

- Comunicação celular

22.001

MODULATION OF THE INTERCELLULAR COMMUNICATION IN MACROPHAGE CELL LINES BY TREATMENT WITH PRO-INFLAMMATORY FACTORS. ¹Fortes, F. S. A.; ¹Azevedo-Fortes, F. S.; ¹Leite, D. H. B.; ¹Coutinho-Silva, R.; ¹Persechini, P. M.; ³Savino, W.; ¹Campos de Carvalho, A. C.; ²Goldenberg, R. C. S. ¹IBCCF, UFRJ; ²Biofísica CCS-UFRJ; ³Imunologia, FIOCRUZ

Objetivo:

The innate immune system provides the first line of defense against pathogen infection and consists mainly of phagocytic cells. Nowadays, there is an increasing evidence for the implication of connexins during inflammation. Previous studies from our group have identified functional connexin43 (Cx43) in Peritoneal Macrophages and J774-G8 cells, a macrophage derived cell line (Fortes FSA et al, *J Cell Sci*, 117 (20), 4117-4126, 2004). These cells display important functions in immune system and produce pro-inflammatory factors for immune response in diseases. We therefore used functionally coupled J774-G8 cells to investigate a possible modulation of the gap junctions by treatment with pro-inflammatory factors involved in immune response.

Métodos e Resultados:

To study junctional communication we assessed cell-to-cell communication by microinjecting Lucifer Yellow. Confluent cultures of J774-G8 cells were treated with LPS (1 µg/mL), TNF-α (10 ng/mL), IFN-γ (10 ng/mL), LPS + TNF-α and TNF-α + IFN-γ, and the dye coupling studies were performed 24, 48 and 72 hours after each treatment. The 24 hours of treatment with LPS + TNF-α and TNF-α + IFN-γ produced an increase in coupling between J774-G8 cells, whereas treatment with only LPS, TNF-α and IFN-γ fail to do so. After 48 hours of treatment, a further increase in the dye coupling was observed. However, after 72 hours of the treatment, coupling returns to the normal levels.

Conclusões:

These results suggest that pro-inflammatory factors modulate gap junctions, which could be related to immune responses involving macrophages.

22.002

PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE "SECTION LOADING" PARA O ESTUDO DO PAPEL FUNCIONAL DE JUNÇÕES COMUNICANTES TIPO "GAP" EM PREPARAÇÕES DE FÍGADO *EX VIVO*. Costa, S. O.; Paz, A. C. C.; Nihei, O. K.; Alves, L. A. Imunologia FIOCRUZ

Objetivo:

Padronizar a técnica de "section loading" em preparações de fígado *ex vivo* para investigar a presença e funcionalidade da comunicação intercelular mediada por junções do tipo "gap" (CIJG), e a importância fisiológica dessas junções no órgão.

Métodos e Resultados:

Para os nossos ensaios utilizamos o fígado do camundongo (C57BL/6 - 3 a 4 semanas), que foi seccionado, ainda fresco, na região de interesse, e incubado com PBS contendo dois corantes, o amarelo de Lucifer (LY), de baixo peso molecular, e a rodamina isotiocianato dextrana (RITC-DX), de alto peso molecular. O tecido foi fixado e seccionado (5 µm) transversalmente na região de corte, e analisado por microscopia de fluorescência. Nessa padronização, avaliamos diferentes tempos de incubação e diferentes bloqueadores de junções tipo "gap". Após 5 minutos, verificamos difusão significativa de LY, mas não de RITC-DX, nas regiões seccionadas. Nas regiões onde o tecido foi preservado (sem lesão celular), essa transferência de corante não foi observada. Além disso, observamos que o tratamento prévio do tecido com diferentes bloqueadores de junções tipo "gap", i.e., "carbenoxolona" ou ácido "glicirético", foi capaz de inibir a transferência de LY através do órgão, demonstrando a participação da CIJG no processo.

Conclusões:

Neste trabalho, pela primeira vez, utilizando a técnica de "section loading", demonstramos a presença e funcionalidade das junções do tipo "gap" em preparações de fígado *ex vivo* o que permitirá um estudo mais detalhado das funções atribuídas às junções comunicantes neste órgão; pois grande parte da estrutura tridimensional é preservada.

22.003

CARACTERIZAÇÃO DA COMUNICAÇÃO INTERCELULAR MEDIADA POR JUNÇÕES TIPO "GAP" EM PREPARAÇÕES DE TIMO *EX VIVO*: ANÁLISE ATRAVÉS DA TÉCNICA DE "SECTION LOADING". Costa, S. O. *Imunologia FIOCRUZ*

Objetivo:

No timo pouco se conhece sobre a presença e funcionalidade da comunicação intercelular mediada por junções tipo "gap" (CIJG) *in vivo*. Neste trabalho, investigamos a CIJG em preparações de timo *ex vivo*, através da técnica de "section loading".

Métodos e Resultados:

O órgão investigado é retirado do camundongo (C57BL/6 de 3 a 4 semanas), seccionado ainda fresco na região de interesse e incubado por diferentes intervalos de tempo em uma solução contendo dois corantes: amarelo de lucifer (LY), de baixo peso molecular, e rodamina dextrana (RD), de alto peso molecular. O tecido é fixado, seccionado transversalmente na seção de corte, tratado com DAPI e analisado por microscopia de fluorescência. Avaliamos a presença de CIJG no timo, onde observamos a difusão de LY e não de RD através do parênquima. Além disso, o tratamento prévio do timo com carbenoxolona, um bloqueador de junção tipo "gap", foi capaz de inibir parcialmente a difusão de LY no tecido sugerindo a participação da CIJG no processo. Também observamos que a marcação de LY coincide, em muitos casos, com a de DAPI, indicando que o LY encontra-se no interior de estruturas celulares. A análise por microscopia confocal evidenciou a presença de prolongamentos de membrana nas células marcadas com LY e várias possíveis regiões de possível contato intercelular, que possibilitariam a difusão do corante através do tecido.

Conclusões:

Em conjunto, nossos dados sugerem que células presentes no parênquima tímico estabelecem CIJG funcionais, constituindo a primeira descrição deste tipo de comunicação em preparações de timo *ex vivo*.

22.004

EFEITO MODULATÓRIO DA AMPC, PKC E ADRENALINA SOBRE A COMUNICAÇÃO INTERCELULAR MEDIADA POR JUNÇÕES TIPO "GAP" ENTRE CÉLULAS EPITELIAIS TÍMICAS. ¹Nihei, O. K.; ¹Fonseca, P. C.; ²Campos de Carvalho, A. C.; ³Spray, D. C.; ¹Savino, W.; ¹Alves, L.A.; *Imunologia FIOCRUZ*; ²Biofísica CCS-UFRJ; ³Neurosciences Albert Einstein College of Medicine

Objetivo:

Investigar os efeitos modulatórios de diferentes moléculas sinalizadoras intracelulares sobre a comunicação mediada por junções tipo "gap" (CIJG) entre células epiteliais tímicas (TECs).

Métodos e Resultados:

A CIJG foi avaliada em células IT76-M1, através de técnicas de transferência de corante, i.e., ensaio de microinjeção de Lucifer Yellow e ensaio de transferência de calceína por citometria de fluxo. Os efeitos da AMPc e da ativação de PKC foram investigados usando-se 8-Br-cAMP e "forskolina", e forbol 12- miristato 13-acetato (PMA), respectivamente. O tratamento com 8-Br-cAMP ou forskolina aumentou em até 3 vezes a transferência de corante entre as células IT76-M1. O EC₅₀ obtido foi de 98 μ M e 0,470 μ M, respectivamente. Em contraste, o tratamento com PMA (10 e 100 ng/mL) inibiu em até 60% a CIJG nas células IT76-M1. O tratamento com ácido 18- α -glicirretínico (100 μ M), um inibidor de junções tipo "gap", bloqueou a transferência de corante, demonstrando a participação da CIJG no evento. A adrenalina (100nM), um ativador endógeno em potencial de AMPc nas TECs, induziu um aumento de até 20% na CIJG entre células IT76-M1. O isoproterenol (100nM), um agonista β -adrenérgico, promoveu o mesmo efeito. Ambos os efeitos, foram completamente inibidos pelo propranolol, um antagonista β -adrenérgico.

Conclusões:

AMPc e PMA modulam diferentemente a CIJG nas TECs, e a adrenalina, através de receptores β -adrenérgicos, estimula a CIJG entre essas células. O que sugere uma nova função para a participação desses receptores na fisiologia tímica.

22.005

INIBIÇÃO DE JUNÇÕES COMUNICANTES (JC) ENTRE CÉLULAS TRONCO HEMATOPOIÉTICAS E MO INIBEM A FORMAÇÃO DE COLÔNIAS DE PROGENITORES

PRIMITIVOS (CAFC). ¹Paraguassú-Braga, F. H.; ²Bonomo, A. C. ¹Centro Nacional de Transplante de Medula Óssea INCa; ²Divisão de Medicina Experimental INCa

Objetivo:

Avaliar a presença de junções comunicantes funcionais em um modelo de desenvolvimento hematopoiético in vitro; Avaliar a influência da inibição das JC na manutenção de progenitores hematopoiéticos do tipo CAFC.

Métodos e Resultados:

Um modelo de desenvolvimento hematopoiético foi estabelecido utilizando-se uma linhagem de estroma de medula óssea humana imortalizada com a porção ativa da telomerase humana (hBMS HTERT+). Sobre esse estroma é semeada a fração mononuclear de sangue de cordão umbilical (SCU), em meio para cultura do tipo longa duração. Para avaliar a presença de junções comunicantes funcionais entre as células de estroma e as células-tronco de SCU, o estroma é previamente tratado com corante fluorescente Calceína, que se restringe ao citoplasma e só é passível de transferência para outras células via canais de JC. As células de SCU são então cultivadas sobre o estroma por 72h, sendo então recolhidas por dissociação enzimática e marcadas para CD45(PERCP) e CD34(PE) e analisadas por citometria de fluxo. A análise citofluorimétrica das populações de células tronco (CD45+/CD34+) revelou que cerca de 90% das células tronco estão acopladas funcionalmente com o estroma (calceína positiva). Para avaliar a influência do acoplamento por junções comunicantes na hematopoiese, células de SCU foram cultivadas, em diluição limitante, sobre o estroma, na presença ou ausência de carbenoxolone, um inibidor genérico do acoplamento. As culturas são assim mantidas por 5 semanas, com reposição semanal de 50% do meio. Ao final desse período, cada poço é avaliado pela presença de unidades formadoras de colônia tipo CAFC, e calculado a frequência desses progenitores mediante software específico (Lcalc). A quantificação desses progenitores cultivados sobre estroma contendo agente inibidor do acoplamento demonstrou uma redução significativa (10x) na manutenção desse tipo de progenitor, caindo de 917/milhão para 92/milhão.

Conclusões:

Anteriormente, havíamos demonstrado que a interação entre células hematopoiéticas e estroma de MO via JC mantinha as células quiescentes, apontando para um papel sobre a manutenção da célula tronco, em modelo utilizando linhagens leucêmicas. Neste trabalho mostramos que células progenitoras, CD34+, provenientes de Sangue de Cordão Umbilical, realizam comunicação funcional com o estroma em alta frequência. Ensaio funcionais de avaliação de progenitores utilizando ensaios de CAFC (progenitores muito primitivos) mostram claramente o papel as junções comunicantes na manutenção de progenitores mais primitivos, já que na presença de inibidor de JC, há uma redução de 90% na geração de CAFC.

22.006

EFEITOS DA ABLAÇÃO DO CÓRTEX VISUAL SOBRE A EXPRESSÃO DE RECEPTORES GLUTAMATÉRGICOS DO TIPO AMPA. Brito, I.; Britto, L. R. G. Fisiologia e Biofísica ICB I-USP

Objetivo:

Como parte de um projeto que visa estudar a neuroplasticidade pós-lesão, avaliamos neste trabalho os efeitos plásticos da remoção das aferências corticais glutamatérgicas sobre a expressão de receptores glutamatérgicos do tipo AMPA (GluRs) no complexo geniculado lateral e colículo superior de camundongos C57Bl/6 machos adultos.

Métodos e Resultados:

Os camundongos foram anestesiados para serem submetidos à desferentação por meio de ablação unilateral do córtex visual, e após diferentes intervalos de tempo pós-lesão foram perfundidos sob anestesia profunda. Seus encéfalos foram fixados e cortados para processamento imuno-histoquímico e análise da imunoreatividade para os GluRs e para a proteína fibrilar glial (GFAP). Não houve diferença na expressão das subunidades GluR2/3 e GluR1 no colículo superior após os diferentes intervalos pós-lesão, enquanto que no complexo geniculado lateral foi observada uma diminuição marcante da expressão de GluR2/3 na porção dorsal em todos os intervalos pós-lesão. Além disso, foi observado um aumento de neurônios imunorreativos para GluR1 no núcleo geniculado dorsal em todos os intervalos pós-lesão analisados. A expressão de GFAP encontra-se aumentada, confirmando a existência de processo neurodegenerativo.

Conclusões:

Os dados sugerem que as subunidades GluR2/3 e GluR1 são reguladas distintamente após a desaferentação cortical glutamatérgica. A expressão da subunidade GluR1 parece sofrer uma regulação positiva em todos os intervalos pós-lesão, enquanto que para GluR2/3 a regulação é negativa. Essas alterações podem evidenciar a participação dessas subunidades em ajustes plásticos pós-lesão.

22.007

REGULAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS LEUCÊMICAS VIA JUNÇÕES COMUNICANTES COM O ESTROMA DE MEDULA ÓSSEA DE CAMUNDONGO. ¹Fonseca, A.C.C.; ²Paraguassú-Braga, F. H.; ¹Bonomo, A. C. ¹Divisão de Medicina Experimental INCa; ²Centro Nacional de Transplante de Medula Óssea INCa

Objetivo: Estudar as interações celulares na medula óssea (MO) leucêmica, em particular, avaliar o papel das junções comunicantes (JC) na proliferação e manutenção da célula tronco leucêmica, em modelo murino para posterior estudo *in vivo*.

Métodos e Resultados:

Células de LMA murina, C1498 foram cocultivadas com S17 como estroma de MO. Para avaliar a proliferação leucêmica, células da linhagem C1498 foram cultivadas na presença e na ausência de S17 e a contagem de células viáveis foi feita pela utilização de MTT. Com o intuito de avaliar, simultaneamente, a proliferação e o acoplamento via junções comunicantes dessas populações leucêmicas, estas foram tratadas com um corante para acompanhamento da divisão celular (PKH 26 red) e cultivadas na presença e na ausência de estroma de medula óssea tratado com calcêina, um corante permeável somente através de junções comunicantes. O cocultivo de células leucêmicas com o estroma de medula óssea levou a uma redução percentual da proliferação total de aproximadamente 33% em relação ao controle. Constatou-se ainda a existência de uma população de células leucêmicas quiescentes acopladas à medula óssea. Após 3 dias de cocultivo, as células não-acopladas apresentaram índice de divisão celular (DI) de 1,7 em relação ao controle (sem estroma). Em contraste, as células acopladas apresentaram DI de 0,7 em relação ao mesmo controle.

Conclusões:

Em modelo murino a interação entre progenitores leucêmicos e o estroma de medula óssea, via junções comunicantes, leva a uma inibição da proliferação desses progenitores, confirmando nossa sugestão anterior, em estudos com células humanas, de que haja um papel destas interações na manutenção da célula tronco. Neste momento, estamos investigando esta hipótese, através de ensaios funcionais e estudos *in vivo*.

22.008

EXPRESSION AND ACTIVITY OF SOLUBLE GUANYLATE CYCLASE IN HUMAN EOSINOPHILIC CELL LINE. ¹Thomazzi, S. M.; ²Oliveira-Jr, E. B.; ²Rehder, J.; ¹Donato, J. L.; ²Condino-Neto, A.; ¹De Nucci, G.; ¹Antunes, E. ¹Farmacologia, UNICAMP; ²Pediatria UNICAMP

Objetivo:

Soluble guanylate cyclase (sGC) is a heterodimer consisting of a and b chains. Activation of sGC catalyzes the conversion of GTP to cyclic GMP, which is involved in a variety of physiological processes. The compound BAY 41-2272 has been described as an activator of the sGC by mechanisms independent of nitric oxide. In human eosinophils *in vitro*, BAY 41-2272 elevates the cGMP levels and inhibits the cell chemotaxis (Biochem Pharmacol 69:875, 2005). In this study we have studied the expression of the sGC subunits in a human eosinophilic lineage (HL-60), and investigated the effects of BAY 41-2272 on cGMP levels and chemotaxis in this cell line.

Métodos e Resultados:

Cells of the human promyelocytic HL-60 clone 15 lineage were incubated with 0.5 mM of butyric acid for 7 days to differentiate to mature eosinophils. The presence and expression to the a₁ and b₁ sGC subunits were determined by the Western Blotting and RT-PCR techniques. The cGMP levels were measured using an enzyme immunoassay kit and the chemotaxis was performed using a microchemotaxis chamber. The presence of a₁ and b₁ sGC subunits with bands at 77.2 and 70.8 kDa, respectively, has been detected. In addition, we identified mRNA variants to both sGC subunits with size of 317 and 375 pb, respectively. Exposition (90 min) of eosinophilic cells to BAY 41-2272 increased the cGMP levels (2.3±0.2 nM/1.5x10⁶ cells for control; 2.7±0.2, 3.0±0.1 and

3.8±0.2 nM/1.5x10⁶ cells for 0.1, 1 and 10 mM BAY 41-2272, respectively; *P*<0.01; N=3) and inhibited the fMLP-induced cell chemotaxis (24, 39 and 43 % inhibition for 0.1, 1 and 10 mM BAY 41-2272, respectively; *P*<0.01; N=3).

Conclusões:

The human eosinophilic cell line presents a₁ and b₁ sGC subunits and expresses mRNA variants for these two subunits. Elevation of cGMP levels by BAY 41-2272 is accompanied by chemotaxis inhibition.

22.009

EXPRESSÃO DA ISOFORMA NEURONAL DA ÓXIDO NÍTRICO SINTASE APÓS DESAFERENTAÇÃO RETINIANA E TRANSECÇÃO DO NERVO CIÁTICO. Chacur, M.; Matos, R. J. B.^{***}; Batista, S. S.^{**}; Britto, L. R. G. Biofísica e Fisiologia ICB I-USP

Objetivo:

O óxido nítrico (NO) é um mediador gasoso com diversas funções biológicas no sistema nervoso central, incluindo neurotransmissão, plasticidade sináptica e memória, além de exercer um importante papel na neuroproteção e em processos neurodegenerativos. O objetivo deste trabalho é o de avaliar a regulação do sistema nitrinérgico na neurodegeneração, utilizando-se modelos de lesão de retina e do nervo ciático, e medindo-se a expressão da isoforma neuronal da óxido nítrico sintase (nNOS) em áreas visuais e na medula espinhal, respectivamente.

Métodos e Resultados:

Ratos Wistar, machos adultos, foram anestesiados e submetidos a enucleação unilateral ou transecção do nervo ciático. Após tempos de sobrevivência variados, os animais foram anestesiados profundamente, e perfundidos com salina e posteriormente com paraformaldeído (4%) para procedimentos de imuno-histoquímica. Para os procedimentos de *Western Blot*, os animais foram sacrificados rapidamente por deslocamento cervical e as áreas relacionadas com o sistema visual e a medula espinhal lombar coletadas e armazenadas para posterior análise. Tanto o colículo superior como o núcleo geniculado lateral dorsal apresentaram aumento do número de células marcadas para nNOS 7, 14 e 30 dias após a lesão retiniana. Este aumento da expressão de proteína para nNOS no colículo superior e tálamo foi confirmado por *Western Blot*. Na medula espinhal houve um aumento do número de células marcadas para nNOS no corno dorsal da medula espinhal e ao redor do canal central no lado experimental, e experimentos preliminares com *Western Blot* parecem confirmar estes dados.

Conclusões:

Nossos resultados sugerem um aumento da expressão de nNOS após lesão retiniana e/ou do nervo ciático, que pode estar relacionado com a função neuroprotetora do óxido nítrico e seu possível papel na plasticidade sináptica.

22.010

14-3-3 EPSILON MODULATES THE STIMULATED SECRETION OF ENDOPEPTIDASE 24.15. Carreño, F. R.^{**}; Goñi, C. N.^{*}; Castro, L. M.; Ferro, E. S. Biología Celular e do Desenvolvimento USP

Objetivo:

Endopeptidase 24.15 (EC 3.4.24.15; ep24.15), a secreted protein involved in peptide metabolism, is unusual in that it does not contain a signal peptide sequence. In this work, we describe the physical interaction between ep24.15 and 14-3-3 epsilon, one isoform of the ubiquitous phosphoserine/threonine-scaffold proteins family that organizes cell signaling and is involved in exocytosis.

Métodos e Resultados:

The interaction between ep24.15 and 14-3-3 was analyzed both *in vitro* and in cell culture. *In vitro*, the physical interaction between ep24.15 and 14-3-3 increased following phosphorylation of ep24.15 at Ser⁶⁴⁴ by protein kinase-A (PKA). The co-localization of ep24.15 and 14-3-3 was also increased by exposure of HEK293 cells to forskolin (10 µM). Overexpression of 14-3-3 epsilon in HEK293 cells almost doubled the secretion of ep24.15 stimulated by A23187 (7.5 µM) from 10% (1.4 ± 0.24 AFU/min/10⁶ cells) to 19% (2.54 ± 0.24 AFU/min/10⁶ cells) (*p* < 0.001) of the total intracellular enzyme activity. Treatment with forskolin had a synergistic effect on the A23187-

stimulated secretion of ep24.15 that was totally blocked by the PKA inhibitor KT5720. The ep24.15 point mutation S644A reduced the co-localization of ep24.15 and 14-3-3 in stably transfected HEK293 cells.

Conclusões:

We have demonstrated that the interaction between ep24.15 and 14-3-3 has a critical role in regulating the stimulated secretion of ep24.15. We have also shown that the unconventional pathway of ep24.15 secretion shares more similarities than differences with that of signal peptide-containing proteins. However, it remains to be determined how this enzyme crosses the plasma membrane without been located within secretory vesicles.

22.011

PKC ACTIVATION INHIBITS HERPES SIMPLEX VIRUS TYPE-1 REPLICATION IN VITRO.

¹Souza, T. M. L.; ²Araújo, E. G.; ³Fontes, C. F. L.; ⁴Frugulhetti, I. C. P. P. ¹Bioquímica ICB-UFRJ; ²Neurobiologia UFF; ³Bioquímica Médica ICB-UFRJ; ⁴Bioquímica UFF

Objetivo:

Studies regarding HSV-1 entry into the cell focused on receptors mediating such process. HSV-1 entry is associated with an intracellular calcium increase. Considering that normally during HSV-1 entry Phosphatidylserine (PS) and Diacylglycerol (DAG) are present in the internal face of the membrane, the conditions necessary for activation of both classical and novel isoforms of protein kinase C (PKC) are present. The aim of this work was to evaluate the effect of PKC activation during HSV-1 replication.

Métodos e Resultados:

To analyze the effect of PKC upon HSV-1 replication we infected Vero cell in the presence PMA-an DAG analog. We also used an inhibitor of PKC, chelerythrine chloride (CC). After 48h viral plaque formation was measured. Our results show that treatment with 1ng/mL PMA inhibited HSV-1 replication (90%). This effect was totally abolished by 1,25 μ M CC and by an inhibitor of p38. In the presence of PMA, yield reduction assay of HSV-1 indicated a reduction of HSV-1 titers(1000-fold). Treatment with Bryostatin I (an activator of novel PKC isoforms) had no effect on HSV-1 replication. Time-of-addition assay showed that inhibition occurs during HSV-1 entry. Treatment with PMA induced a reduction in HSV-1-related proteins. To analyze the role of cytokines on HSV-1 infection we studied the effect of both 50U/mL IL-2 and 50U/mL IL-4. We observed that treatment with IL-4, but not with IL-2, inhibited HSV-1 replication (85%). The IL-4 effect was abolished when cells were treated with CC. We also studied the effect of interleukins on the infection of retinal cell cultures by HSV-1 and observed that IL-4 inhibited virus replication.

Conclusões:

Our results indicate that HSV-1 infection involves an inhibition of PKC since activation of this enzymes by PMA protects cells. In addition, protective effect of PMA suggests that viral particles possess a mechanism to inhibit PKC. Our data clearly show that pro and anti inflammatory interleukins can play an important role regulating the HSV infection.

22.012

EXPRESSÃO DE RECEPTORES METABOTRÓPICOS DE GLUTAMATO NO SISTEMA VISUAL DE RATOS E PINTOS APÓS DESAFERENTÇÃO RETINIANA. Matos, R. J. B.; Chacur, M.;

Britto, L. R. G. Biofísica e Fisiologia ICB1-USP

Objetivo:

Os receptores glutamatérgicos metabotrópicos (mGluRs) contribuem para a regulação da plasticidade e estão envolvidos em processos neurodegenerativos e de neuroproteção. Neste trabalho, procuramos estudar a organização funcional glutamatérgica no sistema visual de ratos e pintos, por meio da análise da expressão de mGluRs após desafereção retiniana. As áreas estudadas foram o colículo superior (CS) e o núcleo geniculado lateral (NGL) de ratos e o tecto óptico (TeO) de pintos.

Métodos e Resultados:

Ratos *Wistar* machos e/ou pintos *Gallus gallus* adultos foram anestesiados e em seguida submetidos a enucleação unilateral. Após diferentes intervalos de sobrevivência, os animais foram anestesiados profundamente, perfundidos com salina e paraformaldeído (4%), e seus encéfalos crioprotetidos e cortados. Posteriormente, os cortes foram submetidos a imuno-histoquímica para

detecção dos receptores mGluR1, mGluR2/3 e mGluR5. Observamos expressão de todos os mGluRs testados em processos das camadas superficiais do CS e no NGL. A expressão desses mGluRs no CS e NGL pareceu reduzida após 30 dias da enucleação, mas não após sobrevividas mais curtas. No TeO foi observada imunorreatividade para mGluR1 em processos de camadas superficiais e em corpos celulares de camadas profundas. Para mGluR 2/3 a expressão apareceu em forma de grumos na camada 5, enquanto o mGluR5 foi observado tanto em camadas superficiais como profundas, exclusivamente em processos. Apenas no 10º dia pós-lesão houve redução do número de neurônios mGluR1-positivos na camada 13 e alteração do padrão de marcação para mGluR2/3, que se apresentou contínuo e não mais em forma de grumos. Não se detectou alteração para mGluR5.

Conclusões:

Os resultados indicam que a expressão dos mGluRs avaliados é pouco afetada pela desaferentação, sugerindo que esses receptores parecem não ter um papel importante na plasticidade do sistema visual adulto.

22.013

NOVOS INIBIDORES NATURAIS E SELETIVOS PARA OLIGOPEPTIDASES (EP24.15 E EP3.4.24.16) USANDO TOXINAS DE VENENOS ANIMAIS. ¹Rioli, V.; ²Zaharenko, A. J. ^{**}; ¹Konno, K.; ¹Camargo, A. C. M.; ⁵Portaro, F.; ^{1,3}Toxinologia Instituto Butantan; ²Biologia USP; ⁵Toxicologia Instituto Butantan

Objetivo:

Identificar e caracterizar inibidores naturais presentes em venenos animais que apresentem seletividade e poder inibitório para as ep24.15 e ep24.16, visando um melhor entendimento da biologia celular destas enzimas

Métodos e Resultados:

As frações de baixo peso molecular dos venenos das serpentes *Bothrops jararaca* e *B. jararacussu* foram obtidas pelo uso de membranas de 5 kDa. Após limpeza deste material (cartuchos C18), o incubamos com as enzimas inativas ep24.15 e ep24.16 (Rioli et al., J. Bio. Chem. 278;8547-55). Os peptídeos que interagiram com as oligopeptidases inativas foram analisados e seqüenciados por espectrometria de massas (MALDI-TOF e Q-TOF). Em adição, estes peptídeos foram separados por HPLC-C18, onde foram coletados os picos de interesse para os estudos enzimáticos de inibição usando substrato fluorescente. Os primeiros resultados indicaram que a enzima ep24.15 apresentou grande poder de interação com 5 peptídeos já conhecidos presentes nos venenos analisados:

Conclusões:

Até o momento, os poucos venenos que foram estudados apresentaram peptídeos capazes de interagir com as oligopeptidases citosólicas. Assim, acreditamos que vários inibidores seletivos para estas enzimas poderão ser encontrados utilizando a presente metodologia