

- Crescimento e morte celular

23.001

SUBSTÂNCIAS SEMELHANTES QUIMICAMENTE À TALIDOMIDA POTENCIALIZAM O EFEITO ANTI-PROLIFERATIVO NA LINHAGEM CELULAR P815 DE MASTOCITOMA DE RAT. Charão, C. T. Ciências Fisiológicas UFSC

Objetivo:

A talidomida (N- α -ftalimidoglutaramida), apesar de retirada do mercado na década de 60 por ser teratogênica, voltou a ser utilizada em patologias como a hanseníase e AIDS. Pesquisas atuais têm apontado seu uso em casos de câncer, sendo que compostos com modificações estruturais mostraram efeitos potencializados. Neste trabalho foram estudados 17 substâncias sintéticas análogos estruturais da talidomida (3 N-fenilsucinimidas, 3 N-benzilsuccinimidas, 3 N-fenilftalimidas, 5 N-benzilftalimidas e 3 N-benzilnaftalimidas) na proliferação de células em cultura de mastocitoma P815 e na produção de NO₂ por macrófagos murinos.

Métodos e Resultados:

Células da linhagem P815 (ATCC) foram contadas (Método Cristal Violeta) 24h após a incubação com as substâncias (1-100 μ M). Também foi avaliado a produção de NO₂ (Método de Griess) por macrófagos murinos ativados (LPS+IFN) bem como a sua viabilidade (Método de MTT). As substâncias (100 μ M) testadas mostraram um efeito anti-proliferativo significativo na linhagem P815, sendo que 6 dos compostos apresentaram um efeito superior à talidomida (em média 54,3 % \pm 7,48% do controle enquanto que a talidomida causou uma proliferação 74,1% \pm 4,21% em relação ao controle). Também diminuíram significativamente a produção de NO₂ por macrófagos ativados, sendo que 7 compostos provocaram uma diminuição dos níveis de NO₂ (47,1% \pm 5,07% em relação a produção do controle) superiores à talidomida (63% \pm 9,03% da produção de NO₂ do controle mas viabilidade \geq a 85%).

Conclusões:

Os compostos referidos neste trabalho e nestas condições, não apresentaram efeitos citotóxico nas células normais testadas porém um significativo efeito anti-proliferativo na linhagem P815 e uma redução na produção de NO₂ por macrófagos murinos ativados.

23.002

TOXICIDADE DE ÁCIDOS GRAXOS (AG) EM CÉLULAS PRODUTORAS DE INSULINA RINM5F. Simon, M. N.; Lima, C. L.; Azevedo-Martins, A. K.; Curi, R.; Fisiologia e Biofísica ICB I-USP

Objetivo:

Os ácidos graxos (AG) apresentam toxicidade sobre as células produtoras de insulina. No entanto, os mecanismos envolvidos não foram totalmente elucidados. Determinamos a toxicidade de diferentes ácidos graxos e verificamos se esta envolve a produção de óxido nítrico (*NO – intermediário da toxicidade das citocinas) e a regulação da fosforilação da proteína quinase B (PKB – envolvida na sinalização de sobrevivência celular), em células RINm5F.

Métodos e Resultados:

A viabilidade das células e a fragmentação de DNA foram analisadas por citometria de fluxo. Incubou-se as células por 24 horas com os ácidos esteárico (EA), palmítico (PA), oléico (OA), linoléico (LA), araquidônico (AA), eicosapentanoico (EPA) ou docosa-hexanoico (DHA) na concentração de 0,1 mM. Os AG não interferiram na integridade de membrana celular. Entretanto, alguns destes induziram fragmentação de DNA quando comparados com o controle (2,7 \pm 0,2 %; n=4, em triplicata). O PA apresentou a maior toxicidade (60 \pm 5,4 %), enquanto que o DHA apresentou efeito intermediário (31 \pm 3,3 %). Os demais AG não induziram fragmentação de DNA. Utilizou-se a técnica de *immunoblotting* para investigar os efeitos dos AG na expressão da óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e na regulação da fosforilação da proteína quinase B (PKB). Os AG não induziram a expressão da iNOS após 8 horas de incubação. Já a fosforilação da PKB apresentou-se aumentada após incubação por 4 horas com os ácidos EA (225 \pm 25 %), AA (200 \pm 25 %), PA (275 \pm 75 %) e DHA (175 \pm 50 %), quando comparados ao controle (100 %; n=3).

Conclusões:

Os dados apresentados neste trabalho, referentes à expressão da iNOS, são indicativos de que a toxicidade dos AG é independente da produção de *NO, diferindo da via clássica de toxicidade por citocinas. Já o aumento precoce da fosforilação da PKB induzido por estes compostos, indicativo

da ativação de uma via de sobrevivência, poderia a longo prazo, ser reduzido e/ou insuficiente, favorecendo a apoptose das células RINm5F.

23.003

EFFECT OF CYCLIC PEPTIDES CONTAINING THE INTEGRIN-BINDING MOTIFS VGD AND MLD ON NEUTROPHIL APOPTOSIS: ROLE OF PI3K AND MAPK. ¹Saldanha-Gama, R. F.; ¹Moraes, J. A. *; ¹de Freitas, M. S.; ²Marcinkiewicz C ; ³Zingali, R. B. ; ⁴Juliano, M. A. ; ¹Barja-Fidalgo C. ¹Farmacologia UERJ; ²Biology Temple University; ³ICB-UFRJ; ⁴Biofísica UNIFESP

Objetivo:

Polymorphonuclear neutrophils (PMN) are short-lived cells, that play a major role in the early stages of inflammatory response to infection. Proper regulation of the apoptotic programme is vital to the efficient removal of invading pathogens and the rapid resolution of the inflammatory response. Adhesion molecules-extracellular matrix interactions can delay PMN apoptosis, interfering with the resolution of inflammation. Recently we demonstrated that VLO5, a VGD/MLD heterodimeric disintegrin, ligand of $\alpha_9/\alpha_4\beta_1$ integrin can activates integrin signaling pathways in PMNs, delaying spontaneous apoptosis. In this study, we evaluated the contribution of VGD and MLD sequences on these effects, using synthetic peptides designed from VLO5-A and B-chain recognition loops.

Métodos e Resultados:

Isolated human PMN were incubated for 18h with VGD and MLD peptides and apoptosis was evaluated morphologically (0.01-1 μ M, optical microscopy) and annexin-V binding on plasma membrane (1 μ M, FACS). Moreover, we evaluated the contents of pro-apoptotic and anti-apoptotic proteins Bad and Bcl-xL (1 μ M, western blot). Our results show that, in vitro, probably through interactions with $\alpha_9/\alpha_4\beta_1$ integrins, the peptides activate integrin signaling pathways, strongly reducing PMN spontaneous apoptosis. These effects are dependent on PI3K and MAPK pathways activation, since LY294002 (PI3K inhibitor) and PD95059 (MAPK inhibitor) revert the effects of the peptides, accelerating PMN apoptosis. In agreement with these results, the peptides induce anti-apoptotic protein Bcl-xL expression and degradation of the pro-apoptotic protein Bad.

Conclusões:

The data suggests that interaction of VGD and MLD peptides with PMN might be related with its anti-apoptotic effect, which is dependent on PI3K and MAPK activation.

23.004

ESTRUTURA E SOLVATAÇÃO DO FATOR DE CRESCIMENTO DE FIBROBLASTOS BÁSICO EM SOLUÇÕES ÁGUA/ETANOL. ¹ Brancaloni, G. H.; ² Degreve L. ³ Lourenzoni, M. R. ** Química USP

Objetivo:

As células se reproduzem através do ciclo de divisão celular dando origem a duas células filhas, geralmente idênticas entre si e à célula mãe. O sistema-controle recebe constantemente sinais que lhe permitem induzir ou não a divisão. Entre os sinais extracelulares mais importantes estão proteínas chamadas fatores de crescimento. Estudos com fatores de crescimento de fibroblastos básico (bFGF) sintéticos revelaram que o etanol interfere na ação do bFGF inibindo a proliferação de células da neuroectoderme na fase embrionária. O objetivo deste estudo é caracterizar, via simulação molecular, o efeito das interações dos aminoácidos do bFGF com o etanol e auxiliar no entendimento de quais os fatores estruturais que podem determinar a perda de atividade do bFGF nesse meio.

Métodos e Resultados:

As simulações NVT de dinâmica molecular foram conduzidas a 298K em sistemas contendo uma molécula de bFGF e soluções água/etanol utilizando o campo de força GROMOS96 com um tempo total de simulação de 4.0ns. Diferenças entre as estruturas finais foram observadas em função da concentração do etanol. As regiões mais afetadas são as folhas β_5 , β_6 , β_8 , β_9 onde a rede de ligações de hidrogênio intramoleculares apresenta perda de aproximadamente 15 ligações o que significa que 1 a cada 3 aminoácidos sofreu alterações nas estruturas secundária e terciária. Os desvios quadráticos médio por folha e a hidratação desta proteína confirmam as folhas β_5 , β_6 , β_8 , β_9 como as folhas que sofreram as maiores alterações. As alterações são diferentes para as folhas

β 5, β 6, β 8, β 9 mas única folha que sempre apresentou alterações em função da concentração do etanol é a β 8.

Conclusões:

O fato da folha β 8 ser a única envolvida em todas as alterações estruturais sugere fortemente que são os resíduos desta folha que devem ser identificados entre os responsáveis pela perda da atividade do bFGF em meio etanólico e portanto entre os responsáveis pela atividade relacionada à proliferação de células da neuroectoderme na fase embrionária.

23.005

ANTIINFLAMATÓRIOS NÃO-ESTERÓIDES (AINES) INIBEM A PROLIFERAÇÃO CELULAR INDEPENDENTEMENTE DA ATIVAÇÃO DE CASPASE 3/7 EM LINHAGENS DE GLIOMA.

¹Frezza, R. L.; ¹Bernardi, A. **; ¹Horn, A. P. **; ¹Jacques-Silva, M. C. **; ¹Sarkis, J. J. F.; ²Lenz, G.; ¹Salbego, C. G.; ¹Battastini, A. M. O. ¹Bioquímica ICBS-UFRGS; ²Biofísica UFRGS

Objetivo:

Gliomas são os tumores primários do SNC mais freqüentes em adultos e crianças. Apesar do tratamento, esses tumores apresentam uma alta taxa de recorrência devido a sua alta proliferação, poder de invasão e resistência à radiação. Embora sua função na patogênese do câncer não seja clara, estudos recentes sugerem que a enzima ciclooxigenase (COX) está envolvida na proliferação de tumores. Neste trabalho, estudamos o efeito dos AINEs, fármacos inibidores da COX, na viabilidade e proliferação celular em linhagens de glioma humano e de rato.

Métodos e Resultados:

As linhagens celulares de glioma humano (U138-MG) e de rato (C6) foram mantidas a 37°C em incubadora contendo 5% de CO₂, em meio DMEM suplementado com soro fetal bovino. Os tratamentos foram realizados com AINEs de diferentes especificidades e classes químicas por 24h, 48h e 72h. A proliferação celular foi avaliada pelo método de contagem de células em hemocítômetro. Indometacina (25 a 400 μ M), acetaminofeno (0.25 a 5 mM), sulindaco (100 a 500 μ M) e NS-398 (10 a 150 μ M) inibiram a proliferação celular nas linhagens de glioma de forma tempo e dose dependente (n=4). A apoptose foi avaliada através do ensaio de atividade de caspases. Nenhum dos AINEs testados induziu ativação de caspase 3/7 (n=3). Através dos métodos do MTT e da liberação de LDH observou-se diminuição da viabilidade celular dos gliomas tratados com indometacina (50% \pm 1.55 e 33% \pm 2.7, respectivamente, n=3). (Dados expressos em % Controle \pm EP. ANOVA de uma Via e teste de Tukey, p<0,001).

Conclusões:

Diferentes classes químicas de AINEs inibem a proliferação celular em ambas as linhagens de forma tempo e dose dependente. A morte celular observada sugere que não há envolvimento de apoptose clássica. Mais estudos com modelos *in vivo* de gliomas são necessários para elucidar mecanismos, bem como fornecer novas evidências da utilidade dos AINEs no tratamento quimioterápico dos gliomas.

23.006

ANALYSIS OF THE MECHANISMS OF PHOTORECEPTOR CELL DEATH. ¹ Leal-Ferreira, M.L.; ² Linden, R.; ³ Chiarini, L. B.; ^{1,2,3} Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, UFRJ

Objetivo:

Various retinal pathologies are associated with photoreceptor cell death. In a previous study (Chiarini, L.B. et al (2003) J Neurosci Res. 74(6):875), a model was established of photoreceptor cell death induced by thapsigargin, an inhibitor of the Ca⁺⁺-ATPase of the endoplasmic reticulum (ER), which is also a classical inducer of ER stress. We found that photoreceptor cell death induced by thapsigargin is blocked by an increase of the levels of cAMP. In this study we tested the role of protein kinases ERK and JNK in the photoreceptor cell death induced by thapsigargin. In addition, we examined the expression of BiP, a chaperone resident in the ER lumen, after induction of an increase of intracellular levels of cAMP.

Métodos e Resultados:

Retinal explants from 6 day-old rats were maintained for up to 24 hours *in vitro*, in the presence of various drugs. Photoreceptor cell death was evaluated by counting condensed profiles of cells immunolabeled for rhodopsin. Protein expression and phosphorylation were examined by western blot. We found that treatment with thapsigargin (10nM) activates the ERK pathway. We observed an

increase in the amount of phospho-ERK after 16 hours in the presence of thapsigargin. In addition, inhibitors of the ERK pathway (PD98059 30 μ M and U0126 10 μ M) blocked thapsigargin-induced cell death. We found that SP600125 (20 μ M), an inhibitor of the JNK pathway, also blocked photoreceptor death. Treatment with forskolin (10 μ M), an activator of adenylyl cyclase, blocked photoreceptor cell death induced by thapsigargin. We also found that forskolin induced an increase of the expression of BiP/GRP78 in retinal explants.

Conclusões:

These results show that both the ERK and JNK pathways have a pro-apoptotic role in photoreceptor cell death induced by thapsigargin. In turn, the neuroprotective effect of cAMP may be related to the increased amount of the cytoprotective protein BiP/GRP78.

23.007

ANÁLISE DO FATOR DE TRANSCRIÇÃO ATF-2 DURANTE A DEGENERAÇÃO RETRÓGRADA DAS CÉLULAS GANGLIONARES DA RETINA. Ribas, V. T.; Linden, R.; Chiarini, L. B. IBCCF-UFRJ

Objetivo:

Na retina, a morte das células ganglionares é bloqueada por inibidor da síntese proteica, sugerindo que a expressão de genes específicos é necessária para o programa de morte celular. Nesse estudo, investigamos o comportamento do fator de transcrição ATF-2 durante a degeneração retrógrada, induzida por axotomia, das células ganglionares da retina.

Métodos e Resultados:

Explantos de retina de ratos neonatos foram mantidos *in vitro* por diferentes intervalos de tempo após a axotomia das células ganglionares. A análise da proteína ATF-2 foi feita através de imunohistoquímica utilizando anticorpos para a proteína ATF-2 e a ATF-2 fosforilada nos resíduos Thr69/71. A morte celular programada foi detectada pela condensação da cromatina após marcação com intercalante de DNA fluorescente *Sytox Green*. A análise foi feita através de microscopia de fluorescência convencional e confocal. Verificamos que na retina de ratos neonatos a proteína ATF-2 está localizada no núcleo das células ganglionares. Verificamos que 3 horas após a axotomia um maior número de células ganglionares apresenta ATF-2 fosforilada nos resíduos Thr69/71. A axotomia induziu uma perda progressiva de ATF-2 das células ganglionares. As células com a cromatina condensada, característica de célula em degeneração, não apresentaram ATF-2 no núcleo. O inibidor de síntese proteica, anisomicina, bloqueou o desaparecimento de ATF-2 induzida por axotomia.

Conclusões:

Mostramos que a axotomia das células ganglionares induz um aumento transiente da fosforilação de ATF-2 nos resíduos Thr69/71 e o desaparecimento progressivo de ATF-2 das células ganglionares. Estes resultados sugerem que após a axotomia das células ganglionares ocorre a ativação do fator de transcrição ATF-2 e posteriormente, a degradação de ATF-2 associada à degeneração das células ganglionares da retina.

23.008

EFFECT OF HEPATOTROPHIC FACTORS IN THIOACETAMIDE-INDUCED CIRRHOSIS. Guerra, R. R.; Trotta, M. R.; Miranda, G. P.; Wenceslau, C. G. C.; Hernandez-Blazquez, F. J. FMVZ-USP

Objetivo:

The hepatic cirrhosis is characterized by fibrosis and regenerative nodules that result in disorganization of the hepatic architecture. It is considered an irreversible situation. However, studies point towards the possibility of cirrhosis reversion through administration of exogenous hepatotrophic factors (EHFs) (picture 1) constituted by amino acids, sugars, vitamins and hormones, which reduce the parenchymal collagen on fibrosis. Thus, this study had as objective to evaluate the effects of EHF treatment in rats with thioacetamide-induced cirrhosis, in order to verify if these factors modify the liver structure, the volumetric density of parenchymal collagen, the quantity of perivascular collagen and the functional condition of cirrhotic livers.

Métodos e Resultados:

Fifty female rats Wistar, weighing about 200g, were separated in 3 groups: A) 25 animals with thioacetamide-induced cirrhosis (3x/week for 14 week, concentration increased in 20% after 7th

week) and treated with EHF, after 20 days (10 days 2x/day); B) 15 animals with thioacetamide-induced cirrhosis and treated with physiological solution applied in the same volume and frequency that group A. C) 10 animals without treatment. The animals lost weight in the beginning of cirrhosis induction and after increase in thioacetamide concentration, recovering weight 2 weeks after these facts. Cirrhotic livers showed more regenerative nodules on the visceral surface than on the diaphragmatic surface. Livers increased 11.26% in weight and 11.25% in volume after treatment with EHF. Treated livers showed reduction in parenchymal fibrous septa and perivascular collagen and partial rearrangement of hepatocytes lines. In addition, structures like lobules and some central veins have reappeared in these livers. Animals without treatment had increased levels of GGT (231.92%), ALT (21.32%), triglycerides (9.25%) and AST (7.9%).

Conclusões:

EHF improve structural and functional conditions of thioacetamide-induced cirrhotic livers.

23.009

HEME, A PROINFLAMMATORY MOLECULE, DELAYS HUMAN NEUTROPHILS APOPTOSIS PRESERVING MITOCHONDRIA STABILITY THROUGH THE DIFFERENTIAL EXPRESSION OF BCL-2 FAMILY PROTEINS. ¹Barcellos-de-Souza, P.; ¹Arruda, M. A.**; ²Sampaio, A. L. F.**; ¹Freitas, M. S.; ³Oliveira, P. L.; ³Graça-Souza, A. V.; ¹Barja-Fidalgo, C. ¹Farmacologia e Psicobiologia UERJ; ²Far-Manguinhos FIOCRUZ; ³Bioquímica Médica CCS-UFRJ

Objetivo:

We have recently shown that heme is a proinflammatory molecule that inhibits human neutrophil spontaneous apoptosis via multiple signaling pathways, what may corroborate to the statement of chronic inflammation associated to hemolytic processes. Herein we show that heme-induced delay of spontaneous neutrophil apoptosis correlates with the prevention of mitochondria transmembrane potential ($\Delta\psi_m$) dissipation.

Métodos e Resultados:

Heme (3 μ M) was able to inhibit $\Delta\psi_m$ spontaneous dissipation in aged human neutrophils (20h), a phenomenon that implicates in the progression of programmed cell death. The maintenance of $\Delta\psi_m$ is probably due to heme inhibition of Bax insertion into the mitochondria, which seems to be closely related to a decrease on Bad/Bcl-X_L ratio. Heme also induces Bad degradation as well as Bcl-X_L de novo protein synthesis in human neutrophils. These events depend on NADPH-generated reactive oxygen species (ROS) and heme oxygenase (HO) activity. The MAP kinase, phosphatidylinositol 3 kinase and nuclear factor (NF)- κ B pathways have also been shown to be involved on heme protective effects. The modulation of these Bcl-2 members interactions are under investigation.

Conclusões:

We suggest that the preservation of mitochondria integrity is the checkpoint of heme anti-apoptotic signaling via the induction of Bad degradation and Bcl-X_L synthesis. The understanding of this mechanism may lead to the development of new strategies in order to ameliorate chronic inflammation associated to hemolytic episodes.

23.010

ESTUDO COMPARATIVO DE BLENDA DE POLICAPROLACTONA (PCL) E NAFION® NAS PROPORÇÕES 90/10 E 70/30 EM FALHA ÓSSEA DE RATOS. ¹Barros, P. P.; ²Zoppi, R. A.; ²Cassu, S. N.; ²Reis, N. S.; ²Dotto, P. L.**; ²Caparroz, P. G.*; ²Marão, R. E.*; ¹Ciências Fisiológicas PUCCamp; ²Biologia CCV-PUCCamp

Objetivo:

Estudaram-se comparativamente as respostas teciduais ósseas em função da proporção de PCL/Nafion® e tempo de permanência do implante. A alta flexibilidade e cristalinidade da PCL garantem degradação lenta em sistemas biológicos. A utilização do Nafion® teve por finalidade a avaliação da influência de um polímero condutor iônico, sobre a taxa de deposição de células que constituem o tecido ósseo.

Métodos e Resultados:

Prepararam-se os corpos de prova misturando-se em solução de PCL e Nafion® na proporção 70/30 e 90/10. O compatibilizante do sistema foi o 3-aminopropil trietoxissilano (3-APTEOS). Implantaram-se corpos de prova de PCL/ Nafion® em falha óssea em tíbias de 20 ratos machos Wistar. Retiraram-se amostras de tecido 2, 4, 8, 16 e 32 semanas pós-implante. Coraram-se

lâminas histológicas de tecido com HE e Masson. Nos implantes de composição 90/10, observou-se o polímero envolvido por tecido ósseo trabecular e osteoblastos até a semana 4. Em 8, o polímero apresentou-se circunscrito por tecido fibroso derivado do endóstio, com tecido ósseo secundário e linfócitos em seu interior. Em 16, o polímero apresentou infiltrado celular, que se reduziu até 32. Em 70/30, observou-se perióstio proliferando-se sobre infiltrado linfocitário, vasos neoformados, colágeno desorganizado. O implante foi invadido por macrófagos e colágeno, envolvido por cápsula fibrilar até 4. Em 8, o polímero apresentou-se circunscrito por tecido ósseo trabecular com pouco infiltrado osteóide. Em 16, observou-se aumento de osteóide no polímero, que evoluiu até 32.

Conclusões:

A blenda PCL/Nafion[®] na proporção 70/30 proporcionou proliferação celular no interior do implante facilitando a neoformação óssea, atuando como estrutura de suporte temporário, aspectos não observados com a blenda na proporção 90/10.

23.011

ATL-1, A SYNTHETIC ANALOG OF LIPOXIN A₄, INHIBITS HUMAN MONOCYTE APOPTOSIS: INVOLVEMENT OF ERK-2 AND PI3-KINASE. Simões, R. L.; da Fé, A. R.*; Fierro, I. M.; Farmacologia e Psicobiologia UERJ

Métodos e Resultados:

Human peripheral blood monocytes were isolated by density centrifugation methods with a purity of >90%. Addition of ATL-1 (100 nM) to cells cultured in the absence of serum for 72 h increased survival by approximately 40% above control, as evaluated by MTT assay. To investigate whether this effect was a consequence of monocyte apoptosis reduction by ATL-1, we used flow cytometry analysis. Incubation of the cells with ATL-1 (100 nM) reduced in 43% spontaneous apoptosis induced by 60 h serum starvation. We have recently showed that ATL-1, in monocytes, induces ERK-2 phosphorylation, a kinase associated with cell survival. Treatment of these cells with PD98059 (10 µM), an ERK-2 inhibitor, abrogated both ATL-1-increase in cell survival and apoptosis suppression. Furthermore, LY294002 (3 µM), a PI3-kinase inhibitor, blocked ATL-1 effects in monocyte apoptosis, suggesting an involvement of the PI3-kinase/Akt pathway in this event.

Conclusões: These results demonstrate a cytoprotective effect of ATL-1 in monocytes, mediated by an ERK-2-dependent pathway, and might contribute to the elucidation of the mechanisms associated with the resolution phase of the inflammatory process

23.012

PERFIL DE EXPRESSÃO DOS GENES INIBIDORES DE LIGAÇÃO AO DNA (ID) EM CÉLULAS MESANGIAIS (CM). Tambellini, R.; Campos, A. H. Nefrologia UNIFESP

Objetivo:

Fatores de crescimento (FC) induzem hiperplasia, hipertrofia e aumento de matriz extracelular em CM e contribuem para o aparecimento da glomerulosclerose observada na hipertensão arterial sistêmica e no diabetes. Os genes ID (1-4) são dominantes negativos de fatores de transcrição do tipo hélice-loop-hélice e modulam crescimento e morte celular em diferentes sistemas. Contudo, seu papel no rim adulto ainda não está esclarecido. O objetivo deste trabalho é caracterizar o perfil de expressão dos genes ID em CM *in vitro* e *in vivo*.

Métodos e Resultados:

CM humanas imortalizadas (CMH) foram cultivadas em meio DMEM com soro bovino fetal (SBF) a 10%, 37° C e 5% de CO₂. RNA total foi extraído, cDNA sintetizado e a expressão do RNAm dos genes ID analisada por PCR quantitativo em tempo real. Estudos semelhantes foram realizados a partir de amostras a fresco de glomérulos de ratos adultos. Em uma outra série de experimentos, CMH foram mantidas em SBF a 0,5% por 24h e a seguir estimuladas por re-adição de SBF a 10% durante diferentes períodos de tempo. Além disso, a expressão dos genes ID foi avaliada na presença (6h) de angiotensina II 10⁻⁶M, PDGF 2ng/mL, FGF-2 10ng/mL, TGF-β1 2ng/mL, bradicinina 10⁻⁷M ou veículo. ID1-4 e ID1-3 foram detectados em condições basais em CM humanas e glomérulos isolados de rato, respectivamente. SBF aumentou os níveis de RNAm dos quatro genes ID (2,7-6,8x) de maneira precoce e sustentada, com pico de regulação entre 3h e 6h. ID1 foi o gene de regulação mais marcante (6,8±0,3x, p<0.05, N=6). Todos os FC testados modificaram a expressão de um ou mais membros da família dos IDs, com destaque para TGF-β1

(ID1: 2.4±0,2x e ID3: 3.3±0,3x, p<0.05, N=8) e FGF-2 (ID1: 2.9±0,2x, p<0.05, N=8). ID1 foi o único gene regulado por todos os FC empregados.

Conclusões:

Os genes ID são expressos constitutivamente *in vitro* e *in vivo* em CM. FC modificam positivamente seu perfil de expressão de maneira precoce e específica. Estudos adicionais estão em curso para definir o papel destes genes em CM em condições normais e patológicas.

23.013

PLATELET ACTIVATING FACTOR DISTURBS INTERKINETIC NUCLEAR MIGRATION BY INDUCTION OF A CHECKPOINT IN THE S/G2 TRANSITION OF THE CELL CYCLE IN THE DEVELOPING RETINA. ¹Fragel-Madeira, L.; ¹Melleti, T.S.G.; ²Monteiro, R. Q.; ³Einicker-Lamas, M.; ⁴Bernardo, R. R.; ⁵Lopes, A. H. C. S.; ¹Linden, R. ¹Neurobiologia IBCCF, UFRJ; ²Bioquímica ICB-UFRJ; ³IBCCF-UFRJ; ⁴Química, UFRJ; ⁵Microbiologia ICB-UFRJ

Objetivo:

During the cell cycle in the retina, the nucleus of proliferating cells migrates back and forth through the neuroblastic layer (NBL), an event known as interkinetic nuclear migration. Thus, DNA is duplicated in the innermost margin, while mitosis occurs as the nucleus reaches the ventricular surface in each round of cell division. The G1 and G2 phases occur along the nuclear migration pathway. The LIS1 protein, which is part of a highly conserved pathway that regulates nuclear migration in various species, was found to be a subunit of PAF acetyl-hydrolase (PAFAH), an enzyme complex that inactivates the platelet-activating factor (PAF). PAF, a potent lipid mediator that elicits a wide range of responses, regulates proliferation in different types of cells, however its effects upon the cell cycle control are still unknown. The association of PAFAH with nuclear migration led us to test the effects of PAF upon the interkinetic nuclear migration in the developing rat retina.

Métodos e Resultados:

We confirmed the presence of PAF by thin layer chromatography, HPLC and a platelet aggregation assay. PAF partially inhibited interkinetic nuclear migration in proliferating cells pulse-labeled with Bromo-deoxyuridine (BrdU), but neither the total number of nuclei nor the incorporation of H³-thymidine were changed. The reduced number of cell nuclei that reached the outer stratum of the NBL after treatment with PAF had a heterochromatic pattern of labeling for BrdU, suggesting incorporation at the end of S phase, at which time the dividing cells may have escaped a period of sensitivity to the lipid. The velocity of nuclear migration in cells that passed the S/G2 transition was the same in either PAF-treated or control retinal tissue and the removal of PAF reestablished the normal interkinetic nuclear migration. The presence of the PAF receptor was confirmed by Western blot and immunohistochemistry in the developing retina. The treatment with the PAF receptor antagonist, WEB 2086, or PI3-kinase inhibitor, LY 294002, prevented the inhibition of nuclear migration by PAF.

Conclusões:

The results suggest that PAF may be involved in a signaling pathway that controls the transition from S to G2 phases of the cell cycle in the developing retina.

23.014

MODULAÇÃO DO ESTADO REDOX E ESTRESSE CELULAR INDUZIDA PELA EXPRESSÃO DO GENE DA MRP1/BOMBA GS-X EM LINFÓCITOS. ¹Kolberg, A.; ²Rossato, J. S.*; ²Sgorla, B.*; ²Krause, M. S.**; ³Maslinkiewicz, A.*; ¹Janner, D. R.**; ¹Costa, J. A. B.**; ¹Vianna, E. M. S.; ¹Lazzarotto, A. R.; ¹Oliveira Jr, L. P.; ¹Homem de Bittencourt Jr., P. I. ¹Fisiologia UFRGS; ²Fisiologia Celular UFRGS; ³Farmacologia FFFCMPA

Objetivo:

A ATPase de membrana MRP1/bomba GS-X exporta conjugados de glutatona (GSH), como o dissulfeto de GSH (GSSG), para o meio extracelular. Considerando que a relação [GSSG]/[GSH] dita o equilíbrio redox celular, é possível que a MRP1/bomba GS-X participe da regulação do estado redox através da eliminação de substâncias eletrofílicas, como prostaglandinas ciclopentenônicas (CP-PGs) e drogas anticâncer que afetam a relação [GSSG]/[GSH].

Métodos e Resultados:

Linfócitos de linfonodos mesentéricos de ratos Wistar adultos machos foram transfectados por eletroporação com o plasmídeo pRC-RSV contendo a seqüência da MRP1. As células foram cultivadas por 6 h na ausência ou presença do eletrófilo PGA2 (uma CP-PG, 10 e 40 µM), do par gerador de íons superóxido xantina/oxidase e do agente redutor betamercaptoetanol (0, 200, 500 e 1000 µM). Após esse período, foi avaliada a expressão da proteína de choque térmico hsp70, um marcador de estresse celular. Linfócitos transfectados mostraram maior resistência ao tratamento com PGA2 (redução de até 70% na expressão de hsp70), resultado idêntico ao obtido com o par xantina/xantina oxidase e que foi revertido pela adição de betamercaptoetanol ao meio. Após o tratamento de 6 h, as células foram cultivadas na presença de PGA2 por 24 h adicionais. Os resultados mostraram que, apesar de haver acúmulo de hsp70 em ambos os grupos, a indutibilidade de estresse por PGA2 foi muito menor (queda de 89%) nos linfócitos transfectados.

Conclusões:

Linfócitos superexpressando o gene da MRP1/bomba GS-X apresentam maior proteção contra agentes oxidantes que levariam a um desbalanço redox celular. Uma vez que o acúmulo de CP-PGs em linfócitos pode levar à imunossupressão nos estágios finais de câncer por alteração no estado redox intracelular, é possível que a expressão da MRP1/bomba GS-X possa ter participação no desenvolvimento do câncer.

23.015

ANÁLISE COMPARATIVA DA BIOCAMPATIBILIDADE DE BASTÕES DE PVDF. ¹Mello, E. M.; ²Alves, N.; ²Giacometti, J. A.; ²Cardoso, C. X.; ³Camargo Filho, J. C. S.; ⁴Vanderlei, L. C. M.; ⁴Camargo, R. C. T.; ⁴Brito, M. K. M.; ¹Bioengenharia EESC-USP; ²Físico-Química Biológica UNESP-Presidente Prudente; ³Fisioterapia UNICAMP; ⁴Fisioterapia FCT-UNESP-Presidente Prudente

Objetivo:

Analisar as alterações histológicas do músculo reto abdominal de coelhos submetido ao implante de bastões de PVDF produzidos pelo método de prensagem à quente (PQ) e pelo método de solução (MS) (dissolução do PVDF no solvente dimetilacetamida - DMA).

Métodos e Resultados:

Utilizaram-se 8 coelhos machos adultos (*Oryctolary cuniculus* da linhagem Nova Zelândia) divididos em dois grupos. G1-4 animais com implante de bastões de PVDF produzidos pelo método PQ. G2-4 animais com implante dos bastões de PVDF produzidos pelo método MS. Para o implante dos bastões, no músculo reto abdominal, os animais foram anestesiados com ketamina (0,15ml/kg) e Xylazina (0,20ml/kg). Após seis semanas procedeu-se a eutanásia dos coelhos, retirou-se o músculo reto abdominal de onde se obteve um fragmento com aproximadamente 2cmX1cm contendo o material de implante, fixados em formalina a 10%. Os bastões foram retirados do tecido, preservando-se o envoltório. Os tecidos foram incluídos, cortados e corados pela técnica de Hematoxilina-Eosina. A análise histológica dos coelhos do G1 indicou uma área de intensa fibrose com numerosos fibroblastos, presença de miotúbulos, numerosos vasos, mioblastos e células inflamatórias, linfócitos e plasmócitos e presença de células gigantes de corpo estranho. Nos coelhos do grupo G2, observou-se um anel delgado de tecido conjuntivo com numerosos fibroblastos, presença de poucos plasmócitos e macrófagos.

Conclusões:

O implante produzido por prensagem a quente apresenta reação inflamatória considerada pequena, em relação à observada quando produzido por solução, no qual se apresenta reação severa ao corpo estranho. Pode-se concluir que a presença do solvente DMA usado na produção dos bastões seja o predisponente dos achados em decorrência da toxicidade deste solvente.

23.016

ATIVIDADE DA SERINA PALMITOIL TRANFERASE NOS FENÓTIPOS DE UMA LINHAGEM REPRESENTATIVA DA CÉLULA ESTRELADA HEPÁTICA (GRX). ¹Mello, P. A.; ¹Aguirres, A. B.; ¹Andrade, C. M. B.; ¹Guaragna, R. M.; ²Borojevic, R.; ¹Guma, F. C. R.; ¹Trindade, V. M. T. ¹Bioquímica ICBS-UFRGS; ²Histologia e Embriologia UFRJ

Objetivo:

Esfingolípídios são componentes da membrana plasmática importantes na diferenciação e adesão celulares. A formação da base esfingóide inicia com a ação da enzima serina palmitoil transferase

(SPT) (EC 2.3.1.50) que condensa o aminoácido serina com ácido graxo ativado palmitoil-CoA; etapa marca-passo da biossíntese dos esfingolipídios. A linhagem celular GRX expressa o fenótipo miofibroblasto e pode ser induzida in vitro ao fenótipo lipócito através de tratamento com retinol ou insulina e indometacina. A biossíntese dos esfingolipídios neste modelo biológico foi estudada através da atividade da SPT. Os requerimentos para esta avaliação foram, também, determinados usando células miofibroblásticas.

Métodos e Resultados:

A fonte de enzima foi a fração microssomal da linhagem celular GRX (Eur. J. Biochem. 198:667-674, 1991). A atividade enzimática foi medida usando [3-14C]-serina como precursor radioativo (Methods in Enzymology 209:427-431, 1992). A formação do produto 3-ceto-esfingina foi confirmada pela análise cromatográfica em camada delgada, seguida de autoradiografia (Arch. Biochem. Biophys. 228:282-291, 1984). As condições enzimáticas adequadas obtidas foram: tempo de incubação de 30 min, a 37 °C, com agitação constante, usando 1,2 mM de [3-14C]-serina (10mCi/mmol), 0,16 mM de palmitoil-CoA e 45 µg de proteína. A atividade específica da SPT foi maior no fenótipo miofibroblasto comparado ao fenótipo lipócito.

Conclusões:

Os resultados estão de acordo com o esperado, pois o fenótipo miofibroblasto, por apresentar alta taxa proliferativa em relação ao lipócito, necessita de maior atividade da SPT para formar novas membranas.

23.017

ESTUDO DA APOPTOSE EM TECIDOS DE RATAS VELHAS, CASTRADAS E TRATADAS COM ESTRÓGENO. ¹Hernandes, A. C. Medicina UNIFESP

Objetivo:

O envelhecimento fisiológico induz alterações funcionais da mitocôndria no fígado e sistema nervoso que podem levar ao aumento da apoptose. Estudos sobre o estrógeno e seus efeitos no cérebro durante o envelhecimento têm demonstrado que a reposição estrogênica produz uma ação neuroprotetora. No fígado foi demonstrado que o tratamento com estrógeno aumenta a atividade anti-apoptótica nos hepatócitos ao estresse oxidativo induzido. Trabalho anterior deste laboratório mostrou que há um aumento de células apoptóticas no plexo mioentérico durante o envelhecimento. Visamos estudar a ação anti-apoptótica do tratamento com estrógeno em tecido hepático e nervoso periférico (plexo mioentérico) de ratas senescentes.

Métodos e Resultados:

Utilizamos ratas Wistar2BAW, divididas em 4 grupos com 6 a 8 animais cada: G1- 5 meses; G2- 22 meses; G3- 22 meses tratadas com veículo; G4-22 meses tratadas com estrógeno. As ratas de G3 e G4 foram submetidas à ooforectomia e tratadas imediatamente um dia após a cirurgia. O G4 recebeu 0,1 ml de β -estradiol 3-benzoato (25µg/0,1ml) e o G3 recebeu 0,1ml do veículo (óleo de soja e álcool etílico) ambos por via subcutânea em dias alternados. Após 30 dias de tratamento, as ratas dos grupos G3 e G4 foram sacrificadas para retirada dos tecidos. A identificação das células em apoptose foi realizada pela reação imunocitoquímica do TUNEL. Encontramos uma diferença significativa entre os grupos (número de células TUNEL positivas/µm² x10⁻⁶) no fígado (tratados: 4,51 ± 0,0057; não-tratados: 10,53 ± 1,5050) e plexo mioentérico (tratados: 9,02 ± 2,60; não-tratados: 4000,00 ± 850,00).

Conclusões:

Os resultados indicam que o estrógeno promoveu uma proteção celular, diminuindo a apoptose comum no envelhecimento. Essa ação foi muito mais acentuada nas células nervosas. O efeito anti-apoptótico do estrógeno pode estar ligado à sua ação na mitocôndria, reduzindo a produção de espécies reativas de oxigênio, que associada a lesão no DNA pode ser responsável pela morte celular.

23.018

PACAP IS AN ANTI-PROLIFERATIVE NEUROACTIVE PEPTIDE IN THE DEVELOPING RETINA.

¹Njaine, B.; ²Martins, R. A. P.; ²Santiago, M. F.; ²Linden, R.; ³Silveira, M. S. ¹Biofísica UFRJ; ²IBCCF-UFRJ; ³Neurobiologia IBCCF-UFRJ

Objetivo:

The investigation of extracellular factors involved in the regulation of the proliferative status of neuroblasts is an area of intense research. We are interested on the role of PACAP (Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide) in the developing retina. It has been reported that this peptide may act both as anti-mitogenic as well as pro-mitogenic in the Central Nervous System, depending on the signal transduction pathway activated. Our previous results showed that in developing retina PACAP activates the adenylyl cyclase pathway suggesting a possible role of PACAP in the control of proliferation in this tissue.

Métodos e Resultados:

We determined the expression of PACAP38, PAM enzyme (which acts in the biosynthesis of this peptide) and PAC1 (PACAP-specific receptor) by RT-PCR, western-blot and immunohistochemistry in the retina of rats. We demonstrated that PAC1 is expressed in retinal precursors as detected in confocal images of a double immunofluorescence assay in sections from retinal explants and dissociated cells, in which BrdU (bromodeoxyuridine) was added in culture for 2 hours. [³H]-thymidine incorporation was inhibited by 10nM PACAP38 (65%, compared to control=100%), PAC1-specific agonist maxadilan (71%) and 10⁻⁶M forskolin (55%) in P1 retinas. Similar results were obtained in E20-22 retinas. PACAP38 also decreased the number of BrdU-positive cells. Moreover, we detected pCREB in retinal progenitor cells after a short-term stimulation with PACAP38 which suggests a direct effect for this peptide.

Conclusões: Our data show that PACAP regulates the proliferation of progenitor cells during retinal development, and suggest that it may induce cell cycle exit of retinal precursors, possibly acting at the transition from proliferation to neuronal differentiation.

23.019

SERUM AMYLOID A (SAA) AN INDUCTOR OF FIBROBLAST CELLS PROLIFERATION. ¹Dermargos, A.**; ²Campa, A.; ¹Armelin, H. A.; ²Hatanaka, E.; ¹Bioquímica IQ-USP; ²Análises Clínicas e Toxicológicas FCF-USP

Objetivo:

Serum amyloid A (SAA), an acute phase protein persistently elevated in chronic diseases, is a potent pro-inflammatory stimulus for leukocytes. We believe that identify cellular targets for SAA is an important point for the comprehension of SAA role. In this aspect fibroblasts are an important model because they exert profound effects on progression of chronic degenerative diseases. Fibroblasts can synthesize pro-inflammatory cytokines (IL-8 and eotaxin) and growth factors (FGFs and TGF- β) that are important in the metalloproteinases synthesis, collagen production, angiogenesis and fibrosis. Thus in this work we studied the effect of SAA on the proliferation of fibroblast cells.

Métodos e Resultados: Thought ³H-thymidine incorporation we demonstrated that SAA induces the proliferation of 3T3 Swiss cells. This results have been confirmed by cell contain and BrdU incorporation.

Conclusões: With this data, we intend to discuss the potential role of SAA inducing fibroblasts proliferation during the wound healing and in the progression of chronic degenerative disease such as rheumatic arthritis, cancer and diabetes.

23.020

COMPARATIVE TOXICITY OF OLEIC AND LINOLEIC ACID ON HUMAN LYMPHOCYTES. ¹Cury-Boaventura, M. F.; Gorjão, R.**; Lima, T. M.**; Curi, R. Biofísica e Fisiologia ICB I-USP

Objetivo:

Commercially available lipid emulsions for parenteral nutrition are mainly composed by long chain triacylglycerol containing a high proportion of ω -6 polyunsaturated fatty acids or ω -9 monounsaturated fatty acids. The immunological impact of such therapy is particularly important because parenteral diets are often administered to critically ill patients as a mechanism to supply adequate nutrition during catabolic stress response. The comparative toxicity of oleic acid (OA) and linoleic acid (LA) on human lymphocytes and the type of cell death induced by these fatty acids were determined *in vitro*.

Métodos e Resultados:

Parameters of cell death were investigated by flow cytometric: cell viability, DNA fragmentation, phosphatidylserine externalization, mitochondrial depolarization, neutral lipid accumulation and

production of reactive oxygen species; by fluorescence microscopy: chromatin condensation. Additionally we employed a spectrofluorometric assay to determine the activities of caspase - 3, 6 and 8. Evidence is presented herein that OA is less toxic to human lymphocytes than LA. However, both fatty acids promoted apoptosis and necrosis of these cells. The mechanism of cell death induced by OA involved activation of caspase 3 while the mechanism of death induced by LA involved mitochondrial depolarization and ROS production. Importantly, neutral lipid accumulation may be a mechanism to protect lymphocytes against the toxicity induced by OA.

Conclusões:

OA may offer an immunological less problematic alternative to LA with respect to fatty acid supplementation of parenteral nutritional emulsions.

23.021

EXPRESSÃO DA NOS-2 EM ÓRGÃOS FETAIS NO FINAL DO DESENVOLVIMENTO GESTACIONAL ¹Zambuzzi, W. F.; ²Granjeiro J. M.; ¹Ciências Biológicas Bioquímica USP; ²Biologia Celular e Molecular UFF

Objetivo:

Tendo em vista a importância em se conhecer o papel do NO induzido pelo estresse fisiológico gerado no final do desenvolvimento fetal, nosso objetivo foi investigar, através da técnica de imunohistoquímica, a participação da isoforma NOS-2, uma isoforma induzível, durante os períodos finais do desenvolvimento fetal de ratos.

Métodos e Resultados:

Rattus norvegicus de 17 a 21 dias gestacionais (DG) foram coletados, fixados, desidratados em etanol, diafanizados em xilol e embebidos em parafina sintética. As seções (5 µm de espessura) foram desparafinizadas em xilol, re-hidratadas e imunohistoquimicamente processadas pela reação do complexo Avidina-Biotina-Peroxidase. Nos períodos 17 e 18DG a imuno-marcação apresentava-se somente no fígado, aos 19DG havia, além do fígado, poucas imuno-marcações na medula óssea, a qual se apresentava pré-formada. Aos 20 e 21DG, o número de células imunomarcadas na medula óssea e no fígado aumentou. Foi verificada, ainda neste período, a presença de células expressando NOS-2 no pulmão e timo.

Conclusões:

Desta maneira, concluímos que os processos preparatórios envolvidos no final do desenvolvimento fetal estimulam a produção de NO, sendo produzido também pela isoforma NOS-2 (iNOS).

23.022

ESTROGÊNIO PROTEGE CÉLULAS TIREOIDEANAS (PCCL3) DA MORTE CELULAR PROMOVIDA POR PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO. ¹Souza, E. C. L.; ¹Grozovsky, R. **; ²Alves, L. M.; ²Takyia, C. M.; ¹Costa, V. M. C.; ²Nasciutti, L. E.; ¹Carvalho, D. P. ¹IBCCF-UFRJ; ³Histologia e Embriologia UFRJ

Objetivo:

A prevalência de bócio é maior em mulheres do que em homens, o que sugere um possível papel do estrogênio (E2) sobre a tireóide. Este hormônio está envolvido no controle do número de células em vários tecidos, provavelmente devido ao balanço entre proliferação e morte celular por apoptose. Estudos anteriores demonstraram que o E2 pode induzir a proliferação em cultura de tireócitos (as células FRTL-5). Por outro lado, em células de carcinoma de mama e células da retina, o E2 exerce suas funções utilizando a via de insulina e IGF-1, sendo que estas vias possuem efeitos anti-apoptóticos pela ativação do substrato do receptor de insulina -1 (IRS-1). Neste trabalho, objetivamos avaliar: 1) a ação protetora do E2 sobre a linhagem de células tireoideanas PCCL3 submetidas à morte celular por H₂O₂ e 2) a importância da via de insulina/IGF-1 na proteção dos tireócitos pelo E2.

Métodos e Resultados:

Após cultivo das células por 3-4 dias em F12 com 5% de soro fetal bovino e 1mU/mL de TSH, foi adicionado benzoato de estradiol (10⁻⁹, 10⁻⁸, 10⁻⁷, 10⁻⁶ M) por 48h, sendo que nas últimas 24h foi acrescentado H₂O₂ (10⁻³ M). Essa concentração de H₂O₂ foi escolhida a partir de curva de citotoxicidade com doses de 10⁻⁶M a 10⁻²M. A viabilidade celular foi demonstrada através da técnica de MTT e a ação anti-apoptótica foi avaliada pela marcação nuclear *in situ* com DAPI. A análise de MTT mostrou que o H₂O₂ (10⁻³ M) induziu morte de 75 % da população celular inicial e

que houve proteção de em média 11,8 % pelo E2 nas diferentes doses usadas (n=12 e $p < 0,001$). Pela marcação nuclear por DAPI, parece haver proteção da morte celular por inibição da apoptose pelo E2 (10^{-6} M) devido a observação de formação de corpúsculos apoptóticos e a condensação da cromatina nuclear na presença de H_2O_2 , mas não na presença de $H_2O_2 + E2$. Resultados preliminares obtidos a partir de RT-PCR mostram aumento significativo da expressão do gene de IRS-1 na presença de E2 durante a indução de morte celular por H_2O_2 .

Conclusões:

Estes resultados sugerem que o E2 tem provavelmente uma ação protetora sobre as células tireoideanas PCCL3, e que esta ação pode envolver o IRS-1.

23.023

ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA GLOBAL ESTIMULADA POR FATORES DE CRESCIMENTO EM CÉLULAS MESANGIAIS HUMANAS (CMH). Maciel, T. T.; Campos, A. H.; Nefrologia UNIFESP

Objetivo:

Hiperplasia e/ou hipertrofia de CM exercem papel fundamental na gênese e manutenção de glomerulopatias. Fatores de crescimento ativam programas de transcrição gênica em CM, que culminam nas alterações fenotípicas mencionadas. O estímulo com soro bovino fetal (FBS) é um modelo para a análise da expressão de genes envolvidos no crescimento de CM em cultura.

Métodos e Resultados:

CMH foram cultivadas em meio DMEM com FBS a 10% até a confluência. A seguir, as CMH foram privadas de soro por 24 h, tendo-se readicionado FBS ou meio puro às culturas por 6h. A análise simultânea da expressão de aproximadamente 10.000 genes foi realizada por hibridização de cRNA com sondas contidas em sistema comercialmente disponível. As intensidades normalizadas de sinal para cada gene no grupo FBS foram comparadas às do grupo controle, e razões entre as expressões de cada gene nas diferentes situações foram geradas. Cento e quinze genes foram regulados de forma significativa ($p < 0,05$ e expressão $\geq \pm 50\%$). O gene com regulação mais acentuada foi o inibidor de diferenciação-1 (Id-1; 13,6x, $p < 0,01$). Além disso, genes anti-apoptóticos, promotores de crescimento celular e inflamação, como interleucina-8 (10,2x, $p < 0,001$), endotelina-1 (9,3x, $p < 0,05$), CTGF (4,0x, $p < 0,05$), receptor de FGF-4 (3,0x, $p < 0,05$), bFGF (2,1x, $p < 0,05$), TBX3 (2,3x, $p < 0,01$) e o oncogene VAV1 (4,9x, $p < 0,05$), foram supra-regulados pelo FBS. Por outro lado, o gene do receptor B2 de bradicinina (-2,5x, $p < 0,01$), o promotor de apoptose pirina (-2,5x $p < 0,05$), além dos supressores tumorais p33 ING1 (-2,0x $p < 0,05$) e AIM1 (-3,3x, $p < 0,05$), tiveram expressão reduzida pelo estímulo mitogênico.

Conclusões:

A estratégia adotada foi eficaz na identificação de genes relacionados ao crescimento de CM humanas em cultura. Experimentos para validação dos dados apresentados estão em curso. O estudo mais aprofundado destes genes pode contribuir para o melhor entendimento fisiopatológico, e, possivelmente, para a identificação de marcadores e/ou alvos terapêuticos para as glomerulopatias.

23.024

ESTUDO DO EFEITO DO ULTRA-SOM PULSADO EM FRATURAS DE TÍBIAS DE RATOS. ¹Fuirini Jr, N.; ¹Oliveira, A. L. O.; ¹Martinelli, T. C. P.; ¹Pastorello, G. C.; ²Barros, P. P.; ³Dotto, P. L.; ⁴Caparroz, P. G.; ³Marão, R. E. ¹Fisioterapia, PUCCamp; ²Ciências Fisiológicas PUCCamp; ³Faculdade de Ciências Farmacêuticas, PUCCamp; ⁴Ciências Médicas PUCCamp

Objetivo:

O ultra-som terapêutico tem sido utilizado com resultados bem sucedidos, em condições traumáticas, sobre o tecido fibroso cicatricial excessivo e alívio da dor. Neste trabalho foi estudado o efeito da emissão de ultra-som pulsado, em fraturas ósseas de tíbias com perda de solução de continuidade.

Métodos e Resultados:

Ratos machos Wistar (n=18), foram divididos em grupos de 2, 4 e 8 semanas estabelecidos em função do tempo de tratamento ultra-sônico. O ultra-som foi regulado no modo pulsado a 10%, com frequência de 100 Hz, transdutor de 3 MHz e intensidade de 1 w/cm² durante as 2 primeiras semanas e 2 w/cm² nas demais semanas de tratamento. A aplicação foi feita através de um

cabeçote de 2 cm² de ERA (área efetiva de radiação) por 2 minutos, em dias alternados em falha óssea produzida na tíbia da pata direita. A falha óssea na tíbia da pata esquerda foi utilizada como controle. Amostras de tecido da 2^a, 4^a e 8^a semanas pós-fratura foram retiradas e fixadas em solução de formol a 10% tamponado e radiografadas. Posteriormente, os espécimes ósseos foram descalcificados em solução saturada de EDTA para confecção de lâminas histológicas coradas com HE. Na semana 2, observou-se a proliferação do periosteio sobre infiltrado inflamatório linfocitário, vasos neoformados e colágeno não organizado, aspectos que aparecem evoluídos até a semana 8. As radiografias foram utilizadas para medições de densidade óssea. A análise estatística, utilizando o teste de Wilcoxon e intervalo de confiança para a mediana, mostrou que os valores de densidade óssea das tíbias tratadas quando comparadas com as controle diferiram significativamente ($p < 0,05$) em cada período de tratamento.

Conclusões:

O ultra-som pulsado aplicado sobre fraturas com perda de massa óssea, nas condições experimentais deste trabalho, estimulou a osteogênese em todos os períodos de tratamento.

23.025

RELAÇÃO ENTRE A MOBILIZAÇÃO DE CÁLCIO INTRACELULAR E MORTE CELULAR POR APTOSE EM ASTRÓCITOS DE RATO. Morales, A. P.; Smaili, S. S. Farmacologia UNIFESP

Objetivo:

Durante a apoptose a proteína pró-apoptótica Bax pode translocar do citosol para a mitocôndria e outras organelas que influenciam a homeostase de Ca²⁺. Não se sabe ainda qual a função da sinalização de Ca²⁺ na translocação da Bax e na morte celular. O objetivo deste trabalho foi estudar drogas que mobilizam o Ca²⁺ intra ou extracelular na morte celular programada e sua relação com a translocação de Bax.

Métodos e Resultados:

Para isso foram feitas culturas primárias de astrócitos de ratos que foram carregadas com o indicador (Fura-2) de fluorescência para Ca²⁺. Os estímulos foram feitos com ATP e Noradrenalina (NA) que podem aumentar o Ca²⁺ intracelular por vias diferentes. Em alguns experimentos as células foram transfectadas com GFP-Bax, para a visualização da translocação da proteína mediante estímulo. As imagens e medidas foram feitas em microscópio de fluorescência com câmera CCD digital de alta resolução. A morte celular foi investigada com Anexina V e iodeto de propídio por citometria de fluxo. Os agonistas, ATP e NA, promoveram oscilações de Ca²⁺ e aumentos nos transientes de maneira concentração-dependente, atingindo os efeitos máximos de 94% (ATP) e 68% (NA), em relação à fluorescência máxima com a concentração de 100 mM. O ATP e a NA causaram apoptose nas taxas de 23% e 30%, respectivamente. Na presença de Tapsigargina (TAP, 2 mM), o ATP causou 35% de morte celular e a NA, 30%. Portanto, na presença de TAP, que libera Ca²⁺ do retículo endoplasmático o efeito do ATP foi potenciado, enquanto que o da NA permaneceu semelhante.

Conclusões:

Como o ATP pode estimular receptores ionotrópicos e mobilizar Ca²⁺ extracelular, enquanto a NA mobiliza Ca²⁺ preferencialmente do retículo (assim como a TAP), é provável que a mobilização de Ca²⁺ intracelular promova ou potencialize o efeito apoptótico. Estes agonistas também parecem promover a translocação da Bax e investigaremos a relação entre esta translocação e a liberação de Ca²⁺ dos estoques intracelulares.

23.026

POSSÍVEL EFEITO ANTIPROLIFERATIVO DA BOLDINA NA LINHAGEM DE GLIOMA U138-MG.

¹Gerhardt, D.; ¹Horn, A. P. ^{**}; ¹Dillenburger-Pilla, P. ^{*}; ²Konrath, E. L. ^{**}; ¹Jacques-Silva, M. C. ^{**}; ²Henriques, A. T.; ¹Salbego, C. G.; ¹Bioquímica ICBS-UFRGS; ²Departamento de Farmácia UFRGS

Objetivo:

Os tumores cerebrais são a terceira causa mais freqüente de morte relacionada ao câncer em adultos, e, apesar do tratamento, os gliomas recorrem rapidamente, levando a uma média de sobrevivência inferior a 12 meses. Neste estudo utilizamos a boldina, um alcalóide do Boldo (*Peumus boldus*) que vem recebendo atenção devido as suas aplicações como antioxidante e

colerético. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da boldina sobre a proliferação da linhagem de glioma humano U138-MG.

Métodos e Resultados:

As células foram cultivadas em meio DMEM acrescido de 10% de soro fetal bovino e mantidas a 37°C e 5% CO₂. Estas células foram semeadas em placas de 24 poços e tratadas com boldina por 72h, nas concentrações de 1, 10, 50, 80, 100, 250 e 500 µM, com trocas do meio contendo a droga duas vezes ao dia. O número de células, analisado pela contagem em câmara de Neubauer, foi significativamente menor nas doses (µM, %controle±EP, n=6, p<0,01): 80 (33,5±9,7), 100 (32,4±11,1), 250 (35,8±8,7) e 500 (30,6±14,1). Observamos um resultado semelhante na análise das células aderidas pelo método da Sulforrodamina B (µM, %controle±EP, n=6, p<0,05): 80 (39,2±3,2), 100 (61,4±11,5), 250 (60,3±8,5) e 500 (47,8±9,3). As técnicas de análise da viabilidade celular (redução do MTT e marcação com Iodeto de Propídeo) mostraram que a boldina não causou alteração em nenhuma das doses testadas. A análise morfológica das culturas após 72h de tratamento mostra um visível aumento no núcleo das células tratadas com o alcalóide.

Conclusões:

A ausência de marcação com IP e de alterações significativas na redução do MTT, juntamente com o menor número de células observadas nas doses de boldina acima de 80µM e as alterações nucleares, sugerem uma possível ação citostática desse alcalóide, provavelmente agindo via inibição da proliferação nessa linhagem.

23.027

REGENERAÇÃO DE FIBRAS DE CIÁTICO SECCIONADO DE RATOS TRATADOS COM FATORES TRÓFICOS DE CÉLULAS GLIAIS DE MULLER. ¹Resende, V. T. R.; ²Mendez, R. M. B.; ¹Cabral da Silva, M.C.; ¹Mello, F. G.; ¹Reis, R. A. M.; ¹Mendez-Otero, R.; ¹IBCCF-UFRJ; ²IBCCF-UFRJ-HUCFF

Objetivo:

O sistema nervoso periférico é passível de regeneração. Entretanto, nem sempre a regeneração é completa morfológica ou funcionalmente. A glia de Müller é o principal representante glial encontrado na retina. Fatores retinianos secretados por essas células em cultura aumentam a sobrevivência e a neuritogênese de neurônios simpáticos (J. Neurobiology 50, 13-23, 2002) e de células ganglionares da retina (SFN Abstracts 147.19, 2003). Neste estudo, investigamos o efeito destes fatores na regeneração e sobrevivência de neurônios motores (L4 a L6) e do gânglio da raiz dorsal (GRD, L4 a L5) em um modelo de transecção e reconexão do nervo ciático de ratos adultos.

Métodos e Resultados:

Ratos Lister machos tiveram o nervo ciático direito transeccionado e conectado com tubo de polietileno (7mm) mantendo um intervalo de 4 mm entre os cotos. Nos animais experimentais, o tubo foi preenchido com 15µl de meio condicionado de células de Müller. Os controles receberam apenas DMEM/F12. Após 40 dias, cristais de Dil foram inseridos a 4mm do tubo, no coto distal do nervo transeccionado. Após seis semanas os animais foram perfundidos (PF4%) e o GRD, medula e nervo ciático removidos. Cortes foram processados para imunohistoquímica com anti-NF200 e os núcleos celulares corados com DAPI e To-Pro. A microscopia de fluorescência revelou que a densidade de axônios presente no coto distal dos nervos experimentais foi maior do que nos animais controle. Análises confocal demonstram que neurônios do GRD, pequenos, médios e grandes e motoneurônios enviaram seus axônios para o coto distal em ambas as condições experimentais. O número de neurônios Dil⁺ no GRD (L4 e L5) é significativamente (30% e 28%) maior em animais que receberam CM. Essa diferença foi de 20% para motoneurônios.

Conclusões:

Fatores tróficos presente no MC aumentaram a sobrevivência e a regeneração de neurônios do GRD, independentemente de sua morfologia. Aumentou também a regeneração axonal de motoneurônios.

23.028

NEUROPROTEÇÃO MEDIADA POR PRP^C E ST11 OCORRE POR VIAS DEPENDENTE E INDEPENDENTE DE AMPC/PKA. ¹Arruda-Carvalho, M.; ²Freitas, A. R. O.; ²Martins, V. R.; ²Brentani, R. R.; ¹Linden, R.; ¹Chiarini, L. B. ¹IBCCF-UFRJ; ²InstitutoLudwig

Objetivo:

Descrevemos que a proteína príon celular (PrP^c) exerce função neuroprotetora na retina de forma dependente de PKA (EMBO J. 21(13):3317, 2002). Demostramos que PrP^c tem como ligante a proteína *stress inducible protein 1* (STI1), e que esta ligação protege as células da camada neuroblástica (NBL) da retina da morte induzida por anisomicina (EMBO J. 21(13): 3307, 2002). Neste trabalho analisamos a expressão de STI1 na retina e investigamos as cascatas de sinalização intracelular envolvidas na neuroproteção mediada por PrP^c e STI1.

Métodos e Resultados:

A expressão de STI1 foi analisada em retinas de roedores, com diferentes idades, por imunohistoquímica e por *Western blot*. Os explantes de retina de roedores neonatos foram mantidos *in vitro* na presença ou ausência do inibidor de síntese protéica anisomicina, de peptídeo da STI1 (ligante de PrP^c) ou de anticorpos policlonais para PrP^c e STI1 (Bethyl) por 20 horas. A morte celular programada foi avaliada por detecção da condensação da cromatina (vermelho neutro ou *Sytox green*) ou pela marcação de fragmentação de DNA *in situ*. A análise da expressão de STI1 mostrou que há uma maior expressão de STI1 no tecido retiniano em desenvolvimento do que no tecido maduro. Os tratamentos com peptídeo da STI1, anti-PrP^c ou com anti-STI1 bloquearam a morte celular programada induzida por anisomicina na NBL. A inibição da via de AMPc/PKA pelo tratamento com RP-AMPc (100µM) bloqueou o efeito protetor do peptídeo da STI1 mas não impediu a neuroproteção induzida por anti-PrP^c e anti-STI1.

Conclusões:

Estes resultados indicam que PrP^c e STI1 são capazes de mediar uma neuroproteção na NBL por cascatas de sinalização distintas: por uma via dependente e outra independente de AMPc/PKA.

23.029

ATIVIDADE ANTICÂNCER E ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS PRODUZIDAS PELO ADUTO NITROGENADO OBTIDO PELA REAÇÃO BAYLLIS HILLMAN. ¹Kohn, L. K. **; ²Almeida, W. P.; ¹Antônio, M. A. ; ¹Tinti, S. V.; ³Sacoman, J. L.; ²Petinari, L.**; ⁴Genari, S. C.; ³Carvalho, J. E. ¹CPQBA-UNICAMP; ²Instituto Biologia UNICAMP; ³Biologia Celular IB-CPQBA-UNICAMP; ⁴Instituto de Biologia, UNICENP

Objetivo:

Objetivo: Determinar as alterações morfológicas induzidas pelo aduto nitrogenado de Bayllis-Hillman em linhagem de carcinoma de ovário.

Métodos e Resultados:

O aduto nitrogenado foi obtido através da reação de Bayllis-Hillman, catalisada por DABCO, entre acrilato de metila e aldeído. Os testes de atividade antiproliferativa *in vitro* foram realizados em cultura de células tumorais humanas, pelo ensaio da sulforrodamina B obtendo-se os seguintes valores de inibição (IC50): melanoma (UACC-62) - 6,3ug/mL; mama (MCF-7) - 6,0ug/mL; pulmão (NCI-460) - 31,1ug/mL; ovário (OVCAR-03) - 6,1ug/mL; próstata (PC-03) - 6,9ug/mL; rim (786-0) - 5,3ug/mL; cólon (HT-29) - 10,3ug/mL e mama resistente (NCI-ADR) - 4,9ug/mL. A análise morfológica, determinada por microscopia óptica e eletrônica, foi realizada após cultura de OVCAR-03 na presença do aduto nitro (0,25; 2,5; 25 e 250 ug/mL) por 48 horas. O derivado nitro apresentou atividade antiproliferativa com sinais de morte celular dependente da dose. Nas concentrações de 25 e 250 ug/mL houve predomínio da necrose (desestruturação celular com ruptura da membrana plasmática), enquanto que em 0,25 e 2,5 ug/mL a morte celular ocorreu por apoptose (vacuolização e diminuição do volume celular, fragmentação nuclear, vesículas apoptóticas e protusões citoplasmáticas).

Conclusões:

A atividade anticâncer e o mecanismo de morte celular dependem da concentração do aduto Nitro. Em concentrações baixas (0,25 e 2,5 ug/mL) a morte ocorre por processo apoptótico e concentrações mais elevadas (25 e 250 ug/mL) por necrose.

23.030

ATIVIDADE ANTICÂNCER IN VITRO DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DE *ANACARDIUM HUMILE* E *PHOTOMORPHE UMBELLATA*. ¹Sacoman, J. L.; ²Kohn, L. K. **; ²Foglio, M. A.; ¹Carvalho, J. E. ¹Biologia Celular IB-CPQBA-UNICAMP; ²CPQBA-UNICAMP

Objetivo:

Espécies de *Anacardium* (Anacardiaceae) e *Photomorphe* (Piperaceae) são utilizadas popularmente no tratamento de infecções e inflamações. Neste trabalho avaliou-se a atividade anticâncer dos extratos brutos e frações de *A. humile* (cajuzinho do cerrado) e *P. umbellata* (pariparoba) em cultura de células tumorais humanas.

Métodos e Resultados:

Folhas de *A. humile* e *P. umbellata* foram moídas a fresco e extraídas sob maceração com diclorometano e a seguir com etanol. Avaliou-se a atividade anticâncer dos extratos brutos diclorometânico (EBD), etanólico (EBE) e frações em cultura de células de melanoma (UACC-62), cólon (HT-29), ovário (OVCAR-3), próstata (PC-3), rim (786-O), mama (MCF-7), mama resistente (NCI-ADR/RES) e pulmão (NCI-H460), em quatro concentrações (0,25; 2,5; 25 e 250 µg/ mL). A citotoxicidade foi determinada pelo método da sulforrodamina B, obtendo-se curvas concentração-efeito. O fracionamento do EB ativo foi realizado em coluna seca de sílica e a triagem fitoquímica por cromatografia em camada delgada. O EBD de *A. humile* apresentou atividade citotóxica para todas linhagens apenas na maior concentração. O EBD de *P. umbellata* produziu inibição de crescimento e morte celular para todas as linhagens, com IC50 (µg/ mL) de: 7,9 (UACC-62); 8,0 (MCF-7); 7,5 (NCI-ADR/RES); 7,4 (786-O); 7,1 (NCI-H460); 7,8 (PC-3); 6,2 (OVCAR-3) e 7,4 (HT-29). O fracionamento desse extrato originou 7 frações, sendo que a F7 reproduziu os efeitos do EBD com seletividade para MCF-7 (IC50 5,9) e OVCAR-3 (IC50 6,9). A triagem fitoquímica do EBD revelou cumarinas, terpenos e taninos como constituintes majoritários. Ambos EBEs não apresentaram atividade significativa.

Conclusões:

Dos extratos testados, o EBD de pariparoba apresentou o melhor perfil de atividade anticâncer e por isso foi fracionado. A fração ativa apresentou seletividade para linhagens MCF-7 e OVCAR-3, fato que pode ser atribuído a presença de terpenos e ou cumarinas.

23.031

ATIVIDADE CITOTÓXICA DE SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DA MIKANIA LAEVIGATA SCHULTZ BIP. ¹Bighetti, A. E.; ²Kohn, L. K.*; ²Antônio, M. A.; ²Tinti, S. V.; ²Possenti, A.**; ²Redher, V.; ³Carvalho, J. E.; ¹Farmacologia e Toxicologia CPQBA-UNICAMP; ²CPQBA-UNICAMP; ³Biologia Celular IB-CPQBA-UNICAMP

Objetivo: Trabalhos anteriores demonstraram que o extrato bruto hidroalcoólico (EB), a fração rica em ácidos cupressênicos e caurênóico (FRA) e fração rica em ésteres (FRE), obtidos da *M. laevigata*, apresentaram atividade antiulcerogênica em diversos modelos experimentais (Phytomedicine 12: 72-77, 2005) Este trabalho teve como objetivo avaliar a citotoxicidade destes extratos e frações em diferentes linhagens celulares.

Métodos e Resultados:

A FRA (0,65g) foi obtida por partição do EB (40,0g) em acetato de etila e água enquanto a de acetato de etila (11,74g), purificada por métodos cromatográficos (colunas secas e flash). Os ácidos foram identificados por CG-EM. Os testes de atividade antiproliferativa foram realizados pelo ensaio da sulforrodamina B em cultura de células tumorais humanas de melanoma (UACC62), mama (MCF7), pulmão (NCI460), ovário (OVCAR-03), próstata (PC03), rim (786-0), cólon (HT-29) e mama resistente (NCI-ADR) e linhagens de fibroblasto murino normais (3T3, V79, MDCK, Vero). Através das curvas concentração-efeito foi realizado o cálculo da concentração inibitória 50 (IC50).

Conclusões:

Os testes demonstraram que a FRA e FRE produziram morte celular das linhagens sem qualquer seletividade, sugerindo efeito citotóxico inespecífico. Essas ações sugerem que a atividade antiulcerogênica, observada anteriormente, pode ser consequência da ativação de mecanismos de defesa direcionados para anular a toxicidade dessas substâncias.

23.032

AVALIAÇÃO DA BIOCOMPATIBILIDADE DE BIOVIDRO ATIVO POROSO. ¹Salgado, C. L.; ²Maia, R. M. M. T.; ³Bravo, C. E. S.; ⁴Almeida, R. T.**; ⁵Pereira, M. M.; ⁴Lopes, M. T. P.; ¹CBS-UFMG; ²Farmácia e Farmacologia UFMG; ³Bioquímica UFMG; ⁴Farmacologia, UFMG; ⁵Engenharia de Materiais DEMA-UFMG

Objetivo:

Avaliar a biocompatibilidade (citotoxicidade, mutagenicidade e a resposta inflamatória aguda e crônica) de um novo biovidro ativo poroso.

Métodos e Resultados:

A citotoxicidade do biovidro, contendo SiO₂ (60%), CaO (36%) e P₂O₅ (4%), sintetizado através do método sol-gel foi avaliada segundo ISO10.993-5 pelos Testes do Contato Direto e de Eluição e a viabilidade celular pelo método do MTT (sal de tetrazolium). A resposta inflamatória aguda (edema) foi estudada em ratos Holtzman sendo os volumes das patas medidos em pletismômetro Hugo Basile. A inflamação crônica (angiogênese) foi determinada pela concentração de hemoglobina (Hb) presente nos discos de biovidro implantados em camundongos Swiss. A mutagenicidade foi avaliada pelo Teste de Ames (*Salmonella. typhimurium*) com e sem um indutor enzimático.

O biovidro apresentou níveis de citotoxicidade aceitáveis nos Testes do Contato Direto e de Eluição. No entanto, o eluato do biovidro reduziu significativamente (Anova, Bonferroni, p<0,05) a viabilidade celular das linhagens. A redução em fibroblastos L929 foi de 39,79±2,06% sendo que, na diluição de 1:1 foi de 11,14±2,74%. Em células epiteliais CHO, os percentuais de viabilidade foram de 38,1±1,15%, 69,5±2,1% e 79,3±2,1% nas diluições de 1:0, 1:1 e 1:3, respectivamente. Em linhagem endotelial CPis foram de 34,22±7,42% (1:0) e 74,9±3,7% (1:1). O eluato não causou aumento significativo do volume da pata de rato (0,03±0,01 mL) assim como, não se observou aumento da vascularização no implante (1,47±0,3 µg de Hb/ mg de peso úmido). Não foi observado um aumento de reversões de *S. typhimurium*.

Conclusões:

O biomaterial estudado apresentou padrões de citotoxicidade, mutagenicidade e resposta inflamatória aceitáveis favorecendo a futura aplicação médico-odontológica.

23.033

CYTOTOXICITY STUDY OF NAPHTHOQUINONES DERIVATES ON VERO CELLS. ¹Cavalcanti, D. F. B.; ²Jorqueira, A. A.; ³Zuma, A. A.; ⁴Araújo, H. P.; ⁵Nascimento, M. C.; ⁶Ferreira, V. F.; ⁷Bourguignon, S. C. ¹Biologia Celular e Molecular UFF; ²IQ-UFF; ³FIOCRUCR; ⁴Imunologia, INCQS-Fiocruz; ⁵Química Orgânica IQ-UFF

Objetivo:

Lapachone is a very important pyranaphthoquinone obtained chemically from lapachol of the heartwood of the lapachol tree, *Tabebuia avellanedae* (Bignoniaceae), and other *Tabebuia*, both Central and South America native trees. Lapachone has a diversity of useful biological activities against various cancer cell lines such as human ovarian and prostate tumors and, at lower doses, is a radiosensitizer of several human cancer cell lines. Naphthoquinones have been extensively studied due to their activity as topoisomerase inhibitors. These enzymes are critical to DNA replication in cells. In addition, naphthoquinones have been shown to induce what are known as "reactive oxygen species" that can cause damage to cells. So, this work aims the study of different derivate lapachone cytotoxic on Vero cells.

Métodos e Resultados:

Methods - Analysis of the drugs effect on the Vero cells were done as reported by Margis et al, 1989 (Anal Biochem 181:209-211). A stock solution of substance- α-Lap, Epoxi-α-Lap, β-lap, EpoxiNβ, Ester-Sulfo, Epoxi-β-Lap Sulfo and Epoxi-Sulfo – were prepared in DMSO (1.0%). Toxic effects of the above-described substances were investigated in different concentrations [2,5; 5,0; 12,5; 25 and 50 µM] on Vero's cells. Results - Over all concentrations that were studied, β-lapachone analysis showed high cytotoxicity and killed 100% of the culture cells. Surprisingly, EpoxiN β did not show cytotoxicity in concentrations as [2,5; 5,0 and 12,5 µM], where nearly 100% of the cells were not affected. But in the 25 µM concentration, 50% were killed, and in 50 µM concentration, no cells remained alive. EpoxiN β did not show any cytotoxicity in 2,5; 5 and 12,5 µM concentrations, but in 25 µM concentration, 52% of the cells did not survive and in 50 µM concentration, they were all dead. α-Lap and Epoxi- α-Lap did not show any cytotoxicity in all studied concentrations. Ester-Sulfo also not showed any cytotoxicity in 2,5 a 12,5 µM concentrations but 32% of the cells were lysated in a 50 µM concentration. Epoxi-β-Lap Sulfo presented no cytotoxicity over all concentrations, mean Epoxi-Sulfo presented 46% and 25% cytotoxicity in 12,5 e 50 µM concentrations, respectively.

Conclusões:

Conclusion -This study demonstrates that Epoxi addition to β -lapachone and β -Nor-Lap groups greatly reduced (80%) these drugs cytotoxicity activity. A similar result occurred when a sulfoxyde group was added to β -lapachone. β -Lap-Sulfo and its ester are not cytotoxic, but Epoxi-Sulfo presented cytotoxic levels.

23.034

DETERMINAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DE TUBOS DE DIAMANTE SINTETIZADOS ATRAVÉS DA TÉCNICA DE CRESCIMENTO NA FASE VAPOR (CVD) ATRAVÉS DO TESTE DE VIABILIDADE CELULAR "IN VITRO". ¹Rodrigues A. A.; ²Baranauskas, V.; ³Belangero, W. D.; ⁴Genari SC; ²Ceragioli, H.; ²Peterlevitz, A.; ¹NMCE-UNICAMP; ²Computação UNICAMP; ³Ortopedia e Traumatologia UNICAMP; ⁴Biologia Celular IB-UNICAMP

Objetivo:

Analisar a citotoxicidade apresentada pelo diamante hidrogenado (H) e dopado com Argônio (Ar) através de ensaio indireto "in vitro"

Métodos e Resultados:

O teste de viabilidade celular pelo ensaio com MTT foi realizado em fibroblastos de Macaco Verde Africano para as 2 diferentes composições do diamante: H e Ar. As amostras do diamante foram incubadas em meio Ham F-10 com 10% de Soro fetal bovino (FBS) a 37°C por 48 horas. Foi inoculada uma suspensão celular na concentração de 3×10^5 células/ml em placas de 96 poços (Corning/Costar Corporation, Cambridge, USA) e as células cultivadas por 24 horas a 37°C. Após esse período foi adicionado o meio em que o diamante estava incubado e foi utilizado como controle positivo uma solução de Ham F-10 com 10% SFB e como controle negativo o extrato de poliestireno. Após o período de cultura, cada poço recebeu 200 μ l de meio Ham-F10 com 10mM de tampão HEPES e 50 μ l de MTT (Sigma) e a placa foi incubada no escuro por 4 horas a 37°C. Decorrido este período o meio com o MTT foi removido e 200 μ l de DMSO foi adicionado. A leitura da absorbância foi feita a 540nm e o dado obtido evidenciou o número de células viáveis para cada amostra contida na placa, indicando bons resultados para as 2 amostras analisadas.

Conclusões:

Analisando a morfologia do tecido na interface osso-diamante podemos concluir que houve melhor adesão celular no diamante com Ar, provavelmente devido sua estrutura cristalina nanométrica ter maior bioatividade na osteogênese do que o diamante com H, que tem superfície microcristalina.

23.035

EFEITO DA NICOTINA NA ANGIOGÊNESE DE ALVÉOLO DENTAL DE RATAS OVARIECTOMIZADAS. ¹Machado, G. J. R.; ²Leite, C. M.; ³Bosco, A.F.; ¹Dornelles, RCM; ¹Ciências Básicas UNESP-Araçatuba; ²Fisiologia FMRP-USP; ³Cirurgia UNESP-Araçatuba

Objetivo:

A angiogênese e o fluxo sanguíneo são essências para o crescimento, remodelação e reparo do tecido ósseo. A nicotina atua sobre estruturas em processo de reparo retardando a formação de tecido conjuntivo e osteogênese. Além da deficiência estrogênica diminuir a densidade óssea mandibular e induzir a osteoclastogênese, causa também alteração de metabolismo ósseo no processo de reparo alveolar pós-exodontia. Portanto, neste trabalho estudamos o efeito da nicotina sobre a angiogênese de alvéolo dental de ratas ovariectomizadas (OVX).

Métodos e Resultados:

Após 30 dias das cirurgias (OVX ou sham), os animais foram submetidos a 2 aplicações diárias de nicotina ou soro fisiológico durante 28 dias, constituindo os grupos: OVX/nicotina (ON) ou soro (OS) e grupo sham/nicotina (SN) ou soro (SS). No 29º dias do início das aplicações, as mesmas foram suspensas e os animais anestesiados para exodontia do incisivo central; no dia seguinte, retornaram as aplicações que continuaram até os dias das eutanásias, 7 e 14 dias pós exodontia. A maxila direita foi removida e processada para análise. Foi realizada a histometria, por planimetria de pontos, do terço médio do alvéolo e contado os vasos sanguíneos neoformados. A fração volumétrica de vasos sanguíneos foram maiores nos animais que receberam soro, aos 7 dias (SS-3.9 \pm 0.5, OS-3.1 \pm 0.8, SN-2.1 \pm 0.3, ON-2.3 \pm 0.8) e maiores nos animais que receberam nicotina, aos 14 dias (SS-1.8 \pm 0.7, OS-1.6 \pm 0.5, SN-2.7 \pm 0.7, ON-2.5 \pm 0.8).

Conclusões:

A nicotina provocou alteração na angiogênese do terço médio de ratas OVX ou sham, provavelmente devido a menor quantidade de fibras colágenas e tecido ósseo e a conseqüente manutenção de vasos sanguíneos no interior do alvéolo.

23.036

ESTUDO DA INTERFACE ÓSSEA DE TUBOS DE DIAMANTE IMPLANTADOS NA REGIÃO INTERCONDILIANA DE RATOS DA LINHAGEM WISTAR. ¹Rodrigues, A. A.; ²Baranauskas, V.; ³Belangero, W. D.; ³Figueira, E. R.; ¹Batista, N. A.; ²Ceragioli, H.; ²Peterlevitz, A.; ¹Faculdade de Computação, UNICAMP / Núcleo Medicina e Cirurgia Experimental NMCE-UNICAMP; ^{2, 6, 7} Computação UNICAMP; ³Ortopedia e Traumatologia UNICAMP

Objetivo:

Avaliar a interação de tubos de diamante hidrogenado (H) e dopado com argônio (Ar) na região intercondiliana de ratos Wistar

Métodos e Resultados:

Foram utilizados 12 ratos machos com 12 semanas e 300g, fornecidos pelo Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica-UNICAMP. Foram divididos em 2 grupos (A e B) com n= 6 e tempo de seguimento de 6 e 7 semanas. No grupo A foi implantado o diamante com H e no B o diamante com Ar. Utilizando uma furadeira com fio de Kirschner foi provocado um defeito com 10mmx0.8mm na região intercondiliana onde os tubos com as dimensões do defeito foram implantados. Decorrido o período de seguimento os animais foram sacrificados e os fêmures retirados. O material obtido foi fixado em formol 10%, descalcificado em ácido nítrico 5% e os tubos removidos fixados em álcool 70% e submetidos à Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) para análise da superfície pós-implante; enquanto os fêmures foram incluídos em parafina, obtidos cortes histológicos e corados pela técnica de Hematoxilina Eosina e Tricrômico de Masson. A análise macroscópica e histológica mostraram ausência de necrose e processo inflamatório em ambos os grupos indicando compatibilidade com o tecido receptor independente do tempo de seguimento. Através da MEV dos tubos de diamante H foi observado crescimento de uma delgada camada tecidual. Já nos implantes de Ar foi possível observar uma espessa camada de tecido neoformado recobrimdo toda superfície tubular.

Conclusões:

Analisando a morfologia do tecido na interface osso-diamante podemos concluir que houve melhor adesão celular no diamante com Ar, provavelmente devido sua estrutura cristalina nanométrica ter maior bioatividade na osteogênese do que o diamante com H, que tem superfície microcristalina.

23.037

GANGLIOSIDE REMODELING AND CELL SURVIVAL. ¹Andrade, L. N. S.; ²Otake, A. H.; ²Duarte, A. P. M.; ³Li, Y.-T.; ²Chammas, R.; ¹Oncologia Experimental USP; ²Radiologia USP; ³York University Canadá

Objetivo:

Specific enzymes convert GM3 into more complex gangliosides, like GM2 and the disialogangliosides GD3 and GD2, which are known melanoma-associated antigens. While some reports suggested that gangliosides induce cell death, it is intriguing that melanoma cells accumulate these molecules upon progression. Here we compared the sensitivity of both normal and tumor cells to the induction of cell death in the presence of tumor-associated gangliosides.

Métodos e Resultados:

Exogenous GM2 raised the percentage of annexin V positive human fibroblasts treated with staurosporine but reduced caspase activation, delaying the progression of apoptosis in these cells. On the other hand, this ganglioside protected the non tumorigenic melanocyte cell line from staurosporine, reducing the number of annexin-V positive cells, decreased caspase activation and the percentage of cells with fragmented DNA. In the murine melanoma cell line, TM1, GM2 did not increase staurosporine-induced cell death while the melanoma ganglioside GD3 did. We next used a TM1 transfectant which showed increased expression of both GD3 and GM2/GD2 synthase genes (TM1.ST8). TM1.ST8 cells did not sustain high expression levels of GD3, despite the fact that the ectopic gene was actively transcribed. Therefore, we proposed that cells expressing GD3 would be negatively selected unless this ganglioside was further modified by GM2/GD2 synthase,

e.g. Preliminary results indicated de novo expression of GM2/GD2 synthase gene in TM1.ST8 cells, which could explain at least in part the absence of GD3 in these cells.

Conclusões:

Ganglioside remodeling in tumor cells may interfere with tumor cell survival. Besides, we showed that apoptosis signaling can be modulated by GM2 in normal and malignant cells and the biological effect depends on cell machinery.

23.038

INFLUÊNCIA DA INIBIÇÃO DA ÓXIDO NÍTRICO SINTASE SOBRE A ATIVIDADE ANTICÂNCER DE ADUTOS DE BAYLIS-HILLMAN. ¹Kohn, L. K.; ²de Fátima, A. ^{*}; ¹Antônio, M. A.; ¹Tinti, S. V.; ³Almeida, W. P.; ⁴Carvalho, J. E. ¹CPQBA-UNICAMP; ²IQ-UNICAMP; ³IB-UNICAMP; ⁴Biologia Celular IB-CPQBA/UNICAMP

Objetivo:

Os adutos de Baylis-Hillman apresentam atividade antiproliferativa principalmente quando o aduto apresenta o substituinte nitro no anel aromático. Neste trabalho, foi investigado a influência dos inibidores de óxido nítrico sintase (NOS), NG-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) e aminoguanidina (AMG), na atividade deste aduto em células tumorais

Métodos e Resultados:

A atividade antiproliferativa deste aduto foi avaliada em cultura de células tumorais humanas de mama (MCF-7), pulmão (NCI-460), melanoma (UACC-62), próstata (PC-03) e rim (786-0) em diferentes concentrações (0,25 a 250 ug/mL), com pré-tratamento dos inibidores da NOS na concentração de 3 mM. A doxorrubicina foi usada como controle positivo. Após 48 h do tratamento, a proliferação celular foi determinada, através de método colorimétrico empregando sulforodamina B. Na concentração de 25 ug/mL, L-NAME e AMG diminuíram a atividade antiproliferativa do aduto. L-NAME reduziu significativamente a atividade em 50% sendo que este efeito não foi encontrado na presença de AMG. Nas demais linhagens apresentaram de maneira geral redução do crescimento celular na presença de AMG em relação a L-NAME

Conclusões

A atividade antiproliferativa do aduto foi comprometida pela adição de L-NAME ou de AMG o que nos proporciona evidências da participação da NOS no mecanismo de ação desta substância.

23.039

SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA DA (R)-GONIOTALAMINA E DERIVADOS SOBRE CÉLULAS TUMORAIS HUMANAS. ¹Kohn, L. K.; ²de Fátima, A. ^{*}; ¹Antônio, M. A.; ³Tinti, S. V.; ⁴Carvalho, J. E.; ²Pilli, R. A.; ¹CPQBA-UNICAMP; ²IQ-UNICAMP; ³IB-UNICAMP; ⁴Biologia Celular IB-CPQBA-UNICAMP

Objetivo:

A (R)-goniotalamina (ADF6) é uma estiril lactona isolada de espécies do gênero Goniothalamus que apresenta considerável atividade antiproliferativa sobre células cancerígenas. Recentemente nós descrevemos a síntese total da ADF6 e obtivemos os compostos abaixo apresentados e neste trabalho avaliamos as suas atividades antiproliferativas sobre células de câncer humano.

Métodos e Resultados:

A atividade antiproliferativa foi avaliada em culturas de células tumorais de mama (MCF-7), pulmão (NCI 460), melanoma (UACC-62), próstata (PC-O3), ovário (OVCAR-03), rim (786-0), cólon (HT-29) e mama resitante (NCI-ADR). Os compostos ADF2, ADF4, ADF6 e ADF8 foram adicionados em concentrações entre 0,25 e 250 ug/mL e doxorrubicina (DOX) foi usada como controle positivo. Após 48h do tratamento, a proliferação celular foi determinada, através do método da sulforodamina B. Os valores de IC50 foram determinados e são apresentados na tabela 1. No que se refere aos compostos ADF6 e ADF8 que apresentam ambos uma dupla ligação exocíclica E e Z, respectivamente. O composto ADF6 é o mais ativo do que o ADF8 para seis das oito linhagens avaliadas, enquanto o ADF8 é mais para as linhagens PC-O3 e OVCAR-03. Para todas as linhagens testadas o composto ADF2 é mais ativo que o ADF4.

Conclusões: A dupla E e a presença de um anel aromático mostrou ser essencial para a atividade dos compostos testados em especial a (R)-goniotalamina (ADF6) que conjuga em sua estrutura todos estes pré-requisitos.

23.040

VIABILIDADE DE TRATAMENTO COM GM1 INTRAPERITONEAL POR 7 DIAS CONSECUTIVOS APÓS ABLAÇÃO DE COLÍCULO SUPERIOR EM RATOS NEONATOS. Oliveira, T. F. B.; Neckel, L.; Nakatani, M. Biofísica CCS-UNIOESTE

Objetivo:

A descoberta de novos tratamentos pós-traumáticos para aumento da sobrevivência de neurônios é de importância indiscutível. Este trabalho tem por objetivo testar a viabilidade do tratamento de ratos neonatos pós-cirurgia com injeções intraperitoneais de GM1 durante 7 dias.

Métodos e Resultados:

É feita uma microcirurgia de ablação dos colículos superiores em ratos neonatos de um dia de vida, da variedade Lister Hooded. É feita uma incisão na pele do animal, esta é rebatida para as laterais, corta-se a cartilagem craniana e removem-se os colículos superiores por sucção. A cartilagem e a pele são recolocadas no local e a pele é colada com "Super Bonder". Os ratos são colocados em "banho-maria" até se recuperarem e são devolvidos às suas mães. Os ratos compõem os grupos. Salina: que recebe injeções intraperitoneais de 20µL de solução de cloreto de sódio 9 g/L. GM1: que recebe injeções intraperitoneais de 20µL de GM1 (monosialogangliosídeo) 100ng/mL. Sem cirurgia: que não foram submetidos à cirurgia. Com cirurgia: que foram submetidos à cirurgia sem administração de tratamento. Injetados: somente sofreram a introdução da agulha da seringa, sem receberem drogas ou serem operados. Todos os grupos foram manipulados diariamente. Os sem cirurgia apresentam uma sobrevida de 100% (n=10) em sete dias. Os com cirurgia sem tratamento apresentam 69%±12.42 (n=70) aos sete dias. Os GM1 apresentam 23% (n=30) de sobrevida em seis dias com uma taxa de 20%±17.98 já no terceiro dia. Os Salina apresentam uma sobrevida de 25% (n=23) em seis dias com uma taxa de 43%±19.21 já no terceiro dia. Os injetados apresentam sobrevida em sete dias de 100% (n=8).

Conclusões:

Mesmo o GM1 já tendo sido utilizado no tratamento pós-traumático do sistema nervoso de humanos, a conclusão em que chegamos é que o GM1 deve ser a causa da morte dos ratos, apresentando certa toxicidade, pois os grupos com os ratos que somente sofreram a introdução da agulha sobreviveram sem problemas.