo de identificar os resíduos específicos envolvidos no processo de ativação do receptor AT<sub>1</sub>. Para esse estudo foram construídos mutantes simples [C18S]AT1 e dupla [C18,274S]AT1 e um terceiro mutante, [Del Ins.3AEC]AT1, pela deleção de um segmento da alça EC-3, segmento Gln267-Lys275.

**Métodos e Resultados: Métodos:** para a localização e caracterização do receptor AT<sub>1</sub> selvagem e mutantes, estes foram clonados no vetor plasmidial pEGFP (enhanced green fluorescent protein) e então transfectados em células ovarianas de hamster chinês (CHO). Para a determinação de parâmetros de ligação e ativação desses receptores foram realizados ensaios de competição por saturação e competição e o estudo da sinalização celular por ensaio de produção de IP.

**Resultados:** Os receptores transfectados permanentemente em células CHO foram visualizados e identificados por microscopia confocal a laser e a expressão confirmada pelo citômetro de fluxo. A presença de GFP acoplada a receptor selvagem e a [Del Ins.3AEC]AT1, foi detectada na membrana plasmática, no citosol, na região peri-nuclear e no núcleo. Os mutantes [C18S]AT1 e [C18,274S]AT1 foram localizados com a mesma distribuição, membranal e intracelular, mas com predominância no núcleo. Ensaios de ligação por saturação forneceram valores de K<sub>d</sub> (nM): 2,7 ± 0,1 (5) para WT; 6,0\* ± 0,5 (4) para [C18,S]AT1; 7,6\* ± 0,9 (4) [C18,274S]AT1; e 2,1±0,2 (4) para [Del Ins.3AEC]AT1. Os valores de B<sub>max</sub> (fmol/ 3x10<sup>5</sup>cells) foram: 30 ± 1,7 (5), WT; 11\* ± 0,9 (4), [C18S]AT1; 14\* ± 1,4 (4), [C18,274]AT1; e 28±4,7 (4), [Del Ins.3AEC]AT1. Apesar do valor baixo de B<sub>max</sub> os dados obtidos com o citômetro de fluxo revelaram densidade comparável de receptores entre os receptores estudados. A potência desses mutantes foi determinada através de valores de ED<sub>50</sub> (nM), na produção de IP: 2,3±0,5 (6) para WT; 1,2± 0,5 (3), [C18S]AT1; 1,2± 0,03 (3), [C18,274S]AT1; e 1,8 ±0,5 (4), [Del Ins.3AEC]AT1. Verificou-se que somente os mutantes [C18S]AT1 e [C18,274S]AT1 apresentaram nível basal de IP maior que o WT e demais mutantes.

**Conclusões:**

Embora a intensidade de fluorescência, detectada pelo citômetro de fluxo, nas células CHO expressando o receptor tipo selvagem WT e os mutantes, tenha indicado que a expressão foi comparável a todos os receptores estudados, a baixa densidade de receptores na membrana, pelos ensaios de ligação, aliada à intensa fluorescência dos mutantes [C18S]AT1 e [C18S,C274S]AT1 no núcleo, sugerem que esses receptores foram translocados da membrana para o núcleo. A observação que nesses dois mutantes o nível de IP estava aumentado sem a presença do agonista, reforçou a hipótese que a mutação provocou ativação constitutiva desses receptores o que levou à internalização dos mesmos. O dado que a expressão funcional não foi afetada na ausência da inserção no mutante [Del Ins3AEC], o qual impediria a formação da ponte Cys18-Cys274, foi uma forte evidência que sem a estabilidade da terceira alça extracelular dada pela ponte dissulfeto (Cys18-Cys274), o receptor AT<sub>1</sub> passa a estado de ativação constitutiva, pela desestabilização estrutural do receptor, livre de interações intramoleculares.

20.050

PAPEL DOS NUCLEOTÍDEOS CÍCLICOS E FOSFODIESTERASES NA PROLIFERAÇÃO DA LINHAGEM Y-1 DE CÉLULAS TUMORAIS DA SUPRARRENAL Xavier, T. B. C. ; Castro, N. G. ; Farmacologia Básica e Clínica ICB-UFRJ

**Objetivo:** Os nucleotídeos cíclicos, AMPc e GMPc, produzem respostas antagônicas na atividade aguda das células tumorais da suprarrenal Y-1 e também influenciam a proliferação celular. A atividade das fosfodiesterases (PDEs), enzimas que os hidrolisam, é um importante controle na sinalização deste processo. Objetivamos analisar o papel dos nucleotídeos cíclicos e das diversas PDEs na proliferação das células Y-1.

**Métodos e Resultados:** As células foram plaqueadas em placas de 96 poços (120µl/poço de meio Ham F10 5% SFB + células), onde foram acrescentados 30µl de meio com fármacos ou veículo (controle). Após 48h de incubação, foi adicionado o indicador fluorescente Alamar Blue, que reflete a atividade redox celular e o número de células, realizando-se a leitura da fluorescência 3h após a adição do indicador. Os valores médios das triplicatas dos grupos tratados foram expressos relativos à média do grupo controle. O estímulo à produção de AMPc pela Forskolina (4µM) diminuiu a proliferação das células Y-1 em 20% (n=5), enquanto que o estímulo de GMPc pelo peptídeo natriurético atrial (ANP, 0,1µM) diminuiu em 46% (n=2). Inibidores de PDEs também reduziram a proliferação, sendo a redução de 50% pelo IBMX 200µM (não seletivo, n=5), 50% pelo EHNA 30µM (PDE2, n=4), 30% pela vimpocetina 10µM (PDE1, n=2), 27% pela milrinona 10µM (PDE3, n=2), 34% pelo rolipram 2µM (PDE4, n=2), e 33% pelo zaprinast 10µM (PDE5, n=2).

**Conclusões:** O aumento dos níveis de nucleotídeos cíclicos diminui a proliferação das células Y-1. O estímulo da via do GMPc pelo ANP apresentou um efeito inibitório maior que o estímulo da via do AMPc pela forskolina. Diversas PDEs controlam o nível basal de AMPc e GMPc e a sua inibição foi suficiente para reduzir a proliferação, independente do estímulo das vias de produção. As células Y-1 são um modelo útil para estudo da interação AMPc-GMPc ao nível das PDEs.

20.051

ALTERAÇÕES DA CONTRAÇÃO MUSCULAR E NA SINALIZAÇÃO DO CÁLCIO CITOSSÓLICO NA MUSCULATURA LISA DE ÍLEO DE RATOS DIABÉTICOS <sup>1</sup> Pinhal Jr, P ; <sup>1</sup> Paredes-Gamero, E. J. ; <sup>1</sup> Moraes, A.A.F.S. ; <sup>2</sup> Luz, J. ; <sup>3</sup> França, J. ; <sup>1</sup> Oshiro, M. E. M. ; <sup>1</sup> Ferreira, A. T. ; <sup>1</sup> Biofísica, UNIFESP; <sup>2</sup> Fisiologia, UNIFESP; <sup>3</sup> Biofísica, Faculdade Integradas São Camilo

**Objetivo:**

Desordens na motilidade gastrointestinal são comuns em pacientes com Diabetes mellitus. O presente trabalho visa estudar as alterações de responsividade da contração na musculatura lisa de íleo de ratos bem como da sinalização do cálcio citossólico (Ca<sup>2+</sup>) induzidos pelo diabétes.

**Métodos e Resultados:**

O diabetes foi induzido em ratos Wistar com STZ (60mg/Kg peso) e mantido por 30 dias. Os experimentos de registro de contração isométrica foram realizados na camada longitudinal isolada do íleo de grupos de ratos controle e diabético, construindo-se curvas de concentração-resposta para KCl, ACh e CCh. A normalização foi realizada pelo peso seco de tecido (g/ps). A tensão máxima induzida pelo KCl (E<sub>max</sub>) foi superior nos diabéticos (515±3 g/ps n=7) em relação ao controle (417±17 g/ps n=7). O EC<sub>50</sub> da resposta ao KCl também foi maior nos diabéticos (0.034M±0.001) que no controle (0.026M±0.003). O E<sub>max</sub> induzido por ACh se encontra aumentada nos diabéticos (683±44 g/ps n=7) em relação aos controles (545±35 g/ps n=7). Resultados semelhantes foram observados com o CCh, onde o E<sub>max</sub> para o grupo de diabéticos (617±9 g/ps n=7) foi superior ao controle (466±8 g/ps n=7). Contudo os valores de EC<sub>50</sub> não foram alterados para os agonistas muscarínicos. Foram investigadas possíveis alterações dos estoques intracelulares como provável causa do aumento do E<sub>max</sub>, utilizando registros de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> e contração simultâneas. Observou-se alteração da entrada capacitiva de Ca<sup>2+</sup>, registrando-se um aumento do influxo de Ca<sup>2+</sup> superior no grupo diabético em 95% em relação ao controle.

**Conclusões:**

As alterações promovidas pelo diabetes provocaram aumento da resposta contrátil tanto para o KCl quanto para os agonistas muscarínicos ACh e CCh. Estas observações podem estar relacionadas com alterações nos estoques intracelulares de Ca<sup>2+</sup>.

20.052

PEPTÍDEO ATRIAL NATRIURÉTICO INIBE A ATIVIDADE  $\text{Na}^+$ -ATPÁSICA EM CÉLULAS LLC-PK1 Vives, D. ; Motta, R.D.S. ; Lopes, A. G. ; IBCCF-UFRJ

**Objetivo:**

O Peptídeo Natriurético Atrial (ANP) é um hormônio da família dos peptídeos natriuréticos, primeiramente descrito no átrio direito. Um dos seus efeitos sistêmicos é sua ação sobre a excreção renal de sódio. Duas bombas de  $\text{Na}^+$  têm sido descritas no túbulo proximal renal: 1) a  $(\text{Na}^++\text{K}^+)\text{ATPase}$  sensível à ouabaína; 2) a  $\text{Na}^+$ -ATPase insensível à ouabaína e inibida pela furosemida. O presente trabalho teve como objetivo estudar a ação do ANP sobre as atividades  $\text{Na}^+$ -ATPásica e  $(\text{Na}^++\text{K}^+)\text{ATPásica}$  em cultura de células de túbulo proximal de rim de porco (LLC-PK1).

**Métodos e Resultados:**

A atividade ATPásica foi medida pelo método descrito por Grubmeyer e Penefsky (J. Biol. Chem. 256: 3718-3727, 1981). As células LLC-PK1 foram cultivadas conforme previamente descrito (Capella et al. Z Naturforsch [C] 54(1-2):119-27, 1999). Foram utilizadas células cultivadas em placas com 6 poços no estágio de 100% de confluência. O aumento da concentração de ANP de  $10^{-12}$  para  $10^{-6}\text{M}$  no lado luminal inibiu a atividade  $\text{Na}^+$ -ATPásica, sendo o efeito máximo obtido na concentração de  $10^{-10}\text{M}$ . Nesta condição a atividade da enzima diminuiu de  $20,4 \pm 2,1$  para  $8,21 \pm 0,8$  nmol Pi x  $\text{mg}^{-1}$  x  $\text{min}^{-1}$ . Nestas mesmas condições o ANP não modificou a atividade  $(\text{Na}^++\text{K}^+)\text{ATPásica}$ .

**Conclusões:**

Estes dados indicam que o ANP, adicionado na membrana luminal de células LLC-PK1, possui um efeito inibitório seletivo sobre a  $\text{Na}^+$ -ATPase, que está localizada na membrana basolateral. Este dado corrobora a hipótese de que esta enzima está relacionada com a regulação com a regulação fina do transporte de  $\text{Na}^+$  ao longo do túbulo proximal, como indicam outros trabalhos de nosso laboratório, anteriormente publicados.

20.053

ESTUDO DAS PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS DO RECEPTOR NUCLEOTÍDICO  $\text{P2Z/P2X}_7$  EM MACRÓFAGOS PERITONIAIS MURINOS. Gomes, F. R. ; Schachter, J. ; Persechini, P.M. ; IBCCF-UFRJ

**Objetivo:**

Macrófagos intraperitoniais de camundongo expressam o receptor de nucleotídeo  $\text{P2X}_7$  que, uma vez ligado ao agonista, ativa um canal de pequena condutância seletivo para cátions e, em seguida, induz também a abertura de um poro com condutância aproximada de 400 pS. Investigamos as propriedades das correntes catiônicas, elicitadas por estímulo ao ATP, frente ao uso de inibidores farmacológicos de receptores nucleotídicos.

**Métodos e Resultados:**

Macrófagos intraperitoniais foram obtidos de camundongos quatro dias após terem sido injetados com meio tioglicolato. Usando a técnica de patch-clamp, mantemos o potencial de membrana em -40 mV. Na configuração "whole-cell", sob estímulo de ejeções pneumáticas e iontoforéticas de ATP 10 mM foram induzidas respostas bifásicas, com um componente de entrada, composto por correntes catiônicas, e um componente de saída, composto por correntes de canais de potássio ativadas pelo aumento da concentração de  $\text{Ca}^{+2}$  citoplasmático. Nossos dados nos mostram que ATP oxidado (300  $\mu\text{M}$ ), conhecido por inibir o processo de permeabilização celular induzida por ATP, quando em presença no meio por duas horas inibe completamente as correntes catiônicas elicitadas pelo ATP. Já quando adicionado à solução experimental por 5 minutos não há o bloqueio da corrente catiônica. O inibidor Brilliant Blue G (BBG), quando perfundido pela cuba experimental por 5 minutos inibe completamente a corrente catiônica produzida em resposta ao estímulo de ATP. Ensaio de permeabilização celular foram realizados em microscópio de fluorescência na presença e na ausência de BBG, que nos mostrou o bloqueio do fenômeno de permeabilização, confirmando os dados de que este processo envolve a ativação do receptor  $\text{P2X}_7$ . Avaliamos também o perfil de inibição e de permeabilização em citometria de fluxo.

**Conclusões:**

A partir dos dados obtidos concluímos que há um mecanismo de sinalização intracelular envolvido após o processo de ativação do receptor  $\text{P2X}_7$  que leva a abertura do poro que permite que ocorra a permeabilização.

20.054

INTERAÇÃO ENTRE BLOQUEADORES DA JUNÇÃO NEUROMUSCULAR: ESTUDOS ISOBOLOGRÁFICOS. Ricardo, C.; Serra, C. S. M.; Oliveira, A.C.; Farmacologia, USP

**Objetivo:** Utilizam-se, na clínica anestesiológica, associações de bloqueadores neuromusculares (BNM), visando potenciação de efeitos relaxantes. Busca-se a associação ideal de BNM, que propicie a mais intensa potenciação de efeitos. Este trabalho objetiva descobrir essa associação ideal.

**Métodos e Resultados:**

A preparação usada foi a nervo ciático-músculo extensor longo dos dedos do rato, *in vitro*. Contrações indiretas isoladas foram geradas por pulsos elétricos de 1,5-3 V., duração de 0,5 msec. e frequência de 0,1 Hz. Foram estudados os seguintes BNM: atracúrio (ATR), cisatracúrio (CIS), pancurônio (PAN) e vecurônio (VEC). Curvas dose-resposta forneceram, para cada BNM, individualmente ou associados dois a dois, concentrações inibitórias 50% (CI<sub>50</sub>). As CI<sub>50</sub> permitiram construir isobogramas para avaliar, para cada associação de BNM, se houve antagonismo ou sinergismo de efeitos, e no caso de sinergismo, se este foi por adição ou por potenciação.

Resultados: As CI<sub>50</sub> médias (em micromolar/L) e seus erros padrões da média foram: ATR=2,97±0,19; CIS=0,61±0,02; PAN=0,80±0,01; VEC=0,88±0,05; ATR+PAN=1,62±0,14; ATR+VEC=2,28±0,09; CIS+PAN=0,60±0,03; CIS+VEC= 0,71±0,01; PAN+VEC=0,85±0,05. Estes grupos experimentais consistiram de 3 a 6 experimentos, cada um correspondendo a uma curva dose-resposta completa da qual se obteve a CI<sub>50</sub> por interpolação linear. O método isobolográfico mostrou que nas associações ATR+PAN, CIS+PAN e PAN+VEC houve sinergismo por adição; na CIS+VEC houve sinergismo por potenciação e na ATR+VEC houve antagonismo.

**Conclusões:** Dentro do objetivo do presente trabalho, de encontrar associações de BNM que propiciem potenciação de efeitos, a CIS+VEC corresponde a única encontrada dentre todas as estudadas.

20.055

EFEITO DA ADENOSINA E DE SEUS METABÓLITOS SOBRE A ATIVIDADE Na<sup>+</sup>-ATPÁSICA DE TÚBULO PROXIMAL DE RIM DE PORCO <sup>1</sup>Wengert, M.; <sup>1</sup>Alecrin Domingues, E.; <sup>2</sup>Leão-Ferreira, L. R.; <sup>1</sup>Lopes, A. G.; <sup>1</sup>Caruso-Neves, C.; <sup>1</sup>IBCCF, UFRJ; <sup>2</sup>Instituto de Biologia, UFF

**Objetivo:**

Tem sido proposto que adenosina (Ado) modula importantes funções renais, tais como a excreção renal de sódio e de água. Além disso, foi mostrado que Ado pode ser metabolizada no tecido renal formando metabolitos cujas atividades biológicas não são conhecidas. Resultados anteriores do nosso laboratório demonstraram que Ado promove efeito bifásico dose-dependente sobre a atividade Na<sup>+</sup>-ATPásica de túbulo proximal. Portanto, os objetivos deste trabalho são: 1) avaliar o metabolismo de Ado em membrana basolateral isolada de túbulo proximal (MBL), 2) verificar se metabolitos da Ado, tais como adenina (Ade), inosina (Ino) e hipoxantina (Hipo) poderiam modular a atividade Na<sup>+</sup>-ATPásica.

**Métodos e Resultados:**

A atividade Na<sup>+</sup>-ATPásica foi medida em MBL isolada, segundo Grubmeyer e Penefsky (J.Biol.Chem.256:3718-3727,1981). O metabolismo de [<sup>3</sup>H]Ado em MBL foi avaliado através de cromatografia em camada fina (TLC). Foi observado que [<sup>3</sup>H]Ado é convertida à Ino (79,14%), Ade (5,14%) e Hipo (2,76%), restando apenas 3,82% de Ado. O metabolismo de Ado à Ino foi completamente revertido pelo inibidor de adenosina deaminase ENHA (10µM). O aumento da concentração de Ade ou Ino, de 10<sup>-12</sup> a 10<sup>-4</sup>M, inibiu a atividade Na<sup>+</sup>-ATPásica (13±0,49 nmoles Pi.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup>) em até 55%. Em ambos os casos a inibição foi dose-dependente, com efeito máximo observado em 10<sup>-5</sup>M (Ade) e 10<sup>-7</sup>M (Ino). Hipo promoveu um efeito bifásico sobre a atividade Na<sup>+</sup>-ATPásica: em baixas concentrações (10<sup>-8</sup>-10<sup>-7</sup>M) inibiu a atividade enzimática, enquanto altas concentrações (10<sup>-6</sup>-10<sup>-5</sup>M) revertem este efeito.

**Conclusões:**

Estes dados indicam que Ado é metabolizada em MBL e que seus metabolitos podem modular a reabsorção de sódio no túbulo proximal, sugerindo que o efeito final da Ado pode depender do seu metabolismo.

20.056

EXPRESSÃO DA ENZIMA DE SÍNTESE DO ÓXIDO NÍTRICO, DE PROTEÍNAS LIGANTES DE CÁLCIO E DE RECEPTORES DE GLUTAMATO DO TIPO AMPA APÓS DESAFERENTÇÃO DO CÓRTEX VISUAL DE RATOS. Batista, S. S.; Britto, L. R. G.; Fisiologia e Biofísica ICB1, USP

**Objetivo:** O óxido nítrico e as proteínas ligantes de cálcio do tipo tamponante podem proteger neurônios contra processos degenerativos. O glutamato e seus receptores também parecem estar envolvidos em processos degenerativos. O objetivo desse trabalho foi o de estudar a expressão da enzima de síntese do óxido nítrico (NOS), das proteínas ligantes de cálcio calbindina (CB), calretinina (CR) e parvalbumina (PV) e dos receptores de glutamato do tipo AMPA no córtex visual após desafferentação por lesão do núcleo geniculado lateral.

**Métodos e Resultados:** Utilizamos ratos, machos, adultos, da raça Wistar que foram anestesiados e submetidos a uma lesão eletrolítica unilateral do núcleo geniculado lateral (NGL) com o auxílio de um aparelho estereotáxico. Após uma sobrevivência de 1 a 30 dias, seus cérebros foram fixados em paraformaldeído a 4% e cortados para posterior procedimento imuno-histoquímico. Nossos resultados mostraram que a expressão da PV e dos receptores de glutamato diminuiu nos 30 dias de sobrevivência observados. Houve diminuição da NOS nas sobrevivências mais longas e uma diminuição da CB nas sobrevivências mais curtas. A CR foi a única substância analisada que apresentou aumento na sua expressão, em termos do número de células marcadas e intensidade de marcação, nos tempos de sobrevivência utilizados.

**Conclusões:** Nossos resultados revelaram que a CR foi a única substância analisada que mostrou ter um possível papel neuroprotetor no córtex de ratos neste modelo de desafferentação.

20.057

REVERSÃO DO EFEITO ESTIMULATÓRIO DE ANGIOTENSINA II SOBRE A ATIVIDADE DE PLA<sub>2</sub> POR ADENOSINA EM TÚBULO RENAL PROXIMAL <sup>1</sup>Gomes, C. P. \*\*; <sup>2</sup>Santos, G. P. N.; <sup>1</sup>Cardoso, A. G. \*; <sup>1</sup>Caruso-Neves, C.; <sup>3</sup>Ferreira, L. R. L.; <sup>1</sup>Lopes, A. G.; <sup>1</sup>Fisiologia Renal IBCCF-UFRJ; <sup>2</sup>IBCCF-UFRJ; <sup>3</sup>Biologia - IB, UFF

**Objetivo:** Nosso laboratório já demonstrou que adenosina (Ado) via receptor A<sub>2</sub> reverte o efeito estimulatório da angiotensina II (Ang II) sobre a atividade da Na<sup>+</sup>-ATPase presente na membrana basolateral (MBL) de túbulo proximal (TP). Sabe-se que Ang II via receptor AT<sub>1</sub> também apresenta propriedades anti-natriuréticas por estímulo da atividade de PLA<sub>2</sub>. O objetivo deste trabalho foi avaliar como a Ado interfere na atividade de PLA<sub>2</sub> previamente estimulada por Ang II e qual a via de sinalização envolvida.

**Métodos e Resultados:** MBLs de rim de porco foram pré-incubadas com Ang II 10<sup>-8</sup>M por 20 minutos. Todos os ensaios foram realizados na presença de DPCPX 10<sup>-6</sup>M (inibidor de receptor A<sub>1</sub> de Ado). A atividade de PLA<sub>2</sub> foi medida através da técnica de cromatografia em camada fina (TLC), utilizando L-3-fosfatidilcolina, 1,2-di[1-<sup>14</sup>C]palmitoil como substrato. Verificamos que Ado 10<sup>-6</sup>M não alterou a atividade da PLA<sub>2</sub> até 30 minutos de incubação. Ang II aumentou a atividade de PLA<sub>2</sub> em 43,7% comparada ao controle (p<0,05). A adição de Ado 10<sup>-6</sup>M reverteu completamente o efeito estimulatório promovido por Ang II, assim como PACOCF<sub>3</sub> 10<sup>-6</sup>M (inibidor de PLA<sub>2</sub>). Para estudar a via de sinalização AMPc/PKA ativada pelo receptor A<sub>2</sub> de Ado foram utilizados DMPX 10<sup>-8</sup>M (inibidor de receptor A<sub>2</sub>) e iPKA 10<sup>-8</sup>M, que reverteram o efeito da Ado. Já a adição isolada de AMPc 10<sup>-7</sup>M mimetizou a ação da Ado.

**Conclusões:**

Os resultados indicam que Ado reverte o efeito estimulatório de Ang II sobre a atividade de PLA<sub>2</sub> através de seu receptor A<sub>2</sub> acoplado à via de sinalização AMPc/PKA. Esta ação da Ado poderia interferir diretamente no balanço corporal de Na<sup>+</sup> e conseqüentemente no controle da volemia e pressão arterial sistêmica.

20.058

ENVOLVIMENTO DA VIA DE SINALIZAÇÃO EGFR-RAS-MAPK NA PERDA DA ADESÃO CÉLULA-CÉLULA: EFEITO DA FOSFORILAÇÃO DAS PROTEÍNAS DE ADESÃO POR ERK 1/2. De Souza, W.F.; Souza, W. D.; Morgado-Díaz, J. A.; Centro Pesquisa e Desenvolvimento, INCa-RJ

**Objetivo:**

**Objetivos:** A adesão celular é importante para manter a integridade dos tecidos e controlar a proliferação celular. Um dos primeiros eventos para ocorrência de metástase de células tumorais é a desorganização dos contatos célula-célula. A E-caderina é uma glicoproteína que atua na organização de contatos célula-célula, regulando adesão, proliferação e motilidade celular. A ativação de EGFR pode causar alterações morfológicas em células epiteliais através da ativação da via de sinalização MAPK, levando a malignização das mesmas. Recentemente foi proposto que o éster forbol TPA provoca a perda de adesão célula-célula através da ativação da via EGFR-MAPK (Cell Tissue Res. 312:319, 2003). Porém, pouco se sabe sobre as moléculas que medeiam esta transdução de sinal, assim o objetivo deste trabalho é verificar o papel das proteínas Src, Ras e ERK1/2 na perda de adesão de células Caco-2.

**Métodos e Resultados:** Monocamadas de células Caco-2 foram tratadas com TPA (12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato), um promotor de tumor, ou EGF (fator de crescimento epidermal). Antes dos tratamentos, quando indicado, foi feita um pré-tratamento com PP1 (inibidor da proteína Src). Realizou-se a extração celular com Triton X-100, onde a fração solúvel neste correspondia às proteínas citoplasmáticas e a insolúvel às proteínas ligadas ao citoesqueleto. As diferentes frações celulares foram submetidas a uma separação eletroforética e a análise da distribuição protéica feita por imunoblotting usando anticorpos específicos. Foi verificado que o tratamento com TPA causou translocação de E-Caderina da fração associada ao citoesqueleto para a citoplasmática, e este efeito foi inibido pelo pré-tratamento com PP1. Ocorreu também um aumento da expressão de ERK1/2 (MAPK), tanto na fração associada ao citoesqueleto quanto na citoplasmática, quando células eram tratadas com TPA e o efeito foi revertido quando do pré-tratamento com PP1.

**Conclusões:** Nossos resultados indicam que Src estaria atuando na regulação da adesão célula-célula via MAPK em células Caco-2 tratadas com TPA.

20.059

AUMENTO DA FOSFORILAÇÃO DE ERK1/2 É DEPENDENTE DO SISTEMA ENDOTELINA-1 VIA RECEPTORES ET<sub>A</sub> EM RATOS DOCA-SAL <sup>1</sup>Yogi, A. ; <sup>1</sup>Callera, G. E. <sup>\*\*</sup>; <sup>1</sup>Fortes, Z. B. ; <sup>1</sup>Carvalho, M. H. C. ; <sup>1</sup>Nigro, D. ; <sup>2</sup>Touyz, RM ; <sup>1</sup>Tostes, R. C. ; <sup>1</sup>Farmacologia ICB I, USP; <sup>2</sup>Multidisciplinar de Pesquisa, Clinical Research Institute of Montreal (IRCM)

**Objetivo:** A endotelina-1 (ET-1) é um peptídeo vasoconstritor que também promove deposição de colágeno, remodelamento vascular, estresse oxidativo e processo inflamatório. Os mecanismos de sinalização intracelular envolvidos nesses eventos são em parte dependentes da fosforilação de quinases ativadas por mitógenos (MAPKs). A ativação dessas vias pela ET-1 não é completamente compreendida, mas a participação da tirosina quinase c-Src como um possível elo entre os receptores acoplados a proteína G e a via das MAPKs vem sendo sugerida. No presente estudo, avaliamos os efeitos do bloqueio de receptores ET<sub>A</sub> sobre a ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinase 1/2) e c-Src em artérias mesentéricas de ratos DOCA-sal (DOCA), um modelo de hipertensão caracterizado pelo aumento da expressão de ET-1.

**Métodos e Resultados:** Ratos normotensos uninefrectomizados (UniNX) e hipertensos DOCA foram tratados com antagonista de receptores ET<sub>A</sub> (BMS182874, 40 mg/kg por dia, DOCA-BMS) ou veículo por 5 semanas. A ativação da ERK1/2 e da c-Src foi avaliada por western blot das suas respectivas formas fosforiladas e totais no leito mesentérico. A fosforilação da ERK 1/2 está aumentada em ratos DOCA comparado ao UniNX (DOCA: 131 ± 19 vs UniNX: 68 ± 13, p<0.05). O tratamento com BMS182874 abole essa diferença (DOCA-BMS: 34 ± 4 vs UniNX-BMS: 47 ± 3). A ativação da c-Src é semelhante entre os ratos DOCA e UniNX (DOCA: 55±9 vs VEI: 49±11). O antagonismo de receptores ET<sub>A</sub> não apresentou efeito sobre a fosforilação da c-Src (DOCA-BMS: 81±12 vs UniNX-BMS: 62±12).

**Conclusões:** Nossas observações sugerem que a ativação da ERK1/2 no leito mesentérico de ratos hipertensos DOCA é mediada por ET-1, uma vez que o tratamento com BMS182874 foi capaz de reverter o aumento de fosforilação da mesma. Além disso, também é possível sugerir que esse aumento é independente da ativação da via da c-Src já que não é observada diferença de ativação nos animais normotensos e hipertensos ou pelo tratamento com antagonistas de receptores ET<sub>A</sub>.

20.060

## MODULAÇÃO DA RESPOSTA AO CÁLCIO INTRACELULAR INDUZIDA POR NUCLEOTÍDEOS EM MACRÓFAGOS INFECTADOS COM *LEISHMANIA AMAZONENSIS* Marques, C.S. ; Chaves, S. P. \*\*; Bergmann, B. R. ; Coutinho-Silva, R. ; Biofísica CCS, UFRJ

### **Objetivo:**

Sabe-se que os receptores para nucleotídeos P2 estão envolvidos em processos de controle da infecção por parasitas intracelulares, como *M. tuberculosis* e *C. trachomatis*, e que macrófagos são os recipientes para replicação das espécies de *Leishmania*. Neste trabalho estudamos a modulação da expressão de receptores P2 em macrófagos infectados por *Leishmania amazonensis*, através de medidas de variação de cálcio intracelular.

### **Métodos e Resultados:**

Utilizaram-se macrófagos obtidos por lavado intraperitoneal de camundongos Balb/c. Os macrófagos foram plaqueados, infectados ou não a um MOI de 7:1 com *L. amazonensis* por 48 horas a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>. As células foram incubadas com FURA-2 a 5 µM e Probenicida a 2,5 mM por 40 minutos, ao abrigo da luz. Foram utilizadas aproximadamente 20 células por campo, sendo realizados pulsos de 100µM de ATP e UTP em diferentes seqüências com intervalos de 4 minutos. Os registros foram adquiridos e analisados utilizando sistema de aquisição PTI (Photon Technology International, da PKWARE Inc.) RESULTADOS: Observou-se que, na situação ATP seguido de UTP, macrófagos não infectados respondem ao ATP com uma duração média de 26 ± 3 s (n=3), mas não ao UTP. Entretanto, quando infectadas, as células respondem aos dois nucleotídeos sendo a duração do ATP de 14,4 ± 0,5 s (n=3) e ao UTP 7,63 ± 0,04 s (n=3). Quando a situação é invertida, ou seja, o UTP é aplicado antes do ATP, os macrófagos infectados e não infectados respondem a ambos os nucleotídeos sendo que a resposta ao UTP é de 17 ± 7 s (n=2) e 18 ± 7 s (n=2) e para o ATP de 14 ± 3 s (n=2) e 39 ± 12 s (n=2), para não infectado e infectado respectivamente.

### **Conclusões:**

Macrófagos infectados apresentam diferenças quanto ao tempo e presença de resposta ao cálcio quando estimulados com os nucleotídeos testados. Na situação ATP seguida de UTP, macrófagos não infectados respondem somente ao ATP, enquanto os infectados respondem a ambos pulsos, o que sugere a presença de outro receptor adicional ao P2X respondendo na membrana dos macrófagos infectados. Os possíveis candidatos a receptores que estariam respondendo no primeiro pulso de ATP seriam os P2X e/ou P2Y2 e, para o segundo receptor envolvido, quando na situação de infecção, o receptor P2Y4. Portanto, macrófagos infectados por *L. amazonensis* expressam maior variedade de receptores P2.

20.061

ADENOSINA INIBE A VIA PLC/PKC ATIVADA POR ANGIOTENSINA II EM MEMBRANA BASOLATERAL DE TÚBULO RENAL PROXIMAL <sup>1</sup> Gomes, C. P. \*\*; <sup>1</sup> Cardoso, A. G. ; <sup>1</sup> Santos, G. P. N. \*; <sup>1</sup> Caruso-Neves, C. ; <sup>2</sup> Ferreira, L. R. L. ; <sup>1</sup> Lopes, A. G. ; <sup>1</sup> Fisiologia Renal IBCCF, UFRJ; <sup>2</sup> Biologia IB UFF

**Objetivo:** Angiotensina II (Ang II) e adenosina (Ado) são importantes moduladores da atividade Na<sup>+</sup>-ATPase de membrana basolateral (MBL) de túbulo proximal (TP) e, conseqüentemente, regulam a excreção renal de Na<sup>+</sup>. Nosso laboratório demonstrou que a ativação do receptor A<sub>2</sub> de Ado reverte o efeito estimulatório da Ang II sobre a Na<sup>+</sup>-ATPase, através da ativação da via de sinalização PtnGs/AC/PKA. Neste trabalho procuramos identificar a etapa da via de sinalização de Ang II inibida por Ado.

**Métodos e Resultados:** MBL isoladas de TP de rim de porco foram pré-incubadas com Ang II por 20 minutos. Em seguida, foi realizado ensaio da atividade Na<sup>+</sup>-ATPásica por 30 minutos (Grubmeyer e Penefsky, J. Biol. Chem. 256:3718-3727, 1981). Verificamos que a adição de Ado 10<sup>-6</sup>M e DPCPX 10<sup>-6</sup>M (antagonista A<sub>1</sub>) reverteu o efeito estimulatório de Ang II na Na<sup>+</sup>-ATPase. No entanto, a adição de PMA 10<sup>-12</sup>M ao ensaio bloqueou os efeitos inibitórios promovidos por Ado 10<sup>-6</sup>M ou por U73122 50mM (inibidor de PLC). Então, avaliamos a atividade de PKC através de ensaio de fosforilação seletiva de histona com [<sup>32</sup>Pγ]ATP. A atividade de PKC aumentou de 2,5±1,0 para 16,0±1,6 pmoles Pixmin<sup>-1</sup>xmg<sup>-1</sup> em resposta a Ang II 10<sup>-8</sup>M. Este efeito foi revertido por Ado 10<sup>-6</sup>M, U73122 50mM e por PMA 10<sup>-12</sup>M. Finalmente, medimos a atividade de PLC, através de TLC. Ado 10<sup>-6</sup>M reverteu o aumento de atividade da PLC promovido pela Ang II. A ação da Ado foi mimetizada por AMPc 10<sup>-7</sup>M e inibida por DMPX 10<sup>-8</sup>M (antagonista de A<sub>2</sub>) e por iPKA 10<sup>-8</sup>M.



**Conclusões:** Os dados obtidos indicam que PKA ativada por Ado (via receptor  $A_2$ ) reverte o efeito estimulatório de Ang II sobre a  $Na^+$ -ATPase por ação direta na via PLC/PKC. Este é o primeiro trabalho que descreve a interação das vias AMPc/PKA e PLC/PKC ativadas respectivamente por Ado e Ang II na modulação do transporte renal de  $Na^+$ .

20.062

AFFINITY AND RELATIVE EFFICACY OF ALPHA-1 ADRENOCEPTOR AGONISTS Lima, V. ;<sup>2</sup> Pupo, A. S.; Farmacologia, UNESP Botucatu

**Objetivo:**

To compare the affinities ( $pK_A$ ) and relative efficacies ( $\epsilon$ , in relation to that of noradrenaline, NA) of commonly used phenethylamine derivatives NA, phenylephrine (PE) and methoxamine (ME), the imidazolines A-61603, oxymetazoline (OXY) and naphazoline (NFZ) and the azaspirone buspirone (BUSP) at  $\alpha_1$ -ARs.

**Métodos e Resultados:**

The contractions of the rat epididymal vas deferens (RVD), rat spleen (RS) and rat aorta (RA) were used as models for actions mediated by  $\alpha_{1A}$ -,  $\alpha_{1B}$ - and  $\alpha_{1D}$ -ARs, respectively. The  $pK_A$  and  $\epsilon$  (in relation to the efficacy of NA) of the agonists were calculated by null methods after partial receptor alkylation.

The  $pK_A$  for PE (RVD $\approx$ 5.6 $\pm$ 0.1; RS $\approx$ 3.9 $\pm$ 0.1; RA $\approx$ 5.9 $\pm$ 0.2), ME (RVD $\approx$  4.7 $\pm$ 0.2; RA $\approx$ 4.4 $\pm$ 0.3), suggest that these drugs show no selectivity towards  $\alpha_{1A}$ - or  $\alpha_{1D}$ -ARs, but PE has lower affinity for  $\alpha_{1B}$ -ARs. ME was only a weak agonist in the RS precluding calculations. Also,  $\epsilon$  of PE (RVD $\approx$ 0.45; RS $\approx$ 1.9; RA $\approx$ 0.68) and ME (RVD $\approx$ 0.78; RA $\approx$ 1.78) were high, further indicating that these drugs poorly discriminate these  $\alpha_1$ -AR subtypes. The  $pK_A$  of NFZ (RVD $\approx$ 6.1 $\pm$ 0.1; RA $\approx$ 6.5 $\pm$ 0.1) and BUSP (RVD $\approx$ 5.9 $\pm$ 0.1; RA $\approx$ 5.8 $\pm$ 0.2), also suggest that these drugs show no selectivity towards  $\alpha_{1A}$ - or  $\alpha_{1D}$ -ARs, but they showed higher  $\epsilon$  at  $\alpha_{1D}$ -ARs (NFZ, RVD $\approx$ 0.06; RA $\approx$ 0.221; and BUSP (RVD $\approx$ inactive; RS $\approx$ inactive, RA $\approx$ 0.22). NA showed higher  $pK_A$  at the  $\alpha_{1D}$ -ARs in the RA ( $\approx$ 6.7 $\pm$ 0.2) than at the  $\alpha_{1A}$ -ARs in the RVD ( $\approx$ 5.5 $\pm$ 0.3) and at the  $\alpha_{1B}$ -ARs in the RS ( $\approx$ 4.8 $\pm$ 0.2). The opposite selectivity was observed with OXY and A-61603, the  $pK_A$  for OXY (RVD $\approx$ 6.6 $\pm$ 0.2; RA $\approx$ 5.5 $\pm$ 0.21) and A-61603 (RVD $\approx$ 6.9 $\pm$ 0.1; RA $\approx$ 4.7 $\pm$ 0.2) show higher affinity at the  $\alpha_{1A}$ -ARs than at the  $\alpha_{1D}$ -ARs. However, OXY showed low  $\epsilon$  in RVD ( $\epsilon\approx$ 0.03) and RA ( $\epsilon\approx$ 0.18). A-61603, OXY and NFZ behaved as very weak agonists in RS. Alternative methods are currently being developed to calculate their affinities in the RS.

**Conclusões:**

Some selectivity can be advantageously explored not only from differential affinity but also from differential efficacy.

20.063

CHRONIC TREATMENT OF RATS WITH ALCOHOL DURING PREGNANCY AND NURSERY CAUSES ALTERATION OF APPARENT AFFINITY (PD<sub>2</sub>) FOR CHOLINERGIC DRUGS IN RAT VAS DEFERENS (RVD) OF YOUNG DESCENDANTS Verde, LF ; Jurkiewicz, N. H.; Ribeiro, C. A. ; Mota, P. S. ; Reuter, H. R. ; Jurkiewicz, A. ; Farmacologia, UNIFESP

**Objetivo:** Introduction and Goals: Previous evidences showed that chronic treatment of parent rats with alcohol during pregnancy and nursery causes a decrease of body, vas deferens and stomach fundus weights, in descendents (males and females). However, the apparent affinity (pD<sub>2</sub>) for cholinergic drugs was not changed in stomach fundus after acute or chronic treatment with alcohol (SBFTE, 119, 2005). Now, our objective was to check if chronic treatment of rats with ethanol could produce alterations of contractions induced by cholinergic agonists in RVD.

**Métodos e Resultados:** Methods and Results: Wistar rats, 4 months old, were treated from the 1st day of pregnancy until the 10th day post-partum with 20, 25, or 30% oral alcohol ad libitum. Controls received drinking water. Functional experiments were made in RVD of 40 days old litters and dose response curves for acetylcholine (ACh), carbachol (CCh) and mecholil (MeCh) contractions were made and the apparent affinity values (pD<sub>2</sub>) analysed. The value of pD<sub>2</sub> for CCh was significantly lower than controls (5,6 $\pm$ 0,11 and 4,4 $\pm$ 0,32, n=5), but not for ACh (4,4 $\pm$ 0,40 and 4,4 $\pm$ 0,22, n=5) and MeCh (5,1 $\pm$ 0,27 and 4,6 $\pm$ 0,10, n=5).

**Conclusões:** Conclusion: The use of alcohol during pregnancy and nursery caused a decrease of the affinity of CCh, but not of ACh or MeCh, in RVD of young descendant males (40 days old litters), indicating an alteration on the cholinergic system. Experiments are now being made to check whether or not the involvement of cholinesterase could explain these discrepant values between CCh and the other two agonists. Supported by Fapesp, CNPq and Capes.

20.064

CONSTRUÇÃO DO VETOR PCDNA-GLUT4MYC7-GFP E ESTUDO ATRAVÉS DE CITOMETRIA DE FLUXO. Hilzendeger, A.; Mori, M.A. \*\*; Pesquero, J.B.; Biofísica, UNIFESP

**Objetivo:**

O sistema calicreína-cininas desempenha várias funções fisiológicas e fisiopatológicas, dentre elas a captação de glicose pela célula muscular esquelética e adipócitos, inflamação, dentre outras. Um dos mediadores dos efeitos pró-inflamatórios deste sistema está relacionado à ação da Des-Arg<sup>9</sup>-Brdicininina (DBK) em um subtipo de receptor de cininas denominado receptor B1. Dados recentes de nosso laboratório demonstram a participação deste receptor na regulação endócrina do metabolismo no tecido adiposo, sendo importante na liberação e ação de hormônios, como a insulina e a leptina. O objetivo deste trabalho consiste na construção do vetor pcDNA-GLUT4myc7-GFP e análise de sua expressão em células 3T3-L1.

**Métodos e Resultados:**

Para se analisar o papel do receptor B1 no transporte de glicose foi construído o vetor pcDNA-GLUT4myc7-GFP. Nessa construção as seqüências codificadoras da proteína fluorescente verde (GFP) e do marcador *myc* foram adicionadas à seqüência do transportador GLUT4. Este sistema permite a análise da expressão do GLUT4 ligado à proteína fluorescente GFP e ao marcador *myc*, assim como o deslocamento do transportador na célula. Este vetor foi transfectado na linhagem de fibroblastos 3T3-L1, e estes foram diferenciados em adipócitos utilizando-se insulina, dexametasona e isobutilmetilxantina. Foram construídos dois vetores pcDNA-GLUT4myc7-GFP alterando-se somente o gene codificador para resistência ao antibiótico utilizado para seleção das células transfectadas. Os fibroblastos transfectados, resistentes a higromicina, foram analisados em citômetro de fluxo e mostraram um aumento da fluorescência de 15,3% no canal FL1-GFP em relação às células 3T3 não transfectadas (controle). Células 3T3 transfectadas e resistentes a neomicina apresentaram um aumento de 7,4% em relação ao controle. Também foi observada uma alteração na complexidade (SSC) das células transfectadas, indicando um aumento da translocação da proteína GLUT4, expressa pelo vetor, à membrana.

**Conclusões:**

Nossos resultados mostram a produção de um sistema *in vitro* efetivo para análise da translocação do transportador de glicose GLUT4. As células 3T3-L1 transfectadas com o vetor pcDNA-GLUT4myc7-GFP, com resistência a higromicina, e diferenciadas em adipócitos serão utilizadas posteriormente para a avaliação do efeito da DBK (agonista do receptor B1 de cininas) no tráfego de GLUT4. Dessa forma, será possível a utilização desse sistema para analisar o papel do receptor B1 na captação de glicose em adipócitos.

20.065

DESENSITIZATION INDUCED BY ANGIOTENSIN II IN PRIMARY CULTURE HUMAN PREADIPOCYTES <sup>1</sup> França, S.G.; <sup>1</sup> Gragnani, A.; <sup>2</sup> França, J. P.; <sup>2</sup> Ferreira, A. T.; <sup>2</sup> Smaili, S. S.; <sup>2</sup> França, L. P.; <sup>1</sup> Ferreira, L.M.; <sup>1</sup> Cirurgia, UNIFESP; <sup>2</sup> Biofísica, UNIFESP

**Objetivo:** This work was to study the prolonged effect of angiotensin II (AII) in the [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> levels in primary culture human preadipocytes.

**Métodos e Resultados:** The cell dispersion and culture were done as described in *J. Clin. Endocrinol. Med.* **64:832-5, 1987**. Intracellular Ca<sup>2+</sup> measurements were made using confluent human preadipocytes cells (HPC) loaded with the Ca<sup>2+</sup> fluorophore fura-2 for high resolution fluorescence microscopy Nikon. The cells were cultured on coverslips as described in *Eur. J. Pharmacol.* **439:13-9, 2002**. Mean basal Ca<sup>2+</sup> concentration and responses to AII were obtained in confluent cultures when ≥ 80-90% of the total coverslip surface was covered with the cells, and calculated as described in *J. Biol. Chem.* **260:3440-50, 1985**. To study the induction of desensitization by AII, HPC were submitted to a single treatment with the 10 nM AII for 5 min. The cells were ascertained by immunocytochemical localization performed with an actin-F antibody

conjugated with a fluorescence marker. Staining of the cells with Oil Red O revealed that all cells in the preparation were labeled and excluded the contamination with fibroblast cells. The effects of All on  $\text{Ca}^{2+}$  concentration were investigated with prolonged treatment of the peptide in cultured HPC. The maximal change in the cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  observed was  $75 \pm 8\%$  relative to the basal  $\text{Ca}^{2+}$  level. The lag time to the response reach the maximal change in  $\text{Ca}^{2+}$  levels was  $25 \pm 2$  sec that was followed by a lower and sustained  $\text{Ca}^{2+}$  level in HPC. This response was inhibited by the pretreatment with thapsigargin but it was not inhibited in All stimulation in  $\text{Ca}^{2+}$  free medium.

**Conclusões:** Our data showed these  $\text{Ca}^{2+}$  increases were transient with regard to the desensitization phenomenon. This response to All was inhibited in HPC pretreatment with thapsigargin showing that the intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  stores are involved in this effect in HPC.

20.066

EFEITO PROTETOR DA VITAMINA C SOB AÇÃO DO PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) EM CÉLULAS DE MÚSCULO LISO DE ÍLEO DE COBAIA (CMLIC) Alvarez, A. L. S. ; Claro, S. ; Ferreira, A. T. ; Oshiro, M. E. M. ; Biofísica, UNIFESP

**Objetivo:** Estudar o papel protetor da vitamina C no estresse oxidativo gerado pelo  $\text{H}_2\text{O}_2$  em CMLIC. A funcionalidade dos receptores celulares foi testada pela mobilização de cálcio induzida pela Angiotensina II (All).

**Métodos e Resultados:** Culturas de CMLIC foram subdivididas em 4 sub-grupos tratados por 24 h: controle, 0,5 mM de vitamina C, 0,5 e 0,25 mM de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e 0,5 mM de Vitamina C colocada 1 h antes de incubar com 0,5 e 0,25 mM de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Suspensões de células foram obtidas com 0,25% de tripsina e incubadas em Tyrode com 0,2% de albumina bovina. A células foram lavadas, ressuspensas em Tyrode e incubadas com 2  $\mu\text{M}$  de fura 2-AM e 0,02% de ácido plurônico por 2 h. A incorporação do fluoróforo foi acompanhada no fluorímetro Spex-Fluorog à 37°C em agitação constante. A concentração de cálcio intracelular ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) foi obtida pelo método ratiométrico (Gryniewicz e cols., 1985). A mobilização do cálcio foi estimulada com  $10^{-5}$  M de All promovendo resposta bifásica em todos os grupos. Resultados preliminares em células incubadas com  $\text{H}_2\text{O}_2$  apresentaram aumento de 173% da  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  basal mas a  $\% \Delta \text{Ca}^{2+}$  estimulada por All foi 81% menor que o grupo controle (n=2). Com 0,5 mM de vitamina C houve interferência na  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  basal com a redução de 73% e a  $\% \Delta \text{Ca}^{2+}$  foi 41% menor em relação ao grupo controle (n=4). A  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  basal foi recuperada parcialmente com a vitamina C previamente adicionada às células tratadas com 0,5 e 0,25 mM de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (n=2), porém a  $\% \Delta \text{Ca}^{2+}$  não foi alterada a resposta à All (24% menor) que no grupo controle (n=2).

**Conclusões:** A ação do  $\text{H}_2\text{O}_2$  reflete desestruturação nas células causando a oxidação dos fosfolípidos e proteínas de membranas e é dependente da sua concentração, visto que com 0,25 mM de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , a 0,5 mM de vitamina C impediu a ação do peróxido sobre a  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Há indicativo que a vitamina C não impediu danos no retículo endoplasmático pois não foi observada a recuperação da resposta à All. Concluímos que a vitamina C tem papel protetor contra agentes oxidantes, porém possui efeito próprio nos estoques de cálcio intracelular.

20.067

EFFECT OF FENOTEROL ON PLASMA CYCLIC AMP AND AMP LEVELS IN MICE. Lee, V. ; Chiavegatti, T.; Godinho, R. O.; Farmacologia, UNIFESP

**Objetivo:** Agonist binding to  $\beta$  adrenoceptors increases the intracellular production of cyclic AMP (cAMP) via activation of stimulatory G (Gs) proteins. In many tissues, this effect is followed by the extracellular accumulation of cAMP via an energy dependent transporter. The extracellular cAMP might be degraded to AMP and subsequently to adenosine (SBFTE p.99, 2004), an autacoid that causes bronchoconstriction in patients with asthma. In the present study, we evaluate the systemic effects of fenoterol, an agonist of  $\beta_2$ -adrenoceptor used in asthma treatment, on plasma levels of cAMP and its metabolites (AMP and adenosine).

**Métodos e Resultados:** Mice (n=6) were treated p.o. with 10, 20 or 50 mg/kg fenoterol (Berotec®). After 1h, the animals were anesthetized and 1 mL of blood was collected from the abdominal aorta in tubes containing 40 mM EDTA. The samples were centrifuged for 15 min at 20,000 x g at 4°C, the plasma was boiled for 10 min and the cAMP, AMP and adenosine content was determined by HPLC. The plasma concentrations of cAMP and AMP in vehicle-treated mice were  $0.32 \pm 0.013$  and  $0.75 \pm 0.11$  nmols/mL, respectively. Treatment of mice with fenoterol (10 to 50 mg/kg) increased by

1.5 to 4.0 and 2.1 to 3.4 fold the plasma levels of cAMP and AMP, respectively. Interestingly, the  $\beta_2$  agonist also increased the plasma ATP content by 1.2 to 2.6 fold in comparison to control values ( $1.92 \pm 0.056$  nmols/mL).

**Conclusões:** Oral administration of fenoterol at therapeutic doses increases plasma concentration of cAMP, AMP and ATP. Assuming that extracellular ATP and cAMP are metabolized to adenosine, our results indicate that  $\beta$  adrenoceptor agonists may have other systemic effects by activating purinergic or adenosine receptors, which may be responsible for some side effects reported with the therapeutic use of fenoterol and related drugs.

20.068

ESTUDO DA LIGAÇÃO DOS PEPTÍDEOS ANGIOTENSINÉRGICOS E CININÉRGICOS EM CÉLULAS ENDOTELIAIS DE AORTA DE COELHO. Mendes, E. P.; Machado, L.; Santos, R. A. S.; Fisiologia e Biofísica, UFMG

**Objetivo:**

Dados da literatura mostram que as células endoteliais expressam constitutivamente os receptores angiotensinérgicos  $AT_1$ ,  $AT_2$  e MAS, assim como os receptores  $B_1$  e  $B_2$  da Bradicidina. Assim o objetivo deste trabalho foi avaliar a ligação dos peptídeos do sistema renina angiotensina e calcitreína cinina em células endoteliais de aorta de coelho (CEAC).

**Métodos e Resultados:**

Foram utilizadas células CEAC em experimentos de ligação específica com  $^{125}I$ -Ang II,  $^{125}I$ -Tyr-BK  $^{125}I$ -Ang-(1-7). As células plaqueadas foram incubadas por 60 min à 4°C com DEMEN na presença ou não de peptídeos não marcados. Nas células incubadas com  $^{125}I$ -Tyr-BK foi adicionado BK ( $10^{-6}$  e  $10^{-8}$  M) ou DABK ( $10^{-6}$  e  $10^{-8}$  M). Nas células incubadas com  $^{125}I$ -Ang-(1-7) foi adicionado Ang-(1-7) ( $10^{-6}$  e  $10^{-8}$  M) e nas células incubadas com  $^{125}I$ -Ang II foi adicionado Ang II ( $10^{-6}$  e  $10^{-8}$  M). Em seguida, foram lavadas com DEMEM à 4°C e lisadas com triton 0,1%. A Ang II não marcada não deslocou a  $^{125}I$ -Ang II. No entanto a Ang-(1-7), BK e a DABK ( $10^{-6}$  M) deslocaram seus respectivos peptídeos marcados. Para estudar a liberação de Óxido Nítrico as células foram estimuladas com BK ( $10^{-6}$  e  $10^{-8}$  M), Ang-(1-7) ( $10^{-6}$  e  $10^{-8}$  M). A liberação de óxido nítrico foi avaliada diretamente através de microscopia confocal usando como sonda o fluoróforo diamino fluoriceína diacetato (DAF-FM). Nas células estimuladas com BK  $10^{-6}$ M a liberação de óxido nítrico foi de 39,73 +/- 5,51 pixes/área que foi estatisticamente diferente da liberação do controle que foi de 19,14 +/- 1,93 pixes/área. A Ang-(1-7),  $10^{-7}$  M, provocou a liberação de óxido nítrico (42,09 +/- 6,60 pixes/área) estatisticamente diferente do controle.

**Conclusões:**

Os nossos dados sugerem a presença de receptores  $B_1$ ,  $B_2$  e MAS, embora a expressão destes nestas células seja baixa.

20.069

ESTUDO DA SINALIZAÇÃO DA INSULINA EM ANIMAIS SUPERALIMENTADOS NO PERÍODO DE LACTAÇÃO <sup>1</sup> Rodrigues, A. L. ; <sup>2</sup> Garcia-Souza, É. P. \*\*; <sup>2</sup> Baeta Rodrigues, D. S. \*; <sup>2</sup> Nascimento, A. B. \*; <sup>2</sup> Barja-Fidalgo, C. ; <sup>2</sup> Freitas, M. S. ; <sup>1</sup> Farmacologia, UERJ; <sup>2</sup> Farmacologia e Psicobiologia, UERJ

**Objetivo:**

Estudos clínicos e experimentais têm demonstrado que o sobrepeso ao nascer e durante a fase inicial da vida pós-natal representa um fator determinante para a obesidade, distúrbios cardiovasculares e metabólicos. Visando elucidar os mecanismos moleculares envolvidos nas alterações metabólicas decorrentes da superalimentação no início da vida, investigamos neste trabalho os níveis plasmáticos de glicose e insulina e a expressão de proteínas-chave da cascata de sinalização desse hormônio em adipócitos de ratos adultos (90 dias) submetidos a superalimentação no período de lactação.

**Métodos e Resultados:**

Logo após o nascimento, foram distribuídos dez filhotes/fêmea lactante. Para induzir a superalimentação (grupo S), a ninhada é ajustada para 4 filhotes no 3º dia de lactação. O grupo controle (grupo C) permaneceu com dez filhotes/fêmea lactante até o desmame (21º dia). Foi coletado sangue por punção cardíaca para dosagem de insulina por radioimunoensaio e de glicose pelo método enzimático-colorimétrico. Foram isolados adipócitos de bolsas de gordura do

epidídimo desses animais e posteriormente as células foram incubadas com 100 nM de insulina para análise da sinalização da insulina por Western-Blotting.

O peso dos animais foi acompanhado durante o crescimento mostrando uma diferença significativa do grupo superalimentado quando comparado ao grupo controle. Essa diferença de peso é maior na idade de 21 dias (C: 37,6 g ± 4,1 e S: 52,4 g ± 7,7). Apesar da pequena diferença de peso entre os grupos aos 90 dias, observa-se que o grupo superalimentado apresenta maior quantidade de gordura epididimal quando comparado ao grupo controle (C: 3,6 g ± 0,9 e S: 5,3 g ± 1,1). Além disso, os níveis plasmáticos de glicose estão aumentados (C: 95,38 mg/dl ± 16,57 (n=8); S: 139,57 mg/dl ± 34,28 (n=8) ) e os de insulina não apresentam diferença significativa nessa idade (C: 56,1 uIU/ml ± 14,8 (n=9); S: 55,6 uIU/ml ± 17,2 (n=10) ) indicando o surgimento de resistência periférica a esse hormônio. No entanto, a expressão do IR e do IRS-1 não está alterada nos adipócitos do grupo superalimentado, em relação ao grupo controle.

**Conclusões:**

Esses dados sugerem que os animais submetidos à superalimentação no período de desenvolvimento podem programar alterações permanentes que determina a susceptibilidade a doenças crônicas na vida adulta.

20.070

EVALUATION OF INHIBITORY ACTION OF ORIGINAL SYNTHETIC COMPOUNDS DESIGNED AS P38 MAP KINASE INHIBITORS BY THE WESTERN BLOT TECHNIQUE <sup>1</sup> Quintas, L. E. M.; <sup>1</sup> Silva, G. M. S. D. <sup>\*\*</sup>; <sup>2</sup> Carvalho, F. M. <sup>\*</sup>; <sup>3</sup> Machado, A. L. <sup>\*\*</sup>; <sup>3</sup> Koatz, V. L. G. ; <sup>2</sup> Barreiro, E. J. ; <sup>2</sup> Lima, L. M. ; <sup>1</sup> Farmacologia Básica e Clínica ICB-UFRJ; <sup>2</sup> Fármacos LASSBIO UFRJ; <sup>3</sup> Bioquímica Médica UFRJ

**Objetivo:**

The p38 mitogen-activated protein (MAP) kinase is involved in the inflammatory process mainly by regulation of cytokine production/function and its activation blockade has been recognized as a fruitful therapeutic strategy, encouraging the design of new anti-inflammatory drugs. Here we present preliminary in vitro evaluation of novel ureidic derivatives as potential p38 inhibitors.

**Métodos e Resultados:**

Peritoneal unstimulated cells from 8-12 week-old Black6 mice were collected, washed with RPMI/bicarbonate medium and counted in Neubauer chamber. 10<sup>6</sup> Cells were put to adhere in 24 wells plates at 37°C for 1 h and then washed to obtain only adherent macrophages. These cultured cells were exposed to 1 µg/ml LPS in the presence or absence of different concentrations (1, 10, 100 and 1000 µM) of 4 derivatives named LASSBio-947, -948, -949 or -998, or the standard p38 inhibitor SB202190. After centrifugation, samples of the cytosolic (supernatant) fraction ran on 10% SDS-PAGE and were electrotransferred to nitrocellulose and incubated with primary (rabbit anti-mouse phospho-p38) and secondary (anti-rabbit HP) antibodies. In first round assays (see figure as typical assay), densitometric analysis of autoradiographs revealed: (1) LPS enhanced the density of phospho-p38 (active enzyme) (increase of 102% and 52%, n=2); (2) all molecules inhibited the formation of phospho-p38 in concentration-dependent fashion (% inhibition at 10µM: 947=49%; 948=49%; 949=50%; 998=51%, SB=100%, n=1). Replication of samples are under course to allow IC<sub>50</sub> estimation.

**Conclusões:**

Our findings demonstrate the possibility of in vitro pharmacological screening of novel compounds (in this case p38 MAP kinase inhibitors) using the Western blot technique.

20.071

EXTRACELLULAR CYCLIC AMP INDUCES ACTIVATION OF SKELETAL MUSCLE ADENYLYL CYCLASE VIA ADENOSINE AND G PROTEIN-DEPENDENT PATHWAYS. <sup>1</sup> Chiavegatti, T.; <sup>1</sup> Andrade Lopes, A. L.; <sup>1</sup> Torres, L. M. B. ; <sup>2</sup> Araújo, M. S. ; <sup>1</sup> Godinho, R. O. ; <sup>1</sup> Farmacologia, UNIFESP; <sup>2</sup> Bioquímica, UNIFESP

**Objetivo:** We have shown that intracellular production of cyclic AMP (cAMP) in skeletal muscle cells is followed by its efflux (Br J Pharmacol 138:995, 2003) and subsequent extracellular accumulation of adenosine (ADO; SBFTE p.99, 2004). Considering that skeletal muscle express ADO receptors coupled to stimulatory G protein (Gs), the present study evaluates the enzymatic

pathways involved in the extracellular degradation of cAMP and the physiological significance of resulting ADO formation.

**Métodos e Resultados:** The contribution of ectophosphodiesterase (ePDE) and ecto-5'-nucleotidase (e-NT) on extracellular degradation of cAMP was evaluated by incubating rat cultured skeletal muscles with 100µM exogenous cAMP ± DPSPX (ePDE inhibitor) or AMPCP (e-NT inhibitor), in Krebs containing 50µM uridine, 0.1µM iodotubercidine and 10µM EHNA (n=4-6). The cAMP and metabolites were quantified by radioassay and by HPLC, respectively. Incubation of cultures with cAMP for up to 30 min resulted in a time-dependent decrease of cAMP (0.20±0.13µM) and a proportional accumulation of ADO (4.02±0.48µM). Pre-incubation of cells with 30-100µM DPSPX inhibited the cAMP degradation, reducing by 42% the formation of ADO. The e-NT inhibitor AMPCP (30-80 µM) also reduced ADO generation by 36% to 63%. Besides, treatment of cells with 0.1, 1 or 100µM ADO for 15 min increased by 19%, 49% and 85%, respectively, the basal intracellular cAMP (74.27±2.81µM).

**Conclusões:** Our results show that cultured skeletal muscle fibers express ePDE that, together with e-NT, mediates the extracellular degradation of cAMP to AMP and formation of ADO, which in turn stimulates AC via Gs protein coupled receptors. These results indicate that ADO formed on extracellular space might influence the cAMP signaling at skeletal muscle initiated by neurotransmitters/hormones that activate G protein coupled receptors.

20.072

IMMUNOCYTOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF MUSCARINIC ACETYLCHOLINE RECEPTOR SUBTYPES IN RAT SPERMATOZOA. Marostica, E. ; Lucas, T. F. G. \*\* ; Porto, C. S. ; Farmacologia - Endocrino Exp., UNIFESP

**Objetivo:**

Acetylcholine receptor-like molecules have been described in sperm of different species (Zygote 3: 207, 1995). Furthermore, AChE-positive fibers have been found sorting out among epithelial cells and ending free upon the epithelial surface or into the tubular lumen of the cauda region of the epididymis (J Androl 23: 374, 2002), organ in which sperm undergoes final maturation and storage prior to ejaculation (Adv Exp Med Biol, 377: 87, 1995). These data suggest an action of cholinergic neurotransmitter on the sperm into the epididymal lumen. Thus, the aim of present study was to characterize the muscarinic acetylcholine receptors subtypes in the rat spermatozoa, by using immunocytochemical studies.

**Métodos e Resultados:** Spermatozoas were obtained from the cauda of the epididymis of male Wistar rats (120-day old) and separated by using Percoll gradient (40:80). After purification, they were fixed in slices with 2% formaldehyde and incubated in PBS containing 1% BSA and 0.01% saponin for 15 min. The immunocytochemistry was carried out using goat anti-mAChR subtypes (M1-M5) polyclonal antibodies (1:20) for 60 min at room temperature. The product of immune reactions was shown by incubating cells with Alexa Fluor 594-labelled anti-goat (1:300) for 45 min. The cellular localization was assessed by fluorescence microscopy. Spermatozoa showed a positive immunoreactivity for M1 subtype in the flagellum, M2 in the head and M3 in the neck and flagellum. The staining was abolished by exposure of slides to antibody pre-adsorbed with corresponding blocking peptides or when the primary antibody was omitted.

**Conclusões:** M1, M2 and M3, but not M4 and M5 muscarinic receptors subtypes are present in the rat spermatozoa. Further studies are necessary to clarify the function of these receptors in the male gamete. These studies can be important to new approaches in (in)fertility and/or male contraception.

20.073

IMMUNOLocalIZATION OF  $\alpha_1$ -ADRENOCEPTORS IN RAT AND HUMAN EPIDIDYMIS <sup>1</sup> Queiróz, D.B.C. ; <sup>1</sup> Porto, C. S. ; <sup>2</sup> French, F.S. ; <sup>2</sup> Grossman, G. ; <sup>2</sup> Petrusz, P. ; <sup>1</sup> Avellar, M. C. W. ; <sup>1</sup> Farmacologia - Endocrino Exp., UNIFESP; <sup>2</sup> Laboratories for Reproductive Biology, University of North Caroline at Chapel Hill

**Objetivo:** Previous results from our laboratory have shown immunolocalization of  $\alpha_{1A}$ -adrenoceptors (ADR) in smooth muscle cells and in intracellular compartments of epithelial cells from caput (CP) and cauda (CD) epididymidis from adult Wistar rat. In this study,

immunohistochemistry was used to further confirm cellular localization of  $\alpha_1$ -ADRs in rat and human epididymis.

**Métodos e Resultados:** Paraffin sections (6 mm) of CP and CD from adult Sprague-Dawley rats and humans (56-83 years) were used in immunohistochemical studies with two antibodies: ADR-A (against rat and human  $\alpha_{1A}$ -ADR) and ADR-1 (against a common epitope present in rat  $\alpha_{1A}$ -,  $\alpha_{1B}$ - and  $\alpha_{1D}$ -ADR). ADR-A staining was dispersed in the cytoplasm of epithelial cells from rat CP and CD. Smooth muscle cells and blood vessels from both tissues also presented a diffuse staining. ADR-1 antibody confirmed these data. Similar results were obtained for the ADR-A antibody in the epithelium from human CP while perinuclear staining was detected in the epithelium from human CD. Blood vessels and smooth muscle cells from human CP and CD were also stained. Rat and human vas deferens, used as positive controls, confirmed ADR-A stainings in epithelial and smooth muscle cells. ADR-A and ADR-1 stainings were reduced when antibody was preadsorbed with blocking peptide or recombinant human  $\alpha_{1A}$ -ADR, respectively.

**Conclusões:** This study confirms the intracellular expression of  $\alpha_1$ -ADR in epithelium from rat and human CP and CD. Since intracellular  $\alpha_1$ -ADR ligand binding sites have been described, further studies will be necessary to explore this epithelial staining in the epididymis.

20.074

ISOPROTERENOL ABRE CANAIS DE K EM CÉLULAS DE SERTOLI Zanini, R. ; Rodrigues, D.O. ; Jacobus, A.P. ; Loss, E. S. ; Wassermann, G. F.; Fisiologia, UFRGS

**Objetivo:**

No presente estudo nós investigamos através de qual mecanismo o isoproterenol hiperpolariza o potencial de membrana (PM) da célula de Sertoli de túbulos seminíferos de ratos com quinze dias de idade (imaturos). As modificações do potencial de membrana e da resistência foram analisadas usando microeletrodos de vidro intracelulares convencionais.

**Métodos e Resultados:**

Isoproterenol ( $2 \times 10^{-6} M$ ) induziu uma imediata e significativa hiperpolarização na membrana da célula de Sertoli. O antagonista  $\beta_2$ -adrenérgico, butoxamina ( $1 \times 10^{-6} M$ ) anulou a ação do isoproterenol. O antagonista  $\beta_1$ -adrenérgico metoprolol ( $1 \times 10^{-6} M$ ) teve um efeito menor sobre a ação do isoproterenol que não foi significativo.

A inibição dos canais  $K^+_{ATP}$  com a sulfoniluréia glibenclamida, suprimiu a ação do isoproterenol, e, testosterona, que despolariza o PM através do fechamento de canais  $K^+_{ATP}$  via PLC-PIP<sub>2</sub>, impediu a hiperpolarização produzida pelo agonista  $\beta$ -adrenérgico. Também polications, espermina e LaCl<sub>3</sub> reverteram o efeito hiperpolarizante do isoproterenol despolarizando o PM, provavelmente através de interações iônicas neutralizando a ação do agonista  $\beta$ -adrenérgico nos canais  $K^+_{ATP}$ .

O agonista da adenilato ciclase, forskolina ( $1 \times 10^{-7} M$ ) rapidamente hiperpolariza o PM da célula de Sertoli mimetizando o efeito do isoproterenol, DB-AMPC também hiperpolariza o PM. Estes efeitos indicam que o isoproterenol age nos canais  $K^+_{ATP}$  provavelmente envolvendo a cascata receptor  $\beta$ -adrenérgico/Gs/AC/AMPC/PKA.

**Conclusões:**

Sugerindo que a hiperpolarização induzida por isoproterenol é mediada pela abertura de canais  $K^+_{ATP}$  em células de Sertoli, esta hiperpolarização  $\beta$ -adrenérgica provavelmente tem um papel fisiológico na modulação do PM opondo-se a despolarização produzida pela testosterona através do fechamento destes canais  $K^+_{ATP}$ . (Horm. Metab. Res.; Abril *in press*)

20.075

MELATONIN (MEL) REDUCTION IN THE NUMBER OF NICOTINIC ACETYLCHOLINE RECEPTORS IN RAT MYOTUBES IS DUE TO INHIBITION OF NITRIC OXIDE SYNTHASE <sup>1</sup> Almeida-Paula, LD ; <sup>2</sup> Godinho, R. O. ; <sup>1</sup> Markus, R. P. ; <sup>1</sup> Fisiologia - IB, USP; <sup>2</sup> Farmacologia, UNIFESP

**Objetivo:** MEL reduces rat cerebellum nitric oxide synthase (NOS) activity and nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) number and efficacy (JCB 65:430, 1997; JPET 305:525, 2003). In rat myotubes, these proteins are co-localized in clusters and, membrane nAChR expression is up-regulated by ca-calmodulin activated NOS through downstream increase in cyclic GMP (Physiol Rev. 81:209, 2001). Considering that MEL inhibits calmodulin it was raised the hypothesis that MEL

could decrease the number of nAChRs in rat myotubes, by reducing cyclic GMP production, via inhibition of calmodulin.

**Métodos e Resultados:** Primary skeletal muscles cultures were obtained from hindlimb muscles of newborn rats. The number of nAChRs was measured by [<sup>125</sup>I]- $\alpha$ -bungarotoxin binding, and KCl (30 mM) or sodium nitroprusside (SNP, 30  $\mu$ M) effect on cyclic GMP content was determined by EIA (Biotrak, pmol/well). The experiments were done in the presence or absence of MEL (1 nM) or calmidazolium (CZ, 50  $\mu$ M). KCl increased cyclic GMP production ( $19.4 \pm 5.1$  to  $204 \pm 28.45$ , n=3, p<0.001), and both MEL ( $12.13 \pm 1.7$ , n=3, p<0.01) and CZ ( $16.3 \pm 0.6$ , n=3, p<0.001) blocked KCl effect. On the other hand, direct stimulation of cyclic GMP production by SNP ( $149.6 \pm 3.1$ , n=3) was not inhibited neither by MEL ( $153.2 \pm 18.65$ , n=3) nor by CZ ( $148.1 \pm 10.5$ , n=3). Regarding modulation of nAChRs MEL and CZ reduced the number of  $\alpha$ -bungarotoxin binding sites in 64.3% and 41.4%, respectively (control =  $4.9 \pm 0.3$  fmo/well, n= 5).

**Conclusões:** The present data show that MEL and CZ inhibit KCl-dependent activation of NOS and promoting a reduction in the number of nAChRs. Therefore, the data suggest that melatonin inhibits calmodulin in rat myotubes, and this could be the mechanism underneath the well known circadian variation of nAChRs at the neuromuscular junction.

20.076

MODULAÇÃO DA CARGA PARASITÁRIA NA INFECÇÃO POR LEISHMANIA AMAZONENSIS MEDIADA POR NUCLEOTÍDEOS EXTRACELULARES. Chaves, S. P. ; Torres-Santos, E.C. ; Persechini, P. M. ; Rossi-Bergmann, B. ; Coutinho-Silva, R.; IBCCF-UFRJ

**Objetivo:**

Receptores purinérgicos são uma família de receptores ativados por nucleotídeos tais como ATP e UTP, expressos em uma variedade de células do sistema imune e hematopoiético, que possuem papel importante na resistência à microorganismos intracelulares tais como clamídia e micobactéria. Nosso grupo buscou avaliar o papel dos receptores P2 na infecção por *Leishmania amazonensis* usando agonistas e antagonistas dos mesmos.

**Métodos e Resultados:**

Camundongos BALB/c infectados na pata com *L. amazonensis* foram tratados na lesão 2x/semana, durante 3 semanas, com PBS (20  $\mu$ l), agonista de P2X e P2Y (ATP, 50mM), antagonista do P2X<sub>7</sub>R (ATP oxidado = oxATP, 1mM) + ATP (50mM), oxATP (1mM) ou agonista de P2YR (UTP, 5mM). Observamos que após 86 dias de infecção, o ATP, o UTP e o oxATP reduziram em torno de 20, 80 e 16000 vezes, respectivamente a carga parasitária em relação ao controle (PBS). A co-administração de ATP com oxATP apresentou uma redução da carga parasitária de 250 vezes em relação ao ATP. *In vitro*, macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c foram infectados com *L. amazonensis*, previamente deixados em repouso por 48 horas antes da adição por 30 min de ATP (0.5mM), oxATP (0.3mM), UTP (0.1mM) ou PBS. As células ficaram em repouso por mais 48 horas e após coloração com Giemsa, o número de amastigotas intracelulares foi contado em microscópio: PBS  $214 \pm 118.8$ , ATP  $361 \pm 89.1$ , UTP  $266.5 \pm 72.8$  e oxATP  $250.5 \pm 6.3$  (n=3).

**Conclusões:**

ATP, oxATP e UTP demonstraram atividade anti-leishmania no tratamento *in vivo* de camundongos infectados, indicando que a mesma pode ocorrer através de P2XR ou P2YR. No entanto, não observamos o mesmo efeito *in vitro*, sugerindo que a interação com o microambiente da infecção é necessária para o efeito anti-leishmanicida dos nucleotídeos. Os dados sugerem que os receptores purinérgicos podem ser potenciais alvos terapêuticos para a leishmaniose.

20.077

PARTICIPAÇÃO DO CA<sup>2+</sup> INTRACELULAR NA SINALIZAÇÃO DAS CÉLULAS INDIFERENCIADAS DA MEDULA ÓSSEA QUANDO ESTIMULADAS POR CITOCINAS. Paredes-Gamero, E. J. ; Oshiro, M. E. M. ; Ferreira, A. T.; Biofísica, UNIFESP

**Objetivo:**

A medula óssea (MO) é o local onde a célula-tronco hematopoiética (CTH) permanece quiescente, divide-se e diferencia-se; este processo é chamado de hematopoiese. Neste trabalho pretende-se ver se as citocinas, principais controladores da hematopoiese, mobilizam o Ca<sup>2+</sup> intracelular (Ca<sup>2+</sup><sub>i</sub>) e se o Ca<sup>2+</sup><sub>i</sub> participa na sinalização da hematopoiese.



### **Métodos e Resultados:**

Para determinar se as citocinas movimentam o cálcio intracelular, seus efeitos foram medidos por microscopia confocal em dois planos Z diferentes nas áreas proliferativas em cultura de MO de camundongos C57BL6; sendo as medidas de  $Ca^{2+}_i$  realizadas com o fluoróforo fluo-3. As células estromais (mais profundas) e as células hematopoiéticas indiferenciadas (mais superiores) das áreas proliferativas foram responsivas a fator de célula-tronco, às interleucinas 3 (IL-3) e 6, e ao G-CSF. A IL-3 promoveu aumentos localizados de  $Ca^{2+}$  e migração celular. Também foi registrada a passagem de  $Ca^{2+}$  entre as células hematopoiéticas e o estroma, e a presença da Cx43 (principal proteína que forma junções comunicantes) nas áreas proliferativas. Em culturas de em agar semi-sólido foram testados os inibidores das vias de sinalização de  $Ca^{2+}$  (TMB-8 inibidor inespecífico da liberação de  $Ca^{2+}$ ; U73122 inibidor da PLC; 2APB inibidor do receptor de IP3; e o quelante de  $Ca^{2+}$  EGTA). A presença destes inibidores no agar suplementado com IL-3 reduziu o número de colônias: controle ( $6\pm 1$ ); inibidores, TMB-8 ( $2\pm 1$ ); U73122 ( $0,5\pm 0,3$ ); 2APB ( $2\pm 2$ ); EGTA ( $3\pm 0,1$ ), média $\pm$ SEM, n=3 realizados em quadruplicata.

### **Conclusões:**

Estes dados demonstram que as citocinas aumentam a concentração de  $Ca^{2+}_i$  e a presença e participação de junções comunicantes nestes aumentos. Como também a provável participação do  $Ca^{2+}_i$  na formação de colônias.

20.078

ENVOLVIMENTO DE PKA E RHO GTPASES NA MODULAÇÃO DA ADESÃO CÉLULA-CÉLULA E DO CITOESQUELETO DE ACTINA EM CÉLULAS CACO-2 <sup>1</sup> Leve, F. <sup>\*\*</sup>; <sup>1</sup> Oliveira, S. S. ; <sup>2</sup> W, D. S. ; <sup>3</sup> Soares, MJ ; <sup>1</sup> Morgado-Díaz, J. A. ; <sup>1</sup> Biologia Celular, INCa-RJ; <sup>2</sup> IBCCF-UFRJ; <sup>3</sup> UBC, FIOCRUZ

### **Objetivo:**

A retirada de cálcio do meio extracelular ocasiona desorganização do complexo juncional bem como perda da sua função de barreira em células epiteliais. Esse processo é reversível e, através da utilização de inibidores específicos de moléculas de sinalização intracelular, é possível investigar os mecanismos envolvidos na perda da adesão célula-célula, evento importante na desagregação celular, primeira etapa na metástase. Também é importante a análise do citoesqueleto de actina, visto que o complexo juncional encontra-se ancorado a essa estrutura, e que moléculas de sinalização envolvidas na modulação da adesão célula-célula estão relacionadas a alterações no citoesqueleto de actina. Esse estudo visa identificar as vias de sinalização envolvidas na organização do complexo juncional e correlacioná-las às alterações do citoesqueleto de actina na aquisição de um fenótipo tumoral.

### **Métodos e Resultados:**

Os experimentos foram realizados usando uma linhagem celular de adenocarcinoma de cólon humano, Caco-2, através do modelo de quelação do cálcio extracelular. Os ensaios de imunofluorescência mostraram que as proteínas de junções tight (TJs), ocludina, claudina-1, e ZO-1 em baixo cálcio foram redistribuídas dos contatos juncionais para o citoplasma, efeito prevenido pelo inibidor de PKA, H-89. A medição da resistência elétrica transepitelial (TER) mostrou que o aumento da permeabilidade celular decorrente da retirada do cálcio também pode ser prevenido com H-89, assim como os grandes espaços intercelulares visualizados por microscopia eletrônica. O fracionamento celular usando Triton X-100, seguido por imunoblotting, mostrou que a retirada do cálcio ocasiona translocação entre as frações das proteínas E-caderina, de junção aderente (AJ) e claudina-1 (de TJ) em relação ao controle, sendo esse efeito de translocação parcialmente prevenido pelo H-89. As proteínas ocludina e ZO-1 não mostraram diferenças nas suas distribuições. O citoesqueleto de actina, monitorado por fluorescência, apresentou alteração com a retirada do cálcio, efeito também prevenido pela inibição de PKA. A participação de Rho, uma GTPase moduladora do citoesqueleto de actina, foi avaliada por imunoblotting através do tratamento com Y-27632, um inibidor de ROCK, proteína efetora de Rho. A inibição de ROCK ocasionou aumento na quantidade de E-caderina na fração insolúvel em meio normal e, em baixo cálcio, preveniu parcialmente o efeito de redistribuição de E-caderina da fração insolúvel para a fração solúvel; para claudina-1, no entanto, a inibição de ROCK em meio normal ocasionou efeito semelhante ao do baixo cálcio.

**Conclusões:** Assim, foi mostrado que diferentes mecanismos podem estar modulando junções aderentes e tight nesta linhagem celular. Em conclusão, foi identificada a participação de PKA e ROCK na perda de adesão e nas modificações do citoesqueleto. A identificação de moléculas alvo nesse contexto contribuirá para o entendimento de mecanismos tumorigênicos e metastáticos para futuras aplicações terapêuticas.

20.079

AÇÃO DA TESTOSTERONA SOBRE OS CANAIS DE  $K^{+}_{ATP}$  NA MEMBRANA DE CÉLULAS DE SÉRTOLI OCORRE ATRAVÉS DA VIA PLC-PIP<sub>2</sub>. <sup>1</sup> Amaral, F. D. \*; <sup>1</sup> Rodrigues, D.O. \*; <sup>2</sup> Jacobus, A.P. \*\*; <sup>1</sup> Loss, E. S. ; <sup>1</sup> Wassermann, G. F. ; <sup>1</sup> Fisiologia, UFRGS; <sup>2</sup> Fisiologia, UFMG

**Objetivo:** Concentrações fisiológicas de testosterona induzem despolarização dose-dependente e aumento da resistência da membrana de células de Sertoli de ratos imaturos. O objetivo deste trabalho foi avaliar o envolvimento dos canais K sobre o mecanismo de ação da testosterona, já que as sulfoniluréias glibenclamida e tolbutamida têm ação semelhante de despolarizar a membrana destas células.

**Métodos e Resultados:**

Foram investigadas as mudanças nos parâmetros eletrofisiológicos em membranas de células de Sertoli em túbulos seminíferos isolados. Foi utilizada a técnica de registro intracelular, onde era medido o potencial de membrana e a resistência da membrana após aplicação de pulso hiperpolarizante. Os túbulos eram colocados em uma câmara de perfusão com Krebs Ringer bicarbonato (KRb) a 32 °C e pH 7,4. Foi feita a aplicação tópica da testosterona e das sulfoniluréias sobre a célula registrada e/ou perfusão com substâncias bloqueadoras. A testosterona produziu, em doses fisiológicas, despolarização da membrana e aumento da resistência da membrana de células de Sertoli, assim como as sulfoniluréias glibenclamida e tolbutamida. O inibidor da fosfolipase C (PLC), U73122, bloqueou completamente a ação despolarizante da testosterona, O inibidor da proteína G, toxina pertussis, também teve efeito de diminuir a ação despolarizante da testosterona.

**Conclusões:** Estes resultados indicam que a testosterona atua através de um receptor que envolve proteína G o qual estimula a PLC produzindo a hidrólise do fosfatidil-inositol-bisfosfato (PIP) que fecha o canal K e despolariza a membrana. (Horm. Metab. Res. 2004; 36:519-525)