

- Canais e Transporte

28.001

EFEITO DO HgCl₂ NA REDUÇÃO REGULATÓRIA DE VOLUME EM CÉLULAS DE MELANOMA MURINO S-91. Malta-Silva, J. F.; ² Valotta, L. A.^{**}; ¹ Fisiologia, Instituto de Biociências da USP; ² Fisiologia - IB, Instituto de Biociências da USP

Objetivo:

A maioria das células submetidas a choques hiposmóticos agudos sofre rápido inchamento seguido de lenta redução regulatória de volume (regulatory volume decrease, RVD), resultado do efluxo de solutos intracelulares e do efluxo acoplado de água. Neste estudo descrevemos o efeito de HgCl₂, um bloqueador de aquaporinas (AQP), em células de melanoma murino S-91 após a exposição a choque hiposmótico agudo.

Métodos e Resultados:

Células de melanoma murino S91, foram mantidas em meio de cultura F12 HAM (290 mOsm.kgH₂O⁻¹). Medidas morfométricas das mudanças relativas de volume foram realizadas usando um sistema de aquisição e análise de imagens (Image Pro-Lite, Media Cybernetics). O choque hiposmótico agudo (190 mOsm.kgH₂O⁻¹) resultou em um aumento imediato no volume celular (27%), seguido de RVD até a linha de base em até 30min. Quando essas células foram expostas a esse choque hiposmótico agudo na presença de diferentes concentrações de HgCl₂ observou-se que: i) não houve diferenças significativas em relação ao controle (0,001 μ M e 0,01 μ M); ii) não houve alterações significativas de volume no tempo do experimento (0,1 μ M e 1 μ M); e iii) houve aumento e regulação do volume celular, embora com diferenças tanto em relação aos valores relativos quanto em relação a cinética de RVD (5 μ M, 10 μ M, 100 μ M e 1000 μ M , ANOVA, p < 0,05, n = 120 células).

Conclusões:

Esses resultados indicam que HgCl₂ modula a permeabilidade osmótica de uma forma bifásica, inibindo em doses menores (0,1-1 μ M) e restabelecendo ou mesmo aumentando em concentrações maiores (5-1000 μ M), possivelmente em razão da presença das aquaporinas AQP1 e AQP6.

28.002

THE INHIBITORY EFFECT OF PCALC36 ON Na,K-ATPASE IS INFLUENCED BY DTT BUT NOT BY ASCORBIC ACID. ¹Pôças, E. S. C.; ¹Pimenta, P. H. C.*; ¹Berendonk Leitão, F.*; ²Vilela, G. V. M. A.**; ²Matta, T. A.*; ²Silva, A. J. M.; ²Costa, P. R. R.; ¹Noël, F.; ¹Farmacologia Básica e Clínica ICB-UFRJ; ³NPPN-UFRJ

Objetivo:

We previously reported that the synthetic coumestan PCALC36 inhibits rat Na,K-ATPase by a mechanism different from cardiac glycosides. The aim of this work was to evaluate the influence of antioxidant substances on the inhibition promoted by PCALC36 in order to obtain more information about its mechanism of action.

Métodos e Resultados:

The Na,K-ATPase activity was measured in enriched rat kidney preparations, in the absence or presence of 30 μM PCALC36 . The influence of antioxidants on PCALC36 inhibition was evaluated with 1 or 5 mM dithiothreitol (DTT) and 200 or 400 μM ascorbic acid. The molecular modeling software Spartan'02 was used to compare the energy of the frontier molecular orbitals and atomic coefficients of PCALC36 versus DTT or ascorbic acid. The addition of DTT did not affect the Na,K-ATPase activity or the ouabain inhibition. However, the inhibition promoted by 30 μM PCALC36 was decreased with the addition of 1mM and 5 mM DTT (41.1±7.17 and 16.0±12.8%inhibition, respectively). On the contrary, the addition of ascorbic acid did not affect the inhibition promoted by PCALC36. Higher concentrations of ascorbic acid could not be used because they inhibit the Na,K-ATPase activity, achieving 100% inhibition at 1 mM. The semi-empiric method (AM1) of SPARTAN'2 software showed that the reduction of PCALC36 by DTT is energetically favourable. On the other hand, ascorbic acid can not reduce PCALC36, corroborating with the enzymatic assays.

Conclusões:

Our results indicate that the interaction between PCALC36 and the Na,K-ATPase depends on redox reactions, probably on reduced sulphhydryl groups important to the enzymatic activity.

28.003

MUTAÇÃO NO RECEPTOR DE HORMÔNIOS TIREÓIDEO DIMINUI A EXPRESSÃO GÊNICA RENAL DO CANAL DE CLORETO CLC-2. Ornellas, D. S.; Gomes, A. C. S.; Ortiga-Carvalho, T. M.;⁴ Morales, M. M. IBCCF-UFRJ

Objetivo:

Recentemente, observamos que hormônios tireóideos (HT) modulam também a expressão renal do CIC-2 (J Endocrinol. 178(3):503-11, 2003), porém os mecanismos pelos quais essa modulação ocorre não foram elucidados.

1) Verificar se a região promotora do CIC-2, em células (derivadas de túbulos proximais de ratos) é modulada pelos HTs; 2) Verificar o tipo de receptor para HT envolvido na modulação do CIC-2.

Métodos e Resultados:

a) análise da região promotora: Células IRPTC (células imortalizadas de túbulo proximal de rim de ratos) transfectadas por lipofectamina 2000® com plasmídeos contendo a região promotora do CIC-2 associado ao gene da luciferase e tratadas com tiroxina a 10^{-7} , 10^{-6} e 10^{-5} M por 24h.

b) análise do envolvimento dos receptores de HTs: foram utilizados camundongos com mutação no receptor β de hormônios tireóideos (TR- β) por recombinação homologa (heterozigotos e homozigotos). Esta mutação no TR- β leva a um estado hipotireóideo, independente das concentrações circulantes destes hormônios. Cinco animais de cada genótipo receberam água a 0,1% metimazole (droga que inibe a síntese de HTs) por 45 dias. A expressão do RNAm do canal de cloreto CIC-2 foi analisada através RT-PCR. A expressão da proteína do CIC-2 foi quantificada por *immunoblotting* utilizando anticorpo monoclonal anti-CIC.

A expressão renal do RNAm do CIC-2 apresentou-se diminuída, quando comparados com o grupo controle, em animais tratados com metimazole (MET) [selvagens+MET – redução de 30%, Heterozigotos+MET de 27% e em Homozigotos+MET de 43% ($p < 0,05$, $n=5$)]. A proteína do CIC-2 também apresentou redução de sua expressão em animais tratados com metimazole, quando comparada com o do grupo controle (selvagens+MET – redução de 40%, Heterozigotos+MET de 43% e Homozigotos+MET de 55%). Foi também observado o estímulo da região promotora do CIC-2 quando células IRPTC foram tratadas com HT nas concentrações de 10^{-9} M, 10^{-8} M e 10^{-7} M, com aumentos de, respectivamente 51,5%, 40,5%, 45,3% da expressão basal ($p < 0,05$, $n=8$).

Conclusões:

Estes resultados sugerem a participação do TR- β na modulação da expressão renal do CIC-2 por hormônios tireóideos via região promotora.

28.004

EXPRESSÃO GÊNICA DO CANAL DE CLORETO CFTR EM CÉLULAS MDCK-I MODULADA POR ARGININA VASOPRESSINA VIA RECEPTOR V_2 Barbosa, C. M. L.; Novaira, H. J. **; Morales, M. M. IBCCF-UFRJ

O hormônio arginina vasopressina (AVP) é liberado em condições de aumento da osmolaridade plasmática e sua ação depende da ligação aos receptores V_1 e V_2 podendo induzir a transcrição gênica de transportadores dentre eles o canal de cloreto CFTR expresso nos epitélios renais, pulmonares, pancreáticos e do aparelho reprodutivo. Mutações nesse canal levam à fibrose cística, doença caracterizada por anormalidades severas afetando principalmente os pulmões. Curiosamente, os rins, que abundantemente expressam CFTR, não são acometidos. Nosso objetivo foi elucidar a modulação da expressão gênica do CFTR pelo AVP em células MDCK-I.

Métodos e Resultados:

Foram utilizadas células MDCK-I, derivadas de rim canino tratadas por 24 h a 37°C com AVP [10^{-8} M] e antagonistas específicos para os receptores V_1 e V_2 [10^{-5} M]. Após tratamento, a expressão do RNAm do CFTR foi estudada por RT-PCR semi-quantitativo observando-se um aumento de 114% em células tratadas com AVP em relação ao controle ($n=4$, $p < 0,05$). Um aumento de 111% também foi observado em células tratadas com AVP e antagonista de V_1 ($n=4$, $p < 0,05$). Nos demais grupos não foram observadas variações significativas da expressão gênica do CFTR em relação ao controle. Para demonstrar a ativação da região promotora do gene do CFTR pelo AVP, foi realizada uma co-transfecção transiente das células MDCK-I com LipofectAMINE® 2000 dos

plasmídeos contendo o promotor do gene do CFTR e pSV- β -galactosidase (β -gal) para controle interno. Depois do tratamento por 24h com AVP, foi observado um estímulo da região promotora de 19% quando tratadas com AVP [10^{-9} M] e de 21% quando tratadas com AVP [10^{-8} M] (n=4, $p < 0,01$)

Conclusões:

Os resultados obtidos sugerem a participação do receptor V_2 na cascata de sinalização gerada pelo AVP modulando a expressão gênica do CFTR em células MDCK-I pela ativação da região promotora.

28.005

VIAS DE SINALIZAÇÃO ENVOLVIDAS COM O EFEITO ESTIMULATÓRIO DA PRIVAÇÃO DE SORO SOBRE A ISOFORMA 1 DO PERMUTADOR Na^+/H^+ DE CÉLULAS TUBULARES PROXIMAIS. Carraro-Lacroix, L. R.; Rebouças, N. A.; Malnic, G.; Fisiologia e Biofísica ICB I-USP

Objetivo:

Neste trabalho, procuramos estudar as vias de sinalização envolvidas com o efeito estimulatório observado quando da privação de soro do meio de cultura celular sobre a atividade de NHE1, através de abordagens funcionais.

Métodos e Resultados:

Com este propósito, o pH intracelular (pH_i) foi medido em monocamadas de células cultivadas sobre suportes impermeáveis utilizando o probe sensível a pH, BCECF e um microscópio de epifluorescência invertido. Estas células tem um pH_i basal de 7.10 ± 0.013 (n=14) e após um pulso ácido com NH_4Cl , o pH_i é recuperado em uma velocidade (dpH_i/dt) de 0.29 ± 0.022 unidades de pH_i/min (n=14) sob condições normais de crescimento e com uma velocidade de 0.50 ± 0.024 (n=14) unidades de pH_i/min (n=14) em células privadas de soro por 24 horas antes dos experimentos ($p < 0.001$). Esta estimulação em células privadas foi inibida quando da utilização de genisteína (10 μM), um inibidor de tirosina quinase, tendo o dpH_i/dt alcançado o valor de 0.32 ± 0.043 unidades de pH_i/min (n=7), que não é significativamente diferente daquele obtido em células não privadas. Da mesma forma, o efeito estimulatório foi revertido após incubação das células com U0126 (10 μM), um inibidor de MAPKKinase, atingindo o dpH_i/dt de 0.36 ± 0.047 (n=7) unidades de pH_i/min . Por fim, após a utilização de actinomicina D (0.1 μM) e cicloheximide (40 μM), inibidores de transcrição e tradução, respectivamente, o efeito estimulatório da privação de soro também foi inibido, tendo os dpH_i/dts atingido os valores de 0.37 ± 0.037 (n=8) e 0.38 ± 0.018 (n=8) unidades de pH_i/min .

Conclusões:

Estes resultados mostram que a privação de soro do meio de cultura celular estimula o permutador Na^+/H^+ através de uma modulação transcricional e traducional, cuja via de sinalização envolve a ativação de tirosina quinases e MAPKKinases.

28.006

CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DOS RECEPTORES NICOTÍNICOS EXPRESSOS EM CÉLULAS DA LINHAGEM PC12. Setti-Perdigão, P.; Castro, N. G. Farmacologia Básica e Clínica ICB-UFRJ

Objetivo:

Os receptores de acetilcolina nicotínicos (RACHN) estão envolvidos em certas patologias como Alzheimer e agonistas nicotínicos possuem atividade neuroprotetora, tornando a o estudo dos receptores nicotínicos e seus ligantes um passo importante para o tratamento dessas doenças e de acidentes vasculares cerebrais.

Métodos e Resultados:

Nesse estudo utilizamos células PC12 que expressam RACHNs neuronais funcionais. Devido à variabilidade de RACHNs expressos em diferentes populações de PC12, foi necessária uma caracterização prévia utilizando-se acetilcolina (ACh) e colina e os antagonistas mecamilamina (MEC) e metilcaconitina (MLA). Foram utilizadas a técnica de patch clamp na configuração célula inteira e medidas do influxo de cálcio com corantes fluorescentes. Correntes eliciadas por colina 10 mM equivaliam a $10,3 \pm 1,7\%$ (n=3) das geradas por ACh 1 mM na mesma célula. As correntes geradas por ACh 1 mM eram sensíveis à MEC 1 μM (bloqueio de $71,8 \pm 12,0\%$, n=9) e o

componente insensível à MEC também foi insensível a MLA 1 nM (bloqueio de $21,9 \pm 8,2\%$, $n=3$). Correntes geradas por colina 10 mM foram parcialmente sensíveis à MEC ($73,19 \pm 3,03\%$, $n=2$) e insensíveis à MLA ($-4,71 \pm 13,84\%$, $n=2$). O MLA diminuiu a taxa de dessensibilização das correntes geradas por ACh, aumentando a área sob a curva e portanto a quantidade total de íons que entrou na célula. Esse efeito potencializador não é esperado para o MLA, que é um antagonista dos receptores nicotínicos. O estímulo por ACh 100 μ M promoveu a entrada de cálcio nessas células mesmo com a voltagem transmembrana fixa.

Conclusões: Os dados sugerem que essas células expressem RACHNs, provavelmente uma população mais numerosa ($\alpha 3^*$) e uma menos numerosa (um heterômero contendo a subunidade $\alpha 7$). Essas células poderão ser utilizadas para a triagem de novos ligantes nicotínicos além de outros estudos sobre a ação neuroprotetora dos subtipos dos RACHNs.

28.007

LOCALIZAÇÃO DA ISOFORMA ALFA-3 DA Na^+, K^+ -ATPASE NO ELETRÓCITO DO *E. ELECTRICUS* (L.). Dias, J. S.; Ribeiro, M. G. L. **; Lowe, J.; Hassón Voloch, A.; IBCCF-UFRJ

Objetivo:

A Na^+, K^+ -ATPase é uma proteína integral de membrana responsável pelo transporte de sódio intracelular por potássio extracelular, um transporte ativo, graças à hidrólise de ATP. É inibida por drogas cardiotônicas, especificamente pela ouabaína. Estruturalmente, a Na^+, K^+ -ATPase é formada por duas subunidades, α e β , e em algumas espécies, foi caracterizada uma γ -subunidade (J Cell Biol. 121: 579-86, 1993). Foram descritas quatro α -isoformas, $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ e $\alpha 4$, e três β -isoformas, $\beta 1$, $\beta 2$ e $\beta 3$. A subunidade α (PM~100 kDa) é responsável pela hidrólise de ATP, pelos sítios de ligação para os cátions e inibidores específicos, sendo assim reconhecida como a subunidade catalítica. A subunidade β (PM~35 kDa) desempenha papel crucial na formação, estabilização e maturação da holoenzima, podendo regular a atividade enzimática. Estudos recentes demonstraram, através de imunohistoquímica e western blotting, que a isoforma $\alpha 1$ da Na^+, K^+ -ATPase está presente somente na membrana inervada (P3) no eletrócito do órgão elétrico principal do *E. electricus* (L.), enquanto que a isoforma $\alpha 2$ encontra-se localizada somente na membrana não-inervada (P2) (Biochim Biophys Acta;1661: 40-6, 2004). O objetivo deste trabalho é a verificação e localização da isoforma $\alpha 3$ nas diferentes faces do eletrócito.

Métodos e Resultados:

As frações de membrana P2 e P3 são obtidas pelo método de descrito por Somló et al. (Cell Tissue Res.185: 115-28,1977). As concentrações de proteína são determinadas pelo método de Lowry et al. (J. Biol Chem. 193: 265-75, 1951), utilizando o reagente de folin e albumina bovina 0,1% como padrão. A concentração de proteína da fração de membrana não- inervada (P2) é igual a $18,55 \pm 1,32$ mg/ml e da fração de membrana inervada (P3) é de $24,85 \pm 1,63$ mg/ml. A atividade específica da ATPase é obtida pelo método de Somló e Hassón-Voloch (Int J Biochem.19: 17-21, 1987) onde o Pi formado é determinado pelo método de Fiske-Subarow (J. Biol. Chem. 66: 375-400, 1925). Os valores obtidos da atividade da Na^+, K^+ -ATPase das frações de membrana P2 e P3 foram respectivamente: $3,93 \pm 0,86$ μ moles de Pi x min^{-1} x mg de ptn⁻¹ e $3,52 \pm 0,55$ μ moles de Pi x min^{-1} x mg de ptn⁻¹. Após a obtenção das frações de membrana P2 e P3, estas amostras são submetidas a um gradiente descontínuo de sacarose com concentrações de 26%, 34%, 42% e 50%. Após a centrifugação, o gradiente é coletado em alíquotas de 0,5 mL, a partir do topo. As amostras correspondentes aos picos de atividade ATPásica são submetidas a SDS-PAGE 10 % e a expressão da subunidade $\alpha 3$ foi determinada por western blotting, utilizando anticorpo policlonal anti- $\alpha 3$ na concentração 1:1000. Os resultados obtidos comprovam a expressão da isoforma $\alpha 3$ na face inervada e na face não-inervada do eletrócito do *E. electricus* (L.).

Conclusões:

O eletrócito, a unidade funcional do órgão elétrico do *E. electricus* (L.) expressa as três isoformas da subunidade α da Na^+, K^+ -ATPase. Este trabalho demonstra a expressão da isoforma $\alpha 3$ em ambas as faces do eletrócito. Estudos de imunohistoquímica estão sendo realizados para determinar a localização *in situ*.

28.008

EFEITO DO EXTRATO DE *CABRALEA CANJERANA* SOBRE A PROTEÍNA PDR5P. ¹Rangel, L. P.; ²Abreu, L. F.**; ²Leitão, G. G. ¹Ferreira-Pereira, A.; ¹Microbiologia Geral, UFRJ; ²NPPN-UFRJ

Objetivo:

A resistência a múltiplas drogas (MDR) é um fenômeno que dá origem a células altamente resistentes a diversos quimioterápicos de estruturas e funções diferentes e pode ocorrer devido à superexpressão de transportadores da família ABC. Dentre elas, temos a proteína Pdr5p de *Saccharomyces cerevisiae*. Uma estratégia para a reversão deste quadro é a busca de novos inibidores para estes transportadores. O estudo fitoquímico de diferentes espécies de plantas pode possibilitar a descoberta de novos fármacos de origem natural. Neste trabalho, estudamos o efeito inibitório do extrato (bem como de suas frações) de *Cabralea canjerana*, uma planta encontrada na Mata Atlântica, sobre a atividade ATPásica da Pdr5p.

Métodos e Resultados:

O efeito do extrato etanólico obtido das folhas de *C.canjerana* foi avaliado em uma concentração de 200µg/mL sobre a atividade ATPásica (J. Biol. Chem. 269:12797, 1994) da proteína Pdr5p, presente em membranas plasmáticas. Em seguida, este extrato foi particionado nos solventes hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol e as frações obtidas foram testadas. O extrato bruto promoveu uma inibição da atividade, em percentual, de $75,39 \pm 1,67$ (média \pm erro padrão, n=3), quando comparado ao controle. A partição mais eficiente, em diclorometano, promoveu uma inibição, em percentual, de $82,38 \pm 0,85$ (média \pm erro padrão, n=3) e, portanto, a mesma foi submetida a cromatografia contracorrente, o que permitiu o isolamento de diversas substâncias, que estão sendo identificadas e terão seus efeitos sobre a Pdr5p estudados posteriormente.

Conclusões:

Com os resultados obtidos até o momento, podemos concluir que determinados compostos extraídos de *C. canjerana* podem agir como inibidores da Pdr5p, o que torna o estudo dos mesmos bastante promissor.

28.009

COULD A MOLECULE WHOSE SIZE IS LARGER THAN A PORE PASS THROUGH IT? Krasilnikov, O. V.; Rodrigues, C. G.; Biofísica e Radiobiologia UFPE

Objetivo:

The developing of a new generation sensor based on the stochastic principles is one of the challenges of nanoscience. To that end, several laboratories in the world are designing appropriate nanometrical “tubes” and creating the library of the “molecular signatures” - traces of pharmacological agents during its interaction with the sensor. In the present study we have focused our attention on methyl- β -cyclodextrin (M β CD, diameter of \sim 1.55 nm) whose interaction with a single pore could be time resolved. A single channel formed by alpha-Hemolysin of *Staphylococcus aureus* was used as a proteic nanoscopic pore with an average diameter of \sim 2 nm and a constriction (\sim 1.2 nm) near the center.

Métodos e Resultados:

Experiments were done under voltage-clamp. We have shown that the entering of a single M β CD-molecule into a channel is accompanied by a decrease in the channel conductance (blockage). Duration of these blockages is varied in several orders of magnitude (from ms to s). There are two levels of “blocked” conductance with the residual value of \sim 20% and \sim 7% for the first and the second state at 80 mV, respectively. The blockages show a rich structure and may be separated in several types, which could be associated with different results of M β CD-pore interaction seen as a different sequence in conductance changes. There are at least three types of event appearances and one of them could be correctly described with a kinetic scheme admitting the complete transit M β CD through the channel. The Poisson Statistical analysis of the distribution of events among neighboring time-intervals supports this idea and indicates that the most of molecules (although larger than the size of the pore constriction) only enter the pore once to transit via the pore.

Conclusões:

The analysis of the fine structure of the individual blockage events and the Poisson statistics are useful tools to characterize the transport of large molecules through nanoscopic pores. It appears that at nanoscopic scale a “large” molecule is able to pass through the narrower pore. The elasticity and flexibility of the pore and M β CD may be a basis for such phenomenon.

28.010

CARACTERIZAÇÃO DA ISOFORMA 4 DO PERMUTADOR NA/H EM CÉLULAS T84 ¹Beltran, G. A. R.; ²Ramirez, M. A.; ¹Hiraki, Y.; ¹Malnic, G. ¹Fisiologia e Biofísica ICB I-USP; ²Fisiologia Universidad de Antofagasta

Objetivo:

Avaliar através de abordagens funcionais e moleculares a presença da isoforma 4 do permutador Na/H (NHE4) em células T84.

Métodos e Resultados:

O pH intracelular foi medido em monocamadas de células utilizando BCECF e um microscópio de fluorescência invertido. Além disso, foram sintetizados primers para NHE4 humano, para detectar o mRNA desta isoforma em células T84 por RT-PCR. Além disso, medimos o volume celular através de microscopia confocal.

O RT-PCR mostrou a presença de mRNA para a hNHE4 nas células T84. NHE4 foi avaliada na presença de HOE 694(25 μ M-inibe NHE 1-2) após o pulso ácido. Nestas condições o fluxo de hidrogênio(J_{H^+}) foi de 1,59 \pm 0,11mM/min;n=18 vs Controle=3,68 \pm 0,14mM/min;n=33). Quando substituímos o Na⁺ por gluconato de K⁺, observamos um aumento da velocidade de recuperação do pHi (Na⁺=0,060 \pm 0,065;n=6 vs K⁺=0,080 \pm 0,0059;n=6 pHi/min), efeito não observado em células PS120, transfectadas com NHE1(Na⁺=0,16 \pm 0,026;n=7 vs K⁺=0,064 \pm 0,015;n=6 pHi/min). Em solução sem Cl⁻, observamos um aumento do J_{H^+} de NHE4 quando comparado com seu controle (0Cl⁻+HOE=2,28 \pm 0,076;n=10 vs HOE=1,58 \pm 0,21mM/min;n=8). Este efeito foi observado também na presença de 1mM de furosemide, um inibidor do cotransporte Na/K/2Cl, e foi inibido na presença de 10 μ M NPPB, um inibidor de canais de cloreto. O aumento da atividade de NHE4 foi devido à redução em 20% \pm 1,4,n=9 do volume celular quando as células foram expostas à solução sem Cl⁻ e de 12% \pm 2,4;n=10 na presença de furosemide, sendo que a inibição dos canais de Cl⁻ impede esta redução de volume. As células foram expostas a soluções com diferentes osmolaridades(Hipo=100; Iso=290 e Hiper=350mOsm/l). Assim, observamos ativação de NHE4 durante incubação com solução hipertônica e inibição em a solução hipotônica, quando comparadas ambas com a solução isotônica (Hipo=0,60 \pm 0,07;n=6; Iso=1,59 \pm 0,1;n=7 e Hiper=2,78 \pm 0,16;n=6 mM/min).

Conclusões: Células T84 expressam NHE4 que participa de forma importante na regulação do pHi e volume celular

28.011

EFEITO LUMINAL DA ANGIOTENSINA II SOBRE A SECREÇÃO DE POTÁSSIO EM TÚBULOS DISTAIS DE RIM DE RATOS. ¹Amorim, J. B. O.; ²Malnic, G.; ¹Biociências e Diagnóstico Bucal UNESP-São José dos Campos; ²ICB-USP

Objetivo: Avaliar o efeito luminal da ANGII sobre o fluxo secretório de K⁺ (J_{K⁺}) pela técnica de microperfusão renal *in vivo*, em túbulos distais de rim de ratos.

Métodos e Resultados:

Túbulos renais foram perfundidos através de micropipetas duplas contendo solução controle corada/óleo(Sudan); a seguir, a atividade de K⁺ e a DP transepitelial foram registradas por microeletrodo duplo contendo resina sensível-K⁺/referência. Impalamos uma terceira pipeta (simples) contendo solução experimental (controle + agente), para avaliação pareada do J_{K⁺} durante a microperfusão tubular. O fluxo de K⁺ controle (perfundindo com 100 mM NaCl + 0.5 mM KCl, pH 7) em média dos grupos estudados foi de 0.75 \pm 0.05nmol.cm⁻².s⁻¹. Quando ANGII (10⁻⁹/10⁻¹¹/10⁻¹²M) foi perfundida luminalmente, J_{K⁺} foi reduzido significativamente para: 0.63 \pm 0.08(p<0.001); 0.70 \pm 0.02(p<0.05); 0.50 \pm 0.05nmol.cm⁻².s⁻¹ (p<0.001), respectivamente. Adicionando 8Br-AMPC, observamos inibição do J_{K⁺} a 0.65 \pm 0.04(p<0.001), revertido pela perfusão de ANG+H89, J_{K⁺}=0.75 \pm 0.07 nmol.cm⁻².s⁻¹ (p<0.0001). A perfusão com ANG+Losartan (10⁻⁶M) não modificou a inibição do J_{K⁺}=0.46 \pm 0.06 nmol.cm⁻².s⁻¹ (p<0.05), sugerindo uma via distinta do acoplamento de agonistas aos receptores AT₁. Evidências da literatura demonstraram ativação da PLA2 durante perfusão luminal com ANGII. Testamos a possibilidade do envolvimento dessa via pela perfusão luminal com PGE₂ (10⁻⁶, 10⁻⁹M), observando redução significativa do fluxo secretório de K⁺, 0.47 \pm 0.04 , 0.55 \pm 0.05 nmol.cm⁻².s⁻¹ (p<0.001), respectivamente.

Conclusões: ANGII inibe luminalmente o J_{K+} , através da via acoplada ao AMPc/PKA, podendo ainda estar envolvida a ativação de prostanóides nas células principais dos segmentos finais do néfro.

28.012

ADAPTAÇÕES DOS TRANSPORTADORES RENAIIS DE ELETRÓLITOS E ÁGUA E DA HEMODINÂMICA SISTÊMICA DURANTE A PREENHEZ E HIPERTENSÃO. ¹Abreu, N. P.; ² Quintino, W. *; ¹Tardin, J. C. B. M. *; ¹Boim, M. A.; ³Campos, R. R.; ³Bergamaschi, C. M. T.; ¹Schor, N. ¹Nefrologia UNIFESP; ²Farmacologia LSA-UNIFESP; ³Fisiologia UNIFESP

Objetivo:

Avaliar o papel do NO na hemodinâmica sistêmica durante a gravidez e alterações na expressão dos transportadores de água e eletrólitos no rim.

Métodos e Resultados:

Ratas Wistar foram divididas em grupos Controle(C, n=5), Prenhez(P, n=5), L-NAME(L, n=6) (50 mg/Kg/dia) e Prenhez + L-NAME (PL, n=6). Parâmetros hemodinâmicos como pressão arterial(PA), volume sistólico(VS), resistência periférica total(RPT) e débito cardíaco(DC) foram colhidos no 14º dia de gestação. Níveis de expressão das Aquaporinas 2(AQP2), Na/K/2Cl(BSC), Na/H(NHE3) e canal de K(ROMK2) foram avaliados pela técnica de Real Time-PCR utilizando RNA extraído de tecido renal. O grupo P apresentou DC maior que as ratas C(P 107±7; C 84±5 ml/mim, p<0,05) sem um aumento da pressão arterial(P 118±2; C 116±3 mmHg). O grupo L apresentou DC menor que o grupo C(L 44,1±2,2 vs C 84,5±1,2; p<0,05) com aumento significativo na pressão arterial média(L 170,7±9,0 vs C 119,4±7,4; p<0,05). As ratas LP apresentaram um aumento da RPT quando comparadas ao grupo P(LP 3,5±0,4 vs P 1,2±0,1; p<0,05) e uma redução no VS(LP 256,6±24,4 vs P 115,5±20,5). O grupo P apresentou redução na expressão de ROMK2(P 0,3 vs C 1,8; p<0,05) e um aumento na AQP2(P 3,5 vs C 1,3; p<0,05). O grupo L apresentou um aumento significativo na expressão de AQP2(2,6) quando comparado com os grupos C(1,3) e LP(1,2). O grupo LP apresentou redução na expressão de BSC e NHE3 quando comparado com o grupo P(P 1,0 vs LP 0,2 e P 2,0 vs LP 1,2; p<0,05) respectivamente.

Conclusões:

A hipertensão produzida através do bloqueio da NO sintase impede as adaptações hemodinâmicas sistêmicas da gravidez. Nas ratas hipertensas prenhes também não foram observadas alterações nos transportadores tubulares inerentes de grávidas normotensas. Estes dados são sugestivos de que a variação no transporte tubular seria um dos mediadores dessas adaptações hemodinâmicas, que também são mediadas pelo NO durante a gravidez.

28.013

EFEITOS DA SARCOSINA NO ABALO DE MÚSCULO DIAFRAGMA DE RATO. Signorelli, M. C.; Rodrigues, A. P. O. **; Zamproni, L. N. **; Damiani, C. E. N.; Fogaça, R. T. H. Fisiologia UFPR

Objetivo:

Em muitos animais marinhos, o acúmulo de osmólitos naturais, como o óxido de trimetilamina (TMAO), betaína e sarcosina entre outros, é um importante mecanismo envolvido na regulação da tonicidade do meio interno. Dados de nosso laboratório demonstram que o TMAO altera importantes etapas do processo de acoplamento excitação-contração (AEC). Nosso objetivo foi investigar os efeitos da sarcosina no abalo do músculo diafragma de rato.

Métodos e Resultados:

Feixes celulares do músculo diafragma de ratos Wistar adultos foram dissecados e mantidos em solução de Tyrode (em mM: NaCl 136, MgCl₂ 0,98, CaCl₂ 2, KCl 5, NaHCO₃⁻ 11,9, H₂PO₄ 0,36, Glicose 5,5 e pH 7,4), gaseificada com O₂ (95 %) e CO₂ (5 %), a temperatura ambiente (22-26 °C). A variação de força, em condições isométricas, obtida por estimulação elétrica supralimiar do coto distal do nervo frênico (1 ms de duração, frequência de 2 Hz), ou de preparações curarizadas com d-tubocurarina (10⁻⁵g/ml), foi registrada em um polígrafo. Em preparações estimuladas direta ou indiretamente, 10 mM de sarcosina ou sacarose não alteraram, significativamente, a produção de força. Em meio contendo 50 mM de sarcosina ou sacarose, a produção de força produzida por estimulação indireta foi, respectivamente, de 82,38 (±15,02 %, n=6) e 62,1 (±15,02 %, n=6), e, por estimulação direta, de 93,15 (±13,21 %, n=6) e 68,83 (±16,72 %, n=6) da força obtida no meio isotônico. A produção de força obtida por estimulação direta ou indireta foi significativamente

reduzida em meio contendo 100 e 200 mM de sarcosina ou sacarose e, a supressão total da produção de força, ocorreu com 300 mM.

Conclusões:

Os dados sugerem que os efeitos da sarcosina são decorrentes unicamente do aumento da tonicidade do meio.

28.014

LASER-SCANNING CONFOCAL MICROSCOPY OF LIVING NUCLEI EXPLAINS APPARENT PATCH-CLAMP PARADOX OF NUCLEOCYTOPLASMIC ION GRADIENTS DESPITE THE LARGE AQUEOUS DIAMETER OF THE NUCLEAR PORES Bustamante, J. O. Física UFS

Objetivo:

It is now established that the nucleus is capable of regulating its own levels of Ca^{2+} . However, this is an apparent paradox because the nuclear envelope is perforated with nuclear pores of several nanometers in aqueous diameter. An explanation advanced by our laboratory, on the basis of patch-clamp investigations (Physiol. Rev. 81:1, 2001), is that each nuclear pore has an intrinsic ion channel behavior and that each pore becomes plugged during the natural transport of macromolecules. The aim of the present study was to test whether the electrophysiological observations could be supported with alternate methods.

Methods and Results:

Laser-scanning confocal fluorescence microscopy was used with 6 populations of living ventricular myocyte nuclei (n=1037) from 6 different mice (Bustamante JO: Biophys J. 64:1735, 1993) and in 6 populations of syncytial nuclei (n=589) from 6 fruit fly eggs. All nuclei were bathed in native environment with buffered saline (70% v/v). Alexa fluor 488 was selected as it is a brilliant and highly stable fluorochrome and because, according to current nuclear pore theory, its small mass (MW=643) should guarantee its free transit through the nuclear pores. Since all the nuclei were capable of excluding the fluorochrome, our observations demonstrated that the nuclear envelope is capable of functional states under which nuclear pore-mediated nucleocytoplasmic transport of small particles and physiological ions is impossible. The results also confirm that patch-clamp may be used to detect macromolecular transport along large channels through which electrolytes flow.

Conclusions:

Our experimental observations at the nuclear level explain the apparent paradox of the published patch-clamp and nucleocytoplasmic gradients of physiological ions as they clearly show that nuclear pores may be closed or plugged under some functional conditions.

28.015

EFEITOS DA SARCOSINA NA CONTRATURA POTÁSSICA OU CAFEÍNICA DE MÚSCULO DIAFRAGMA DE RATOS. Signorelli, M. C.; Zamproni, L. N.; Rodrigues, A. P. O.; Damiani, C. E. N.; Fogaça, R. T. H. Fisiologia UFPR

Objetivo:

Diversos organismos submetidos a situações de estresse de água acumulam intra e extracelularmente osmólitos naturais, como o óxido de trimetilamina - TMAO, betaína, sarcosina e taurina, entre outros. Dados de nosso laboratório demonstram que o TMAO altera importantes etapas do processo de acoplamento excitação-contração (AEC). Neste trabalho investigamos os efeitos da sarcosina na contração potássica e cafeínica de músculo diafragma de rato.

Métodos e Resultados:

Feixes celulares do músculo diafragma de ratos Wistar adultos foram dissecados e mantidos em solução de Tyrode (em mM: NaCl 136, KCl 5, MgCl₂ 0,98, CaCl₂ 2, NaHCO₃⁻ 11,9, H₂PO₄ 0,36, Glicose 5,5 e pH 7,4), gaseificada com O₂ (95%) e CO₂ (5%), a temperatura ambiente (22-26 °C). A variação de força, em condições isométricas, foi registrada em um polígrafo. A contração potássica foi obtida substituindo-se isotonicamente o NaCl por KCl (100 mM). A contração potássica na presença de sarcosina (50 mM) ou sacarose (50 mM) foi, em relação ao controle (ausência desses osmólitos), respectivamente, de 246,9 (± 26,82 %, n=6) e 191,81 (± 17,28 %, n=6). A contração induzida por cafeína (3 mM) na presença de sarcosina ou sacarose foi, respectivamente, de 158,12 (± 22,25 % n=6) e 290,18 (± 75,71 %, n=6) da contração obtida na ausência desse osmólito.

Conclusões: Os efeitos da sarcosina parecem ser decorrentes do aumento da tonicidade do meio e a mesma demonstra ser um osmólito compatível, uma vez que preserva a força de contração do músculo diafragma de rato.

28.016

EFEITOS DE SOLUÇÕES HIPERTÔNICAS AJUSTADAS COM SARCOSINA, BETAÍNA OU SACAROSE EM PREPARAÇÕES DE NERVO FRÊNICO-MÚSCULO DIAFRAGMA DE RATO. Rodrigues, A. P. O.; Signorelli, M. C.**; Zamproni, L. N.*; Damiani, C. E. N.; Fogaça, R. T. H. Fisiologia UFPR

Objetivo:

Muitos organismos submetidos a situações de estresse osmótico são capazes de ajustar a tonicidade do meio regulando a concentração de osmólitos (TMAO, betaína, sarcosina) intra e extracelularmente. Dados de nosso laboratório demonstram que o TMAO é capaz de alterar importantes etapas do processo de acoplamento excitação-contração (AEC). Foram investigados os efeitos da sarcosina, betaína e sacarose na produção de força de músculo diafragma de ratos estimulados indiretamente.

Métodos e Resultados:

Preparações de frênico-diafragma de ratos adultos (Wistar) foram obtidas de forma tradicional. O coto distal do nervo frênico foi estimulado com pulsos supralimíares de voltagem (2 Hz, 1 ms de duração) e o registro da produção de força, em condições isométricas, foi realizado em polígrafo. Os osmólitos foram adicionados à solução Tyrode para a obtenção de concentrações de 5, 10, 50, 100, 200 e 300 mM. Foi observado que a produção de força diminuía à medida que aumentava-se a tonicidade do meio. Em meio contendo 100 mM de sarcosina, betaína ou sacarose a produção de força em relação ao controle foi, respectivamente de 83,21 (\pm 10,73 %, n=6); 64,91 (\pm 9,36 %, n=6) e 80,04 (\pm 6,81 %, n=6). Em meio contendo 200 mM de sarcosina, betaína ou sacarose a produção de força foi respectivamente de 33,72 (\pm 11,14 %, n=6); 16,23 (\pm 8,89 %, n=6) e 32,64 (\pm 7,02 %, n=6). Em solução contendo 300 mM de sarcosina, betaína ou sacarose, a produção de força foi totalmente inibida.

Conclusões: A redução na produção de força induzida pela sarcosina, betaína ou sacarose sugere ser decorrente unicamente do aumento da tonicidade do meio extracelular, sendo os osmólitos de ocorrência natural, destituídos de efeitos deletérios na transmissão neuromuscular e na produção de força muscular.

28.017

FATOR REGULADOR DE NHE3 (NHERF): CLONAGEM DA PROTEÍNA DE CÉLULAS OKP E ANÁLISE FUNCIONAL DAS CÉLULAS COM SUPRESSÃO DA EXPRESSÃO DE NHERF. Yanai, P. R.; Nogueira, C.; Rebouças, N. A. Fisiologia e Biofísica ICB I-USP

Objetivo:

NHERF1 (NHE-*regulatory factor* 1 ou EBP50) é uma proteína que modula a função do permutador Na/H isoforma 3 (NHE3), intermediando a fosforilação deste permutador pela PKA. Neste projeto, pretendemos obter a seqüência completa do *cDNA* de NHERF1 de células de túbulos proximais de opossum (OKP) para conhecermos a estrutura primária dessa proteína de opossum e para induzir o *knock down* da mesma, com o uso de RNA de interferência. Em células controles e com baixa expressão de NHERF, analisaremos os níveis de expressão do receptor para PTH (PTH1R), a resposta celular ao estímulo com PTH, através da medida de AMPc, fosfoinositóis, $[Ca^{2+}]_i$, e avaliaremos a expressão e atividade do NHE3.

Métodos e Resultados:

Comparamos as seqüências de aminoácidos de NHERF1 das espécies: *Homo sapiens*, *Rattus norvegicus*, *Mus musculus*, *Oryctolagus cuniculus* para a identificação de regiões altamente conservadas. A partir da escolha de duas dessas regiões, foram desenhados oligonucleotídeos degenerados. Através de RT-PCR, em RNA total purificado a partir de células OKP, obtivemos então um segmento de *cDNA* de NHERF1. O produto desta PCR foi inserido em *pGEM-T easy vector*® e clonado em bactéria *XL1-Blue* para o seu seqüenciamento. O fragmento seqüenciado possui 141 nucleotídeos e foi utilizado para o desenho de *primers* para clonagem das extremidades 5'e 3' do *cDNA* completo utilizando a técnica de RACE – *rapid amplification of cDNA ends* (FirstChoice® RLM-RACE-Cat#1700). Os experimentos atuais mostraram que a extremidade

5', amplificada a partir desses *primers*, possui aproximadamente 1500pb e a extremidade 3', 800pb. A união destes segmentos corresponde ao tamanho aproximado do mRNA-NHERF1, obtido através de *Northern blot*.

Conclusões:

Os resultados iniciais sugerem que NHERF1 de *opossum* é uma proteína codificada por um mRNA de aproximadamente 2300 ribonucleotídeos.

28.018

EFEITO DA VITAMINA D SOBRE OS NÍVEIS DE CÁLCIO INTRACELULARES EM CÉLULAS OKP E IEC6. Hiraki, Y.; Silva, C. F.*; Cassola, A. C.; Rebouças, N. A.; Fisiologia e Biofísica ICB I-USP

Objetivo:

Binswanger e cols (Pflugers Arch 424:391, 1993) verificaram que a vitamina D interfere agudamente nos efeitos celulares do PTH, hormônio chave na produção da forma ativa de vitamina D, diminuindo a produção de AMPc induzida por este e revertendo a ação inibitória que o mesmo exerce sobre o isoforma 3 do permutador Na⁺/H⁺ (NHE3). Avaliamos os efeitos celulares da vitamina D em dois tipos de células epiteliais que expressam NHE3: IEC6, uma linhagem de células de intestino delgado de rato, órgão alvo da vitamina D e OKP, linhagem de células de túbulos proximais de rins de opossum, local de produção de vitamina D. O objetivo deste trabalho é verificar o efeito da vitamina D sobre os níveis de Ca²⁺ intracelular ([Ca]_i), avaliar a relação entre variação de [Ca]_i e níveis de expressão de receptores para vitamina D (VDR) e localizar a origem do Ca²⁺ liberado no citosol, se de estoques intracelulares ou do meio extracelular.

Métodos e Resultados:

As células IEC6 e OKP foram cultivadas sobre lamínulas. Para medida de [Ca]_i, as células foram carregadas com Fluo4, por 30 a 60 minutos no próprio meio de cultura, na câmara de CO₂-5% a 37 °C. As medidas de [Ca]_i foram feitas no microscópio confocal (excitação 488 nm; emissão na faixa 505 a 550 nm). As células foram perfundidas ou com HEPES-Ca²⁺, sem ou com vitamina D (50 ou 100 nM), ou com HEPES-sem Ca²⁺, contendo ou não vitamina D. A vitamina D induziu aumento da intensidade de fluorescência em cerca de 10% células IEC-6. Esse aumento foi dessincronizado e transitório. Foi observado apenas na presença de cálcio no meio extracelular, o que sugere ativação de canais para Ca²⁺ da membrana citoplasmática. Em células OKP não observamos mudança na [Ca]_i em resposta a vitamina D.

Conclusões:

A vitamina D induz oscilações no cálcio intracelular em células IEC6, mas não em células OKP. Precisamos ainda avaliar se essas oscilações dependem da expressão de VDR.

28.019

MODULAÇÃO FUNCIONAL E GENÉTICA DE NHE3 POR VITAMINA D. Silva, C. F.; Hiraki, Y.**; Rebouças, N. A. Fisiologia e Biofísica ICB I-USP

Objetivo:

O paratormônio (PTH) é um hormônio chave na produção da forma ativa de vitamina D, pois estimula a síntese de 1α-hidroxilase, enzima que catalisa a 1α- hidroxilação da 25-hidroxivitamina D3. Tal processo ocorre fundamentalmente em túbulos proximais, local onde há abundância da isoforma 3 do permutador Na⁺/H⁺ (NHE3), cuja atividade é inibida por ação do PTH. Existem evidências experimentais de que a vitamina D interfira de forma aguda com os efeitos celulares do PTH, diminuindo a produção de AMPc e revertendo a ação inibitória que o mesmo exerce sobre o NHE3. O objetivo deste trabalho foi obter o cDNA completo do receptor para vitamina D (VDR) e expressar essa proteína, original e em forma de fusão com EYFP, em células de túbulos proximais de opossum (OKP). Em células OKP transfectadas e não transfectadas, avaliaremos o efeito da vitamina D sobre o promotor do gene *NHE3* e sobre os níveis de expressão e atividade desse permutador.

Métodos e Resultados:

Foram feitos iniciadores para amplificação do segmento de VDR de rato com e sem *stop codon* e o produto amplificado foi inserido nos vetores *pcDNA3.1* e *pEYFP-N1*, respectivamente. Através do seqüenciamento desse vetor foi possível confirmar a adequada inserção do cDNA. Além disso, diferentes fragmentos da região promotora de NHE3, clonados em pGL3 (Clontech), vetor

contendo o gene repórter *Firefly luciferase* foram obtidos e a atividade dos mesmos foi avaliada em células OKP. A maior atividade do promotor foi observada com o segmento -152 a + 55, considerando +1, o sítio de início de transcrição. Esse segmento foi cerca de 10 vezes mais ativo que nosso segmento maior (-2.095 a + 55).

Conclusões:

Nossos resultados sobre os efeitos da vitamina D sobre o promotor do gene NHE3 ainda são bem preliminares e não conclusivos. O que conseguimos até o momento foi a construção dos vetores de expressão do VDR. Estamos padronizando o processo de transfecção, para análise do efeito da vitamina D em células transfectadas.

28.020

THE CHANNEL PROPERTIES IN LIGHT OF THE CYSTEINE SCANNING MUTAGENESIS. ALPHA-HEMOLYSIN CHANNEL IN PLANAR BILAYERS. ¹Merzlyak, P.; ² Capistrano, M. F. P.; ³ Valeva, A.; ¹Krasilnikov, O. V. ¹Biofísica e Radiobiologia UFPE; ²Biofísica UFRN; ³Institute of Medical Microbiology Max-Planck Institut

Objetivo:

The physico-chemical basis of such important properties of ion channels as selectivity and the current-voltage dependency are under intensive study although still poorly understood. To investigate these channel features in detail the cysteine scanning mutagenesis was applied on the heptameric channel formed by *Staphylococcus aureus* alpha-hemolysin.

Métodos e Resultados: Twenty four single cysteine mutants were produced and the electrophysiological consequences of single amino acid substitutions were assessed after formation of mutant channels in lipid bilayers. It was established that the cysteine substitution itself could in some cases modify considerably the channel properties. Introduced cysteines were then derivatized with water-soluble sulfhydryl-specific reagents to create a strong negative or positive charge at positions of substitution. The introduction of a strong negative charge into the stem converts the selectivity of the channel from weak anionic to strong cationic and simultaneously increases the asymmetry of the conductance-voltage dependence. In contrast with the stem region, the introduction of a strong negative charge in the Cap differently affects the channel properties: conductance-voltage dependence becomes less asymmetric although the cationic selectivity increases. The magnitude of these alterations was dependent on the channel radius at the position of the introduced charges (selectivity) or on the charge localization at the longitudinal axis of the channel (asymmetry in the conductance-voltage dependence). The change in the radius closely resembles mirror reflection of the change in the reversal potential value. As a result, a negative correlation ($r = -0.7$) between these two parameters was established.

Conclusões: The net charge of the channel wall is responsible for cation-anion selectivity of the channel whereas the balance of charges between the openings is crucial for determining a shape of the conductance-voltage curves. The distance between the charges incorporated in the lumen wall and the channel axis determines the effectiveness of the charges influence on the channel selectivity.

28.021

CHOLESTEROL DEPENDENT HEMOLYTIC ACTIVITY OF AN EXTRACT OF *PASSIFLORA QUADRANGULARIS* LEAVES. Yuldasheva, L.; Carvalho, E. F. N. B.; Catanho, M. T. J. A.; Krasilnikov, O. V. Biofísica e Radiobiologia UFPE

Objetivo:

Plants used in traditional medicine are rich sources of hemolysins and cytolytins, which constitute potential bactericidal and anticancer drugs. The screening of components is one of the first important steps in the whole process of a new drug development. The hydroethanolic extracts of several species of plants were examined. The only extract of *Passiflora quadrangularis* L. leaves was able to lyse the cells quickly. Therefore, the purpose of this study was to isolate a hemolytically active component in leaves of *P. quadrangularis* and to characterize its properties.

Métodos e Resultados:

Planar lipid bilayer membranes under voltage clamp condition were utilized to measure the change in membrane conductance under the hemolysin influence. Rabbit erythrocytes were used for assaying the hemolytic activity. It was established that the *Passiflora* hemolysin possesses the

frothing ability, gives positive color reaction with vanillin and forms a stable complex with cholesterol. This hemolysin is heat stable and resistant to trypsin treatment. HPLC chromatography profile of the hemolysin resembles those of saponins. Successive extraction of the crude hemolysin of *Passiflora quadrangularis* L. leaves with n-hexane, chloroform, ethyl acetate and n-butanol resulted in a 10-fold purification, where the maximum of the hemolytic activity was recovered in the n-butanol fraction. Polyethylene glycols of high molecular weight are able to slow the hemolysis, while liposomes containing cholesterol completely prevent it. In contrast, liposomes containing phosphatidylcholine were ineffective. The hemolysin was able to markedly increase the conductance of planar lipid bilayers containing cholesterol, and was ineffective in cholesterol-free bilayers.

Conclusões:

Passiflora quadrangularis leaves contain hemolysin which is probably a saponin. Membrane cholesterol is the primary target for this hemolysin and the membrane susceptibility to its action depends on the cholesterol content. Several molecules of hemolysin participate in a large transmembrane water pore formation in cholesterol-containing membranes.

28.022

IDENTIFICAÇÃO DA Na^+ -ATPASE EM *ENTAMOEBIA HISTOLYTICA*. De Souza, A. M.; Batista, E. J. O.; De Souza, W.; Carvalhaes, M.; Lopes, A. G.; Caruso-Neves, C; IBCCF-UFRJ

Objetivo:

E. histolytica capta por hora via pinocitose cerca de 30% do seu próprio volume, aumentando a carga de sódio intracelular. A extrusão do sódio ocorre, pelo menos em parte, pelo movimento vetorial do Na^+ das vesículas endocíticas para o citoplasma e, em seguida, para fora da célula. Para isso seria necessária a presença de uma bomba de sódio na membrana plasmática. Nenhum trabalho até o momento mostrou a presença de quaisquer das isoformas de $(\text{Na}^++\text{K}^+)\text{ATPase}$ em amebas e é bem conhecido que diversos organismos inferiores apresentam ATPases de sódio do tipo P, diferentes da $(\text{Na}^++\text{K}^+)\text{ATPase}$. Portanto, o objetivo desse trabalho foi identificar a presença da Na^+ -ATPase em membrana plasmática de amebas.

Métodos e Resultados:

A atividade Na^+ -ATPásica, medida segundo Grubmeyer e Penefsky (J.Biol.Chem.256:3718-3727,1981), foi $29,58 \pm 10,5$ e $59,84 \pm 5,5$ nmoles $\text{Pi} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ em homogeneizado e em fração microsomal, respectivamente. A atividade $(\text{Na}^++\text{K}^+)\text{ATPásica}$ não foi detectada. A variação da concentração de sódio de 5 a 120 mM, aumentou a atividade ATPásica. O $K_{0,5}$ foi de $12,7 \pm 3,4$ mM e a V_{max} de $83,5 \pm 5,7$ nmol $\text{Pi} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$. Diferentes concentrações de potássio, na presença de NaCl 120mM, não modularam a atividade Na^+ -ATPásica. Em experimentos de western blotting e imunofluorescência, anticorpos para as isoformas α de $(\text{Na}^++\text{K}^+)\text{ATPase}$ não apresentaram reatividade, exceto o anti α_2 . O nível de fosfoenzima, medido segundo Barrabin & Fontes (Arch.Biochem.Biophys.366,215-223,1999) aumentou 94,5% na presença de NaCl 100mM. Este efeito foi revertido por hidroxilamina e furosemide.

Conclusões:

Esses dados indicam que *E. histolytica* apresenta uma Na^+ -ATPase do tipo P, insensível a ouabaína e sensível a furosemide, com reatividade cruzada para a isoforma α_2 de $(\text{Na}^++\text{K}^+)\text{ATPase}$, a qual possivelmente exerce papel fundamental na regulação do volume celular deste parasita.

28.023

IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UM POSSÍVEL TRANSPORTADOR DE MEMBRANA PLASMÁTICA DE *F. pedrosoi* ¹Livramento, G. N.; Dias, F. A.;; Alviano, D. S.; Alviano, C. S.; Ferreira-Pereira, A. Microbiologia Geral UFRJ

Objetivo:

Fonsecaea pedrosoi é um fungo dematiáceo com parede celular melaninizada, que causa uma infecção micótica subcutânea conhecida como cromomicose. O tratamento da cromomicose usando antifúngicos convencionais tem se mostrado ineficiente, principalmente devido a grande resistência apresentada por esse fungo. Um dos principais mecanismos de resistência que tem sido amplamente estudado é o mecanismo via transportadores ABC causando resistência a múltiplas drogas. Nesse trabalho visamos a identificação e caracterização de um possível

transportador ABC de membrana plasmática de *F. pedrosoi*, comparando-o com a proteína Pdr5p, um transportador ABC que é superexpresso em uma cepa transformada de *S. cerevisiae*.

Métodos e Resultados:

Membranas plasmáticas de *F. pedrosoi* foram isoladas após 15-17 dias de cultura e submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida, com subsequente transferência para membrana de nitrocelulose. Uma banda de aproximadamente 160 kDa foi identificada por quimioluminescência por um anticorpo anti-Pdr5p. As atividades NTPásicas da preparação de membranas foram medidas a 37°C por 60 minutos em meio de reação padrão. Foi analisado o efeito de íons, bem como a ação de outros moduladores já descritos, e também o efeito do pH utilizando-se ATP e UTP como substrato. Observou-se que a faixa ótima de pH em que esse transportador age é em torno de 7.0 a 7.5, e que a atividade desse transportador é inibida pela adição de oligomicina (57,18%±2,53%,n=3), um clássico inibidor da Pdr5p de levedura.

Conclusões:

Os resultados obtidos, até o presente momento, sugerem a existência de um transportador sensível a oligomicina, que age em uma ampla faixa de pH e que é capaz de utilizar a energia proveniente do ATP ou do UTP, mostrando similaridades entre o transportador de *F. pedrosoi* e a Pdr5p de leveduras.

28.024

TIME COURSE OF THE EFFECT OF CYCLOSPORIN A AND IVERMECTIN ON THE MOTILITY AND BODY LENGTH OF *SCHISTOSOMA MANSONI*. Gonçalves, J. P.*; Azevedo, R. P.*; Scaramello, C. B. V.; Cunha, V. M. N. Farmacologia Básica e Clínica ICB-UFRJ

Objetivo:

Cyclosporin A (CsA) is an immunosuppressant that inhibits SERCA1 and 2b Ca²⁺-ATPases. Otherwise, ivermectin (IVM) is an anthelmintic that inhibits selectively the SERCA2b isoform. In addition to its immunomodulatory properties, CsA is a potent anti-schistosomal agent while IVM is not effective against *S. mansoni*. The aim of the present work was to investigate if CsA and IVM could directly affect the body length and the motility of the worms.

Métodos e Resultados:

Five worms were placed in different plastic dishes containing 1ml of Tyrode's solution (37°C). After 10 minutes, 50 or 100µMCsA; 3 or 30µM IVM; 100µMnicotine (NIC) and 1µMpraziquantel (PZQ) were added into distinct dishes and the effects were measured according to Silva and Noel (1995). The SERCA activity was determined according to Cunha *et al.* (1996).

In the presence of 10µMserotonin (5-HT), PZQ and NIC induced maximal tonic and flaccid paralysis, respectively. The motility and the length of the worms were significantly modified after 15min and reversed by wash (n=12; P< 0.05). Although 50 or 100µMCsA did not modify the motility of the worms 100µM of it promoted an increase of the length of the worms as NIC (n=10; P<0.05). IVM did not modify the motility of the worms with or without 10µM5-HT (n=12), but it produced irregular muscle contractions (n=12). A preliminary assay shows that 3µMCsA stimulates the SERCA ATPase activity in P1 fraction of *S. mansoni* (160%; n=1).

Conclusões:

Our data show that CsA but not IVM produces flaccid paralysis on adult male *S. mansoni*. The effect of CsA is reversible and exhibits a time course similar to the effect of NIC. As CsA seems to stimulate SERCA activity in *S. mansoni*, it is possible that this action contribute to the muscle relaxation of the worms. Otherwise, IVM did not affect the comportment of the worms showing that *S. mansoni* is resistant to this drug in the range of concentration used.

28.025

CHARACTERIZATION OF RNA APTAMERS AS SPECIFIC INHIBITORS OF P2X4 RECEPTORS. Majumder, P.; Trujillo, C.A.*; Ulrich, H. ¹Bioquímica, USP

Objetivo:

The P2X₄ receptor is a member of a family of ligand-gated ion channels (P2X₁- P2X₇) which are activated by ATP and other purines. The study of the exact biological role of subtypes of P2X receptors has been impossible as there are no specific antagonists available. Using the SELEX technique (Systematic Evolution of Ligands by EXponential Enrichment) we have selected RNA aptamers binding to the purinergic P2X₄ receptor.

Métodos e Resultados:

Following nine rounds of reiterative *in vitro* selection, the library was enriched by RNA molecules inhibiting P2X₄ receptor induced ion flux as determined by fast kinetic whole-cell recording experiments with 1321N1 glioma cells expressing the rat recombinant P2X₄ receptor. 500 μM of ATP induced 1000 pA current (\pm 300pA n=3) in cells held at a transmembrane voltage of -60 mV. In the presence of 5 μM of the selected aptamer pool only 100 pA were obtained following ATP application (n=3). The specificity of the aptamers in inhibiting the P2X₄ subtype was verified using 1321N1 glioma cells expressing the P2X₂ receptor subtype. The aptamer pool did not inhibit P2X₂ receptor mediated whole cell currents. Binding studies using ³²P-labeled aptamers as radioligands revealed that nearly 100 % of the aptamer-P2X₄ receptor binding was specific, whereas the selected aptamers did not bind to P2X₂ or P2X₇ receptors.

Conclusões:

We have developed aptamers as the first ever described specific P2X₄ rat receptor antagonists. We are now screening the selected aptamer pool for identifying and characterizing those RNA molecules with the highest affinity for the P2X₄ receptor. The identification of a specific high affinity inhibitor of the P2X₄ receptor will provide an important tool for studying its function in a cellular context.

28.026

EFFECT OF IVERMECTIN ON SUBCELLULAR CONSTITUENTS INVOLVED IN INTRACELLULAR CA²⁺ REGULATION IN FKBP12- ASSOCIATED AND - NON ASSOCIATED SARCOPLASMIC RETICULUM VESICLES FROM RAT VAS DEFERENS. Muzi-Filho, H.; Scaramello, C. B. V.; Cunha, V. M. N.; Farmacologia Básica e Clínica ICB-UFRJ

In a previous work we demonstrated that FKBP12 seems to contribute to the normal function of rat vas deferens (RVD) through the stabilization of intracellular Ca²⁺ release channels (CRC); RyR or IP3R. Ivermectin (an anthelmintic drug) is a macrocyclic lactone that activates the RyR directly and inhibits SERCA1 and SERCA2b Ca²⁺ pumps. The aim of the present work was to investigate the actions of ivermectin on Ca²⁺ pumps and RyR present in RVD.

Métodos e Resultados:

Male Wistar rats (250-300g) were sacrificed and the RVD were removed. The tissue was washed, homogenized and centrifuged at 108.000 x g to obtain ultracentrifuged homogenate (FKBP(+) fraction). To dissociate FKBP12-CRC complex, part of the ultracentrifuged homogenate was treated at 37°C for 30min before further ultracentrifugation (FKBP(-) fraction). These fractions were used for the measurement of ⁴⁵Ca²⁺ uptake and Ca²⁺-ATPase activity. As the concentration of ivermectin increases (0.1–300 μM) the ⁴⁵Ca²⁺ content of SR vesicles present in FKBP(+) and FKBP(-) fractions decreases using 10 μM (Imax=115,7%±6.1 and 94,7%±9.6; n=4, respectively) or 100 μM of free Ca²⁺ (Imax=108.4%±6.2 and 95.6±5.3; n=4, respectively). The addition of 25 μM ruthenium red in the incubation medium does not change the Imax of ivermectin (30 μM, n=4) in both fractions. Preliminary assay shows that 30 μM ivermectin inhibits the Thapsigargin-sensitive (50,6%) and - resistant (Ca²⁺ - Mg²⁺) ATPase activity (18%) in FKBP(+) fraction using 10 μM of free Ca²⁺ (n=1).

Conclusões:

These data suggest that the reduction of Ca²⁺ content promoted by ivermectin in the SR vesicles present in FKBP(+) e FKBP(-) fractions is concentration dependent and does not depend on the presence of FKBP12. This reduction seems be due to the inhibition of SERCA pumps and not to the activation of RyR channel by the drug.

28.027

EFEITOS DA BETAÍNA NA CONTRATURA POTÁSSICA DE MÚSCULO DIAFRAGMA DE RATOS. Rodrigues, A. P. O.; Signorelli, M. C.***; Zamproni L N*; Damiani, C. E. N.; Fogaça, R. T. H. Fisiologia UFPR

Objetivo:

Organismos que vivem em ambientes estressores como os invertebrados marinhos acumulam intra e extracelularmente osmólitos naturais, como o óxido de trimetilamina - TMAO, betaína, sarcosina, taurina, entre outros. Estudos realizados em nosso laboratório mostram que o TMAO pode alterar importantes etapas do processo de acoplamento excitação-contração (AEC). Neste trabalho investigamos os efeitos da betaína na contratura potássica de músculo diafragma de rato.

Métodos e Resultados:

Foram dissecados feixes musculares de diafragma de ratos Wistar adultos. Estes foram mantidos em solução nutritiva Tyrode com composição em mM: NaCl 136, KCl 5, MgCl₂ 0,98, CaCl₂ 2, NaHCO₃⁻ 11,9, NaH₂PO₄ 0,36, Glicose 5,5 e pH 7,4, gaseificada com O₂ (95%) e CO₂ (5%), a temperatura ambiente (22-26°C). A variação de força, em condições isométricas, foi registrada em um polígrafo. A contração potássica foi obtida substituindo-se isotonicamente o NaCl por KCl (100 mM). A contração potássica na presença de betaína 100 mM ou sacarose 100 mM foi, em relação ao controle (ausência desses osmólitos), respectivamente, de 358,90 (± 32,18 %, n=6) e 287,75 (± 27,36 %, n=6).

Conclusões:

Os efeitos da betaína parecem ser decorrentes do aumento da tonicidade do meio e a mesma comporta-se como um osmólito compatível protegendo a contração do músculo diafragma de rato.

28.028

MODULAÇÃO TRANSCRICIONAL DO GENE DA ISOFORMA 3 DO PERMUTADOR Na⁺/H⁺ (NHE3) NAS ACIDOSES METABÓLICA E RESPIRATÓRIA. Silva, P. H. I.; Rebouças, N. A. Fisiologia e Biofísica ICB I-USP

Objetivo:

A secreção de prótons em túbulos proximais, que se faz principalmente por NHE3, está ativada na acidose. Nosso objetivo é verificar se há aumento da expressão de mRNA e proteína-NHE3 e na atividade de diferentes segmentos do promotor do gene do NHE3 em células de túbulos proximais renais de opossum (OKP) submetidas a acidoses metabólica e respiratória.

Métodos e Resultados:

Células OKP foram submetidas a acidose por 24 horas, acidificando o meio a pH 6,9 com HCl (acidose metabólica), ou aumentando pressão parcial de CO₂ (pCO₂), de 40 mmHg (controle) para 80 mmHg (acidose respiratória). Após esse período, as células eram utilizadas para extração de RNA total, utilizando Trizol (Invitrogen). Esse RNA total, após remoção do DNA contaminante, foi utilizado para síntese da primeira fita de cDNA, utilizando como iniciadores octâmeros de aleatórios de deoxinucleotídeos, e a transcriptase reversa SuperScript 3 (Invitrogen). Para PCR com quantificação do produto amplificado em tempo real, foram utilizados primers e sondas específicos para NHE3 e para beta-actina, esta utilizada como controle interno. A quantificação resultou em aumento da expressão de mRNA-NHE3 tanto na acidose metabólica, aumento de 3,6 vezes, como na acidose respiratória, aumento de 3,8 vezes (n=5). Para avaliar os efeitos da acidose sobre o promotor do NHE3, dois segmentos da região flanqueadora 5' do gene NHE3 e parte do primeiro exon, correspondente às posições de -2.095 até +55, e de -152 até +55, foram clonados no vetor pGL3 e transfectados em células OKP. Após a transfecção, as células foram incubadas por 48 horas em meio com pH 6,9, acidificando com HCl e, em seguida, lisadas para quantificação da proteína codificada pelo gene repórter *Firefly luciferase*. Como controle da eficiência da transfecção utilizamos vetor contendo o gene repórter *Renilla luciferase*. A acidificação do meio resultou em aumento de 31% (p < 0,001) na atividade do promotor quando o segmento transfectado foi de -152 a +55. Com o segmento maior, -2.095 a +55, que em condições basais foi cerca de dez vezes menos ativo que o anterior, não observamos aumento significativo na atividade de luciferase após incubação em meio ácido.

Conclusões:

Nossos resultados sugerem que tanto acidose metabólica como respiratória são capazes de induzir aumento dos níveis de mRNA-NHE3 em células OKP. O segmento da região promotora correspondente às posições -152 a +55 foi responsivo à acidificação do meio. Com o segmento maior, -2095 a +55 não foi possível observar aumento da atividade do promotor em meio ácido, muito provavelmente devido à existência de fortes elementos repressores presentes entre as posições -2095 a -152.