

- Imunologia Celular

31.001

EFEITO DE ESTERÓIDE ANABOLIZANTE NA MORFOLOGIA DO BAÇO EM RATOS TREINADOS <sup>1</sup> Vasconcelos, G.; <sup>5</sup> Vasconcelos, G.; <sup>1,5</sup> Faculdade de Ciências da Saúde, UNIMEP

**Objetivo:**

O uso de esteróides anabólicos androgênicos está relacionado com aumento da força e massa muscular. O uso de doses supra-farmacológicas também tem sido observada entre os usuários destes hormônios (Urhausen, J Steroid Biochem Mol Biol., 84: 369-375, 2003). Por sua vez, o exercício físico intenso promove alterações no sistema imune. No entanto, não é clara a ação dos esteróides associados aos exercícios físicos sobre os órgãos linfóides. O presente estudo visa observar os efeitos de diferentes doses de decanoato de nandrolona (DN), na morfologia do baço (órgão linfóide), em ratos que foram submetidos a um programa de treinamento físico.

**Métodos e Resultados:** Foram utilizados 30 ratos machos (Wistar), com 16 semanas de vida e peso final de 376 4,4g, divididos em 5 grupos: os quatro primeiros receberam, respectivamente, 0,1 mg/Kg; 1mg/Kg; 5 mg/kg; 10 mg/kg de DN (em propilenoglicol) intra-muscular e o grupo controle, apenas o veículo. O treinamento dos animais constou de exercícios de saltos em meio líquido durante sete semanas (quatro sessões de dez saltos por 30 segundos de intervalo, cinco dias por semana). Após o treinamento, os animais foram sacrificados, os baços removidos e processados para análise histológica. Os cortes foram corados com hematoxilina e eosina (HE) e analisados em microscópio de luz. Não foram observadas modificações na estrutura e morfologia dos baços dos animais controle. O grupo que recebeu 0,1 mg/kg de DN apresentou discreta alteração na distribuição dos nódulos linfáticos (LN). No entanto, os grupos que receberam DN nas doses de 1 a 10 mg foram caracterizados por apresentarem alterações progressivas que descaracterizavam a morfologia normal do órgão. Nódulos linfáticos eram escassos e as bainhas peri-arteriais de modo geral mostraram-se espessadas, sugerindo alterações nos compartimentos de linfócitos B e T.

**Conclusões:**

Esses resultados, embora preliminares, sugerem uma ação do DN sobre o sistema imune.: Fundo de Apoio à Pesquisa (FAP) -Universidade Metodista de Piracicaba, Bolsista PIBIC/CNPq.

31.002

EXPRESSÃO DE TLR2, TLR4 E VIAS DE SINALIZAÇÃO EM AORTA DE RATOS APÓS INJEÇÃO DE LPS. <sup>1</sup>Barbeiro, H. V.; <sup>1</sup>Frediani, D.; <sup>3</sup> Brandizzi, L.; <sup>1</sup>Soriano, F. G. <sup>1</sup>Emergências Clínicas FMUSP; <sup>2</sup>Laboratório de Hipertensão Experimental USP

**Objetivo:**

Avaliar as possíveis alterações tanto na expressão gênica de TLR2, TLR4 e iNOS quanto na quantificação de  $O_2^-$  e Nitrato em aorta de ratos endotoxêmicos.

**Métodos e Resultados:**

LPS (10mg/kg) foi injetado (i.p.) em ratos Wistar ( $245.12 \pm 1,5g$ ) 8h, 16h ou 24h antes do experimento. Os animais controles receberam solução fisiológica. Para a coleta da aorta, os animais foram anestesiados com hidrato de cloral 10% ip. Nos estudos de quantificação de nitrato (NO analyser) e de expressão gênica por RT-PCR foram utilizadas aortas homogenizadas em nitrogênio líquido. Para a quantificação de  $O_2^-$  (quimioluminescência) foi utilizada a aorta torácica limpa e intacta. Foi utilizado teste de ANOVA para a avaliação estatística. Quando comparamos a expressão gênica (normalizadas pela expressão de GAPDH) do grupo controle e do grupo com LPS, observamos em 8h um aumento dos níveis basais na expressão de TLR4 (de  $0,31 \pm 0,05$  para  $1,04 \pm 0,12$ ), TLR2 (de  $0,29 \pm 0,03$  para  $0,93 \pm 0,04$ ) e iNOS (de  $0,05 \pm 0,01$  para  $0,7 \pm 0,16$ ). No período de 16h não observamos diferença estatística para iNOS e TLR4; os níveis de TLR2 permaneceram elevados ( $0,98 \pm 0,01$ ), neste período de estudo também observamos aumento de nitrato por mg de proteína (de  $0,005 \pm 0,0004$  para  $0,017 \pm 0,003$ ) e aumento de  $O_2^-$  por mg de tecido seco (de  $1212 \pm 127$  para  $9434 \pm 797$ ). No período de 24 horas a expressão gênica para iNOS e os níveis de Nitrato não se alteraram; a expressão de TLR2 se manteve elevada ( $0,73 \pm 0,06$ ), TLR4 voltou a expressar aumento ( $0,76 \pm 0,1$ ) e o  $O_2^-$  se manteve elevado ( $5338 \pm 1350$ ).

**Conclusões:**

O tratamento com LPS induziu o aumento de expressão gênica de TLR4, TLR2 e iNOS, as quais precederam o aumento da quantificação de Radicais Livres ( $O_2^-$ ) e de sub produto do óxido nítrico (Nitrato).

31.003

CARACTERIZAÇÃO BÁSICA DOS HEMÓCITOS DO CAMARÃO DE ÁGUA DOCE MACROBRACHIUM POTIUNA. Dall'Agnolo, D.\*; Rosa, R. D.\*\*; Barracco, M. A.; Gargioni, R. Biologia Celular Embriologia e Genética UFSC

**Objetivo:**

O camarão *M. potiuna* (Decapoda: Palaemonidae) é uma espécie de pequeno porte (menos de 60 mm), endemicamente brasileira, exclusiva de água doce e muito pouco estudada. Na literatura nada consta sobre as células da hemolinfa de *M. potiuna* e suas implicações nas reações imunológicas. O objetivo do presente trabalho foi o de realizar uma caracterização básica preliminar das células da hemolinfa ou hemócitos de adultos de *M. potiuna* como base para estudos posteriores sobre a imunologia desta espécie.

**Métodos e Resultados:** A hemolinfa dos animais (n=10), coletados na ilha de Santa Catarina, foi extraída diretamente do coração, em uma solução anticoagulante contendo quelantes de cálcio, e utilizada para caracterização celular e determinação dos hemogramas. As células circulantes de *M. potiuna* foram observadas em microscopia de contraste de fase e em esfregaços corados com Giemsa: Duas populações de hemócitos foram encontradas: hemócitos hialinos (HH) e hemócitos granulares (HG). Os HH são constituídos por células pequenas (11µm), com aspecto indiferenciado e com alta relação núcleo-citoplasmática e por células maiores (14µm) de citoplasma mais abundante. Ambas formas de HH são desprovidas de grânulos e seu citoplasma é geralmente eosinófilo. Os HG são células de tamanho variado (12-16µm), cujo citoplasma é rico em grânulos basófilos, imersos num citoplasma eosinófilo. A contagem total de hemócitos (THC), estimada em câmara de Neubauer, foi de  $2.152 \pm 727$  hemócitos/mm<sup>3</sup>. A proporção relativa dos hemócitos, calculada sobre mais de 2.000 células, revelou uma pequena predominância de HG (56%) sobre os HH (44%).

**Conclusões:**

O perfil hemato-hematológico básico do camarão nativo *M. potiuna* está atualmente em progresso em nosso laboratório, uma vez que nada consta na literatura a este respeito.

31.004

AValiação Seqüencial da Pele de Coelhos Sensibilizados com Colágeno do Tipo V em Modelo Similar a Esclerodermia. <sup>1</sup>Oliveira, C. C.; <sup>1</sup>Velosa, A. P. P.\*\*; <sup>1</sup>Bezerra, M. C.\*\*; <sup>1</sup>Carrasco, S.; <sup>2</sup>Parra, E. R.\*\*; <sup>1</sup>Ogido, L. T. I.\*\*; <sup>1</sup>Schainberg, C. G.; <sup>2</sup>Capelozzi, V. L.; <sup>1</sup>Yoshinari, N. H.; <sup>1</sup>Teodoro, W. P. R. <sup>1</sup>Reumatologia FMUSP; <sup>2</sup>Patologia FMUSP

**Objetivo:** Analisar a evolução do comprometimento cutâneo em modelo de esclerodermia induzido por colágeno do tipo V em coelhos.

**Métodos e Resultados:** O remodelamento cutâneo foi avaliado através da análise morfológica e histomorfométrica da pele. A síntese e arquitetura fibrilar do colágeno dos tipos I, III e V foi analisada por imunofluorescência em cultura de fibroblastos. Os resultados demonstraram preservação da arquitetura da matriz extracelular e dos anexos cutâneos nos animais controles, enquanto que nos animais imunizados foi observado remodelamento da matriz extracelular na derme superficial e profunda, caracterizado pelo espessamento das fibras de colágeno e diminuição dos anexos em todos os tempos estudados. A análise histomorfométrica (n=6) evidenciou espessamento significativo da derme (p=0,05) nas amostras coletadas após 7 dias da primeira imunização com média±desvio padrão de  $972,58 \pm 341,11$ , quando comparados aos respectivos controles (n=6) com média±desvio padrão de  $654,67 \pm 94,26$ , atingindo o máximo de intensidade em 120 dias ( $2069,62 \pm 560,82$ ) da primeira sensibilização (p=0,01). A cultura de fibroblastos dos animais imunizados apresentou aumento na expressão do colágeno dos tipos I e III configurando um padrão de resposta fibrocelular reparativa, enquanto que o aumento na expressão do colágeno V culminou com a formação de agregado sólido, bem demarcado, semelhante a placa esclerótica em 120 dias.

**Conclusões:** Através deste estudo podemos concluir que a formação da placa esclerodérmica pode estar relacionada à alteração na fibrillogênese do tecido conjuntivo tendo o colágeno do tipo V

participação fundamental por suas particularidades de síntese e conformação molecular. Esta informação trará grande contribuição para a consolidação da patogênese da doença.

31.005

DETERMINATION OF COLLAGEN CONTENT IN MUSCULAR TISSUES OF MDX MICE DURING DISTINCT STAGES OF MUSCULAR DYSTROPHY. <sup>1</sup>Pereira, R. S.; <sup>2</sup>Tovar, A. F.; <sup>3</sup>Lagrotta-Candido, J.; <sup>4</sup>Quirico-Santos, T. <sup>1</sup>IB-UFF; <sup>2</sup> Bioquímica Médica CCS-UFRJ; <sup>3</sup>Imunobiologia UFF; <sup>4</sup>Biologia Celular e Molecular UFF

**Objetivo:**

Mdx mouse develops a severe X-linked myopathy characterized by progressive degeneration of skeletal muscle fibres and connective tissue replacement. Mdx male at 6 weeks (wk) presents prominent inflammation and myonecrosis, but less regenerating myofibres than females. In contrast, older mdx females (24 and 48 wk) exhibit intense fibrosis and higher fat tissue deposition than corresponding mdx males. This work aimed to determine the possible influence of the gender dimorphism in the collagen production of mdx mice at distinct ages of the myopathy.

**Métodos e Resultados:**

Methods - Skeletal muscles (gastrocnemius and diaphragm) of control (C57) and dystrophic (mdx) male and female mice were used at ages corresponding to: myonecrosis (6 wk), regeneration (12 wk), fibrosis (24 and 48 wk). Collagen production was assessed by quantification of hydroxyproline content (Stegemann & Stalder. Clin Chim Acta 1967; 18: 267-73). It was included at least 5 mice per group.

Results - Regardless the gender, gastrocnemius muscles of mdx mice showed similar pattern of collagen content at all ages, but during regeneration (12wk), mdx males showed increased OH-prol ( $p < 0.001$ ) than corresponding females. In contrast, C57 females (12wk) presented increased ( $p < 0.01$ ) OH-prol content than age-matched C57 males. In addition, the diaphragm of mdx males at later stage of the disease (48wk) showed marked OH-prol content than age-matched females.

**Conclusões:**

These results suggest that sexual hormones and factors related to the inflammation, present in the microenvironment of distinct muscular tissue, are influencing the production of collagen and the outcome of disease in mdx dystrophic mice.

31.006

PERITONEAL B1-CELLS DEPLETION: ROLE IN THE MODULATION OF THE POLYREACTIVE ANTIBODIES. Torrentes, A. C.; Vasconcellos, R.; Vericimo, M. A.; Pinho, M. F. B. Imunobiologia, UFF

**Objetivo:**

The peritoneal cavity contains a population of B cells (B-1) considered as being derived from early progenitors in fetal life, which produce the majority of serum IgM natural antibodies (NABs) polyreactive to both endogenous and exogenous antigens. In order to analyse if the absence of B-1 cells can modulate the serum profile of the NABs, B-1 cells were depleted from peritoneal cavity by hypotonic shock. With this treatment it is expected to preferentially eliminate B-1 cells, once other peritoneal cells are continuously supplied from bone marrow (Int Immunol 7: 877-82, 1995).

**Métodos e Resultados:**

Methods - Cells were depleted from peritoneal cavity of Balb/c mice by weekly hypotonic shock with *i.p.* injections of sterile distilled water from birth through the 12<sup>th</sup> week. A third of the animals were splenectomized at 12 weeks. All animals were bled at 4, 8, 12, 16 and 20 weeks for determination of the levels of serum anti-DNA antibodies by ELISA. The cell populations from peritoneal cavity, spleen and omentum were analysed by FACS at 12 and 20 weeks.

Results - The treatment by hypotonic shock during 12 weeks significantly eliminated the population of B-1 cells in the peritoneum ( $P < 0, 02$ ) but not in the spleen and omentum. However, 20 weeks (2 months after the depletion), in either groups of animals splenectomized or not, B-1 cells were recovered in the peritoneal cavity in similar numbers to those of control mice. The levels of anti-DNA antibodies decreased during and immediately after depletion ( $P < 0, 03$ ), but reached control levels as of the 4<sup>th</sup> week after depletion discontinuation, in both groups.

**Conclusões:**

Data suggests that B-1 cells from peritoneal cavity are important in the modulation of serum levels of polyreactive NAb, since in the absence of these cells NAb decrease and are restored to control levels when B-1 cells are spontaneously recovered in the peritoneum, even in splenectomized mice.

31.007

POSSÍVEL PARTICIPAÇÃO DE UMA FOSFOLIPASE A2 SECRETÓRIA COMO FATOR DE INDUÇÃO DE APOPTOSE DE CÉLULAS CITOTÓXICAS. Hamaty, F. C.; Persechini, P. M.; Costa Junior, H. M.\*\* IBCCF-UFRJ

**Objetivo:** Nosso Laboratório tem descrito um fator indutor de morte presente em extratos celulares derivados de uma linhagem de linfócitos T citotóxicos (CTLL-R8) e em células primárias. Este fator independe de perforina/granzima e das vias de receptores da família do TNF, sendo termoresistente, resistente a ação proteolítica, dependente de  $Ca^{2+}$  e sensível a inibidores de isoformas de fosfolipases A2. Como parte da caracterização desse fenômeno, analisamos o efeito do DTT, a localização sub-celular, além de investigarmos diferentes linhagens celulares como efetores e alvos comparando-os com a CTLL-R8.

**Métodos e Resultados:**

Extratos celulares brutos de CTLL-R8 foram incubados com doses crescentes de DTT (0.01, 0.1 e 1 mM) por 10 minutos a 37°C e tratados com 1mM de  $Ca^{2+}$  a 37°C. De 1-10 µg/ml dos extratos tratados foram incubados na presença de células alvo por 3 horas a 37°C. Ao final do período da incubação as células foram centrifugadas, o sobrenadante foi recolhido para quantificação de LDH liberada e o *pellet* avaliado a percentagem de núcleos hipo-diplóides por FACs. Realizamos fracionamento sub-celular por diferentes velocidades de sedimentação. Utilizamos nesse trabalho as linhagens CTLL-R8, K562, U-937, CaCo-2, HCT-8 e HeLa, além de macrófagos peritoneais de camundongos suíços e C57/Bl6.

Apenas extratos de CTLL-R8 e U-937 foram capazes de induzir morte nas células alvo. Até o presente momento as linhagens CaCo-2 e U-937 foram susceptíveis, assim como os macrófagos intraperitoneais de camundongos suíços e C57/Bl6 à apoptose induzida por CTLL-R8. O DTT reduziu apoptose induzida por CTLL-R8. A atividade indutora de apoptose localizou-se nas frações citosólicas e livres de vesículas.

**Conclusões:**

Nossos dados sugerem que o fator observado oriundo de células citotóxicas, possa ser uma fosfolipase A2 secretória.

31.008

AValiação da Atividade da Superóxido Dismutase em Portadores de Esquistossomose Hepatoesplênica. <sup>1</sup>Castro, F. M. M.; <sup>2</sup>Leite, C. R. C.\*\*; <sup>3</sup>Castro, C. M. M. B.; <sup>2</sup>Brandt, C. T.; <sup>4</sup>Macedo, E. M. C.; <sup>4</sup>Paes-Silva, R. P.; <sup>5</sup>Severo M. S.; <sup>1</sup>Medicina UFPE; <sup>2</sup>Cirurgia, UFPE; <sup>3</sup>Medicina Tropical UFPE; <sup>4</sup>Nutrição, UFPE; <sup>5</sup>Biomedicina, UFPE

**Objetivo:**

Analisar a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) em monócitos de pacientes portadores de esquistossomose mansônica, na forma hepatoesplênica (EHE).

**Métodos e Resultados:**

Padronizou-se e procedeu-se à coleta de sangue (15mL) de voluntários adequadamente selecionados para formar o grupo Controle (C-n=15) e de pacientes com esquistossomose na forma hepato-esplênica (EHE-n=10) diagnosticada. Os integrantes dos dois grupos são de ambos os sexos com idade entre 10 e 25 anos.

Em seguida, realizou-se o processamento das amostras a fim de isolar os monócitos do sangue periférico.

Depois, fez-se a cultura das células, procedendo-se à reação para mensuração da atividade da SOD - ensaio hipoxantina/XOD com redução de Citocromo C. Foram colhidas amostras da reação e feitas as leituras em espectrofotômetro. Com esses dados, foram realizados os cálculos da atividade da SOD para cada grupo e comparados, mediante o teste T de Student.

Observou-se então diferença entre os dois grupos (p<0,05): EHE=66,8097831UI de SOD/mg de proteína dos monócitos (DP=19,06732) e C=44,1784222UI de SOD/mg de proteína dos monócitos (DP=14,57193).

**Conclusões:**

Pode-se concluir que existiu maior atividade da SOD no grupo EHE, quando comparado a indivíduos saudáveis, podendo resultar em uma menor produção de superóxido pelos monócitos.

31.009

MACROPHAGES INFECTED BY LEISHMANIA (L.) CHAGASI ARE PROTECTED FROM APOPTOSIS WHEN INDUCED BY TNF AND CAMPTOTHECIN. Souza E. B.<sup>\*\*</sup>; Lindoso, J. A. L.; Goto, H. Soroepidemiologia e Imunobiologia Celular e Molecular Instituto de Medicina Tropical

**Objetivo:**

In our previous investigations, spleen macrophages from hamsters infected by *Leishmania (L.) Chagasi* are protected from apoptosis both in vivo and in vitro upon stimuli with *Leishmania* total antigen. Our data showed apoptosis in ex-vivo cells at the early phase and increased upon stimulation, however it disappeared at the late phase of infection. In this work, we also investigated apoptosis in peritoneal murine macrophages and J774 cells infected by *Leishmania (L.) Chagasi* amastigotes or promastigotes upon apoptosis inducers.

**Métodos e Resultados:**

One million of peritoneal murine macrophages and J774 cells were infected with 5 million purified *Leishmania (L.) Chagasi* (MHOM/BR/72/cepa 46) amastigotes or promastigotes. Apoptosis was induced in these cells using camptothecin 5  $\mu$ M (CPT) or human recombinant tnf 10 ng/mL (hrTNF). Annexin V method analyzed by flow cytometry was used to detect apoptosis in these experiments. Apoptosis was seen in J774 macrophages in culture (21%) and increased when these cells were induced with Camptothecin or rTNF (30%; 33,4%, respectively). However, J774 cells when infected by amastigotes or promastigotes, showed a decrease of apoptosis (19,4%; 8,85%, respectively) in comparison with those J774 cells non infected or non induced. When these cells were infected by amastigotes or promastigotes and induced by CPT- (22,04%; 3,55% respectively) or rTNF-promastigotes (15,77%) a decrease of apoptosis was observed too. In addition, peritoneal murine macrophages from BALB/c and C57BL/6 infected by promastigotes present decrease of apoptosis (10,4%; 7,73%, respectively) compared to cells in culture (23,92% and 16,67% respectively). Infection by amastigotes in the same cells promoted decrease of apoptosis in macrophages from BALB/c (10,85%) but not in macrophages from C57BL/6 (30,2%). Similar results were observed when we used CPT to induce apoptosis in BALB/c and C57BL/6 macrophages-infected by (7,24% and 7,33%, respectively).

**Conclusões:**

We observed markedly, increased apoptosis in macrophages induced by CPT or rTNF, compared to those macrophages in culture, although they decrease when infected by amastigotes or promastigotes. Interestingly, macrophages apoptosis protection was more prominently observed when infected by promastigotes than amastigotes both in J774 cells or murine peritoneal macrophages. Our results clearly show macrophages protected from apoptosis when infected by *Leishmania (L.) Chagasi*, induced or not by CPT or rTNF.

31.010

ESTUDO DO ENVOLVIMENTO DE HEMICANAIS DE JUNÇÕES COMUNICANTES NO PORO ASSOCIADO AO RECEPTOR P2X<sub>7</sub> <sup>1</sup>Alberto, A. V. P.; <sup>2</sup>Faria, R. X.<sup>\*\*</sup>; <sup>3</sup>Alves, L. A.; Imunologia, FIOCRUZ

**Objetivo:**

Após ativação do receptor P2X<sub>7</sub> pelo ATP ocorre a abertura de um canal catiônico de baixa condutância (8 pS). Além disso, em concentrações na faixa de milimolar, o ATP pode estimular a abertura de um poro associado ao receptor P2X<sub>7</sub>, que permite a passagem de moléculas de até 900 Da. Esse poro tem uma seletividade similar ao poro formado por um hemicanal de junção comunicante. Como, ainda, não está determinado o mecanismo de formação do poro associado à ativação do receptor P2X<sub>7</sub>, investigamos se haveria participação de hemicanaís de junções comunicantes na formação do poro associado ao P2X<sub>7</sub>.

**Métodos e Resultados:**

Para tal investigação, realizamos ensaios de permeabilização. Usamos macrófagos peritoneais de ratos Wistar machos. Plaqueamos os macrófagos numa placa de 96 poços e incubamos 30 minutos, sendo 25 minutos com os bloqueadores de junções comunicantes e o ATP e nos 5

minutos finais adicionávamos brometo de etídio (BE). Ao final da incubação analisávamos ao microscópio de fluorescência acoplado a uma câmera digital.

Nas células tratadas somente com 5 mM ATP ocorreu a captação de BE, mas quando tratamos com o bloqueador do receptor P2X<sub>7</sub>, ATP oxidado, houve bloqueio da resposta como esperado. Os bloqueadores de hemicanais, Carbenoxolone, ácido 18 $\alpha$ -glycerrithinico e heptanol, não foram eficazes para bloquear a captação de BE induzida pelo ATP.

**Conclusões:** Nossos resultados sugerem que os bloqueadores de hemicanais não bloqueiam o poro associado ao receptor P2X<sub>7</sub>. Dessa forma, indicando que os hemicanais não teriam participação na formação do poro do receptor P2X<sub>7</sub>.

31.011

MODULATION OF INFLAMMATORY CELLS APOPTOSIS INDUCED BY ORAL TOLERANCE IN A MODEL OF CHRONIC ALLERGIC AIRWAY INFLAMMATION IN GUINEA PIGS. <sup>1</sup>Nakashima, A. <sup>\*\*</sup>; <sup>1</sup>Ruiz, V. C.; <sup>1</sup>Prado, C. M. <sup>\*\*</sup>; <sup>1</sup>Fernandes, F. T. <sup>\*\*</sup>; <sup>1</sup>Leick-Maldonado, E. A.; <sup>2</sup>Capellozzi, V. L.; <sup>3</sup>Martins, M. A.; <sup>1</sup>Tibério, I. F. L. C. <sup>1</sup>Clínica Médica FMUSP; <sup>2</sup>Patologia FMUSP; <sup>3</sup>Clínica Geral FMUSP

**Objetivo:**

We reasoned that evaluation of different moments for induction of oral tolerance in a model of chronic allergic inflammation is important concerning the pathobiology of asthma. We studied the modulation of inflammatory cells apoptosis in guinea pigs (GP) with chronic airway inflammation that were rendered tolerant (OVA-T1 and OVA-T2 groups).

**Métodos e Resultados:**

GP were repeatedly exposed to ovalbumin (OVA) or normal saline (NS) aerosols 2x/week/4weeks. Oral tolerance was induced by offering GP *ad libitum* 2% ovalbumin in sterile drinking water beginning with the 1<sup>st</sup> and after the 4<sup>th</sup> inhalation with OVA (OVA-T1 and OVA-T2 groups, respectively). Non-tolerized GP received drinking sterile water (OA or NS groups). After 4 weeks, GP were anesthetized and lung were removed and stained for H&E and TUNEL assay. The relation between the number of apoptotic (AP) and total inflammatory cells (TIC) in airways was called apoptotic index (AI-%).

OVA showed greater number of TIC compared to NS, OVA-T1 and OVA-T2 (P<0.01 for all comparisons). Both OVA-T1 and OVA-T2 have greater number of AP (29.0 $\pm$ 4.6; 24.3 $\pm$ 6.7 cells/6.25x10<sup>4</sup>mm<sup>2</sup>) and AI (72.3 $\pm$ 7.7; 83.0 $\pm$ 5.2%) compared to OVA and NS (P<0.05 for all comparisons).

**Conclusões:**

Both models of oral induced tolerance effectively reduced inflammatory cells by inducing apoptosis. The mechanisms involved may be further investigated.

31.012

EXPRESSÃO DE CITOCINAS NOS PULMÕES DE PACIENTES COM TUBERCULOSE ANTES E APÓS O TRATAMENTO QUIMIOTERÁPICO. <sup>1</sup>Almeida, A. S. <sup>\*\*</sup>; <sup>1</sup>Peçanha, L. O. R.; <sup>1</sup>Lago, P. M. <sup>\*\*</sup>; <sup>1</sup>Baptista, V. C. S. F. <sup>\*\*</sup>; <sup>1</sup>Boechat, N.; <sup>1</sup>Kritski, A. L.; <sup>1</sup>Rezende, A.; <sup>2</sup>Ho, J. L.; <sup>1</sup>Lapa e Silva, J. R. <sup>1</sup>HUCFF-UFRJ; <sup>2</sup>Division of Pulmonary and Critical Care Medicine, Cornell University Medical Coll

**Objetivo:**

Identificar o perfil de citocinas nas células pulmonares durante processo de infecção ativa por *Mycobacterium tuberculosis* em cinco pontos temporais antes, durante e ao final do tratamento.

**Métodos e Resultados:**

O perfil de citocinas expressadas no pulmão humano durante a tuberculose pulmonar (TB) é ainda motivo de debate. Utilizando a técnica do Real Time PCR para estudar a expressão do mRNA para GAPDH e para 10 genes envolvidos na regulação imune (TNFa, IL-10, IL-12, IFNg, TGFb-RI, TGFb-RII, IL-1Ra, CD80 Socs3 and Socs1) foram estudados 23 pacientes com TB antes e após o início da quimioterapia específica (QT) em cinco pontos: diagnóstico, 15, 30, 60 e 180 dias após o início da QT. Todos os pacientes envolvidos foram definidos como curados pelos critérios clínicos e microbiológicos ao final da QT. Células do pulmão foram obtidas através do escarro induzido. A produção de citocinas inflamatórias (TNFa, IFNg) e molécula co-estimulatória (CD80) foi baixa comparada ao GAPDH. A expressão detectada de citocinas anti-inflamatórias ou receptores de citocinas (IL-10, IL1Ra, TGFb-RI, TGFb-RII) e genes regulatórios supressivos (Socs1, and Socs3) foi relativamente maior antes da QT. Após o início da QT, houve um aumento da TNF-a mas não

de IFN-g; enquanto as citocinas anti-inflamatórias ou seus receptores (IL-10, TGFb-RI, TGFb-RII genes regulatórios supressivos (Socs1, and Socs3) não retornaram aos níveis baixos vistos para IFN-g.

**Conclusões:**

Antes da terapia a expressão de citocinas inflamatórias e o grau de ativação celular são baixos no meio pulmonar. Isto pode contribuir para a contenção da resposta inflamatória excessiva no pulmão e reduzir os prejuízos no tecido.

31.013

PERFIL DE CITOCINAS EM MACRÓFAGOS E CÉLULAS B-1 NA TOLERÂNCIA AO LPS *IN VITRO* <sup>1</sup>Barbeiro, D. F.; <sup>2</sup> Barbeiro, H. V.\*\*; <sup>3</sup> Godoy, L. C.; <sup>6</sup> Soriano, F. G.; <sup>1</sup> Emergências Clínicas - FMUSP, FMUSP; <sup>2</sup> Emergências Clínicas - FMUSP, FMUSP; <sup>3</sup> Emergências Clínicas - FMUSP, Universidade de São Paulo; <sup>6</sup> Clínica Médica - FMUSP, USP

**Objetivo:**

Caracterizar a produção de citocinas e óxido nítrico (NO) no modelo de tolerância ao LPS com células peritoneais murinas.

**Métodos e Resultados:**

Macrófagos (MA) obtidos do lavado peritoneal de camundongos Xid (deficientes em células B-1); células da fração aderente a vidro (FA= macrófagos + B-1) do lavado peritoneal de Balb/c; células B-1 foram coletadas no sobrenadante 5 dias após a cultura da FA de Balb/c. As células ( $1 \times 10^6$  células/ml) foram mantidas em cultura, com trocas diárias de meio e receberam os seguintes tratamentos: GC-controle; G1-estímulo com LPS (10µg/ml) nas últimas 24h de cultura; G2-estímulo com LPS nas últimas 48h de cultura. Os sobrenadantes foram coletados após 72h e analisados por ELISA (TNF-alfa, IL-6 e IL-10) e reação de Griess (nitrito). Obtivemos valores elevados de TNF-alfa (pg/ml) no G1 quando comparado com GC e G2 nas células B-1 (97±47; 34±3; 29±2 respectivamente), na FA (871±129; 51±7; 63±2 respectivamente) e nos MA (1877±404; 117±23; 65±5 respectivamente). A quantificação de IL6 (pg/ml) em B-1 foi maior em G1 (88±15) quando comparado com GC (5±1) e G2 (14±2); na FA os grupos diferem entre si com GC(50±20)<G1(142±8)<G2(341±29) e não houve diferença nos MA. Os valores de IL10 (pg/ml) no G1 foram diferentes quando comparados com GC e G2 na FA (210±26; 99±20; 99±5 respectivamente) e em MA (236±47; 85±29; 106±19 respectivamente) e em B-1, os grupos G1 (168±24) e G2 (172±22) se elevaram quando comparado ao GC (72±7). Na quantificação de NO<sub>2</sub> (µM) observamos aumento na FA quando comparamos G2 (4±0,1) com GC (3,7±0,05); não houve variação nas células B-1 e nos MA o nível de NO<sub>2</sub> foi menor no GC (3,8±0,5) quando comparado com G1 (4,8±0,2) e G2 (4,5±0,2).

**Conclusões:** Nossos dados sugerem que as três populações celulares desenvolvem tolerância ao LPS e que as células B-1 podem modular a resposta do macrófago ao LPS, uma vez que produz em menor quantidade o TNF-alfa quando comparada aos MA e mantêm alta produção de IL10 mesmo após a segunda dose de LPS.

31.014

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL OXIDANTE/REDUTOR EM MACRÓFAGOS DE ANIMAIS "KNOCKOUT" PARA O RECEPTOR B1 PARA BRADICININA. <sup>1</sup>Lauton-Santos, S.; <sup>1</sup>Duarte, H. L. L.\*\*; <sup>1</sup>Araújo, I. C.\*; <sup>1</sup>Meneses, M. G. M\*; <sup>2</sup>Pesquero, J. L.; <sup>1</sup>Cruz, J. <sup>1</sup>Bioquímica e Imunologia ICB-UFMG; <sup>2</sup>Biofísica e Fisiologia UFMG

**Objetivo:**

Os receptores B1 para bradicinina não são expressos de forma constitutiva, mas têm sua expressão induzida por citocinas, fatores de crescimento ou ainda pela injúria vascular. É pouco investigado o envolvimento dos receptores B1 em processos inflamatórios não sendo clara a importância destes receptores para os mecanismos de controle da inflamação. Nosso objetivo é avaliar o perfil de produção de ROS, moléculas citotóxicas, envolvidas no processo de fagocitose por macrófagos peritoneais de camundongos "knockout" para o receptor B1 de bradicinina e avaliar a capacidade redutora celular.

**Métodos e Resultados:**

Utilizamos camundongos C57/Bl6J, machos, pesando 25±1,9g. A produção ROS foi verificada em macrófagos peritoneais de camundongos C57/Bl6J, B1R<sup>-/-</sup> e selvagens durante a fagocitose de

zymozan-C3b foi avaliada pelo ensaio de quimioluminescência, e, ao mesmo tempo investigamos a capacidade redutora da célula usando o ensaio de metabolização do MTT, após 2h de cultura os cristais de formazan produzidos foram solubilizados e a leitura era feita em espectrofotômetro a 540nm. Nossos resultados revelaram uma diminuição na produção de ROS e um aumento significativo da ( $0,89\pm 0,75$  DO, n=6) que expressa a capacidade redutora da célula quando comparado ao grupo controle ( $0,54\pm 0,01$  DO, n=6).

**Conclusões:**

Detectamos uma diminuição na produção de espécies reativas de oxigênio em animais B1R7 e ao mesmo tempo um aumento da capacidade redutora dos macrófagos. Este desequilíbrio pode causar prejuízo para as funções celulares de eliminação do agente infeccioso e distúrbios nas vias de sinalização celular.

31.015

EFEITO DO HUMOR AQUOSO SOBRE A PRODUÇÃO DE MEDIADOR INFLAMATÓRIO EM MACRÓFAGOS DE RATOS DESNUTRIDOS OU NÃO. <sup>1</sup>Macedo, E. M. C.; <sup>1</sup>Paes-Silva, R. P.; <sup>2</sup>de Biase, S. S. C.; <sup>3</sup>Castro, C. M. M. B.; <sup>1</sup>Nutrição, UFPE; <sup>2</sup>Medicina UFPE; <sup>3</sup>Medicina Tropical UFPE  
**Objetivo:** Avaliar o efeito do humor aquoso e da desnutrição precoce sobre a produção de óxido nítrico (ON) por macrófagos alveolares.

**Métodos e Resultados:** Foram utilizados ratos machos, Wistar, da colônia do Departamento de Nutrição-UFPE. Do total, 8 formaram o grupo controle e 6 o grupo desnutrido, obtido através de uma dieta deficiente contendo 8% de proteínas, utilizada pelas mães durante 21 dias ou seja, período de aleitamento. Em cada animal na idade adulta (entre 90 e 120 dias), realizou-se uma paracentese na câmara anterior ocular para aspiração do humor aquoso. Na mesma ocasião, realizou-se traqueostomia a fim de se obter macrófagos alveolares (MA). Para recuperação dos MA foi realizado um lavado broncoalveolar (LBA) com soro fisiológico. Alíquotas de 3 mL foram injetadas na traquéia e aspiradas, obtendo-se um volume final de 30 mL, a partir do qual, os MA foram separados por adesão em placas de Petri, com densidade de  $1 \times 10^6$  células/mL por poço, em meio de cultura (RPMI 1640) sendo distribuídos de acordo com o grupo controle ou desnutrido, acrescentando-se 25mcL de humor aquoso. A produção de ON foi determinada a partir do sobrenadante das células em cultura após tratamento por 24hs com LPS ou soro fisiológico, dependendo do grupo estudado. O grupo tratado com LPS ( $80,5\pm 8,4$ mcM; n=8) apresentou aumento importante da concentração ON ( $p=0,007$ ) quando comparado ao controle ( $50,0\pm 4,7$ mcM; n=8). Ao adicionar humor aquoso aos macrófagos tratados com LPS ( $48,7\pm 8,6$ mcM; n=8) houve uma redução significativa ( $p=0,02$ ) na produção de ON, quando comparado ao grupo apenas tratado com LPS ( $80,5\pm 8,4$ mcM; n=8). No grupo de animais desnutridos não houve diferença significativa.

**Conclusões:**

O humor aquoso reduziu a produção de óxido nítrico pelos macrófagos alveolares tratados com lipopolissacarídeo, *in vitro*, não ocorrendo, no entanto, alterações nos animais que sofreram desnutrição precoce.

31.016

AVALIAÇÃO DA MODULAÇÃO DO PROCESSO INFLAMATÓRIO INDUZIDO POR IMPLANTES SUBCUTÂNEOS DE PARAFINA ATRAVÉS DA ADMINISTRAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS POLIINSATURADOS. <sup>1</sup>Oliveira, F. M.; <sup>1</sup>Braga, D. K.; <sup>1</sup>Gusmão, L. J.; <sup>1</sup>Silva, G.; <sup>1</sup>Muradas, R. F.; <sup>2</sup>Martins, T.; <sup>1</sup>Silva, A. C.; <sup>1</sup>Ciências da Saúde Unileste; <sup>2</sup>Patologia UFMG

**Objetivo:**

Vários estudos vêm demonstrando os efeitos benéficos dos ácidos graxos poliinsaturados (AGPIs; ômega-3) no processo inflamatório, agudo ou crônico, através de interferências na regulação gênica e no metabolismo. Portanto, neste trabalho foi utilizado o modelo inflamatório induzido por implantes de parafina a fim de avaliar os efeitos da administração dos AGPIs em camundongos.

**Métodos e Resultados:**

Foram utilizados camundongos *Swiss*, fêmeas, 6-8 semanas de idade. Vinte e um dias após o implante subcutâneo da parafina (dorso), os animais (n = 5) receberam 8 (1 vez/por semana) ou 24 (3 vezes/semana) doses de ômega-3 por via oral (2 mg/g) ou por via subcutânea (0,1mg/g) no local do implante. O grupo controle (n = 5) não recebeu tratamento com ômega-3. Após o tratamento



com os AGPIs, foram avaliados área do granuloma formada ao redor da parafina com o auxílio de um paquímetro, cortes histológicos do granuloma e da pele circundante. A administração de ômega-3 por via oral – 8 ou 24 doses – não modificou o aspecto macroscópico do granuloma induzido por implantes de parafina quando comparado com o dos animais do grupo controle. Além disso, não houve diferença significativa na área granuloma. Por outro lado, a administração subcutânea de ômega-3 resultou em alterações macroscópicas - aumento da vascularização e da área do granuloma, retenção do óleo de peixe na cápsula. A inoculação de ômega-3 por via subcutânea, mesmo em animais que não receberam os implantes de parafina, induziu os efeitos descritos anteriormente, ou seja, o ômega-3 por via subcutânea foi capaz de sustentar um influxo de células inflamatórias através da ativação de uma reação granulomatosa.

**Conclusões:**

Não foi possível observar alterações macroscópicas e microscópicas do granuloma desenvolvido em animais tratados com ômega-3 por via oral utilizando o protocolo anteriormente descrito. Por outro lado, a administração de ômega-3 por via subcutânea demonstrou ser uma ferramenta útil para o estudo de mecanismos de ações de substâncias antiinflamatórias uma vez que administração desse AGPI por via subcutânea estimulou a reação inflamatória do tipo granulomatosa.

31.017

CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS MONONUCLEADAS (CMN) DOS LINFONODOS MESENTÉRICOS (LM) QUANTO À SENSIBILIDADE AO ATP EXTRACELULAR (ATPE). Campos N. E.; Souza, C. O. ; Coutinho-Silva, R. Imunobiofísica IBCCF-UFRJ

**Objetivo:**

O trato gastrointestinal (TGI) contém muitas espécies de bactérias e o seu funcionamento está diretamente relacionado com o balanço entre a resposta imune a antígenos patogênicos e os presentes na dieta. Receptores P2 são receptores para nucleotídeos presentes em quase todos os órgãos e sistemas. Recentemente foi mostrado que uma dieta rica em nucleotídeos agrava a inflamação intestinal e que alguns receptores P2 são modulados positivamente na inflamação do TGI. O objetivo do trabalho é estudar a sensibilidade ao ATPe das CMN dos LM visando a caracterização dos receptores P2 presentes nas mesmas.

**Métodos e Resultados:**

Camundongos Balb/c com 10-15 semanas, com uma média de 5 LM por camundongo. Obtenção de células dos LM por método de maceração mecânica. No ensaio de permeabilização da membrana induzida por ATP, as CMN são incubadas a 37°C por 15 minutos na presença de diferentes concentrações de ATP e brometo de etídio 2,5 µM. As células são levadas então para leitura da fluorescência no citômetro de fluxo.

Os linfócitos se mostram mais sensíveis ao ATP que os macrófagos no LM, sendo a resposta máxima obtida em 500 µM (41± 10%;n=8) e em 5 mM (44± 10%;n=5), respectivamente. Curvas doses-resposta foram traçadas para as CMN dos LM e do peritônio. A análise dos EC<sub>50</sub> mostra que os linfócitos, e em menor escala os macrófagos do LM, são mais sensíveis ao ATP que os oriundos do peritônio. O EC<sub>50</sub> obtido para os linfócitos foram de 20± 16 µM (n=8) no LM contra 259± 34 µM (n=5) no peritônio e para os macrófagos, de 66± 32 µM (n=5) e 128± 64 µM (n=5), respectivamente. Pré-incubação com zinco e cobre modula de forma dose dependente a resposta em ambos sítios estudados.

**Conclusões:**

Nossos achados sugerem haver modulação sítio específico de expressão dos receptores P2X<sub>7</sub> nas células imunes e/ou a presença de outros receptores P2X funcionais e que formam poros nas CMN dos LM.

31.018

EFFECT OF ALLERGEN SENSITIZATION ON EOSINOPHIL PRECURSOR RESPONSES TO CYTOKINES AND CHEMOKINES IN BONE-MARROW CULTURE. <sup>1</sup>Sales, S. C. M.; <sup>2</sup>Maximiano, E. S.; <sup>1</sup>Gaspar Elsas, M. I.; <sup>3</sup>Carneiro, A.S.; <sup>1</sup>Teixeira, M. P. C.; <sup>4</sup>Vargaftig, B.B.; <sup>2</sup>Elsas, P. P. X. <sup>1</sup>Pediatria FIOCRUZ / Instituto Fernandes Figueira; <sup>2</sup>Imunologia UFRJ; <sup>3</sup>Pediatria FIOCRUZ; <sup>4</sup>Farmacologia ICB-USP

**Objetivo:**

We previously described modulation of bone-marrow (BM) responses to eosinopoietic cytokines by allergen sensitization and challenge, as well by dexamethasone (DEX), prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), and indomethacin (INDO).

Here we evaluated whether these factors interact in IL-5 stimulated BM cultures, and whether this affects responses to IL-13 and Eotaxin.

**Métodos e Resultados:**

We evaluated the modulation of eosinophil precursor responses to IL-5 in liquid BM culture by different agents, comparing naïve and allergic BALB/c and C57BL/10 mice. C57BL/10 responded to allergen sensitization and challenge differently from BALB/c mice. Comparable responses to DEX and PGE<sub>2</sub> were observed in both strains. Indomethacin was effective in naïve but not immune BALB/c mice, and ineffective in C57BL/10 mice. We analysed the response to IL-13, a cytokine that plays a central role in the pathophysiology of asthma. IL-13 synergized with IL-5 in stimulation of bone-marrow from naïve BALB/c mice, but inhibited dose-dependently the response to IL-5 in sensitized and challenged mice. On the other hand, IL-13 was ineffective on BM from naïve C57BL/10 mice. By contrast, it significantly inhibited responses to IL-5 in bone-marrow of sensitized/challenged mice of the same strain. In the BALB/c strain, sensitization followed by airway challenge shifted eotaxin from a strongly synergic, stimulatory agent, to a powerful inhibitor of the same response, pointing to immunomodulation of bone-marrow response patterns. By contrast, C57BL/10 mice were refractory to eotaxin, regardless of sensitization, indicating that the pattern of response to eotaxin depends on the genetic background.

**Conclusões:**

Bone-marrow responses to different modulatory agents depend on at least 3 factors: mouse strain, the immunological status of the host and the agent itself.

31.019

IN VIVO LEUKOCYTE-ENDOTHELIUM INTERACTIONS IN RAT MESENTERIC MICROVESSELS AFTER ISCHEMIA/REPERFUSION AND SEPSIS. <sup>1</sup>Shiwa, S. R.; <sup>1</sup>Nakagawa, N. K.; <sup>2</sup>Sinosaki, S. <sup>\*\*</sup>; <sup>2</sup>Figueiredo, L. F. P.; <sup>5</sup> Sannomiya, P.; <sup>2</sup>Rocha e Silva, M.; <sup>1, 2</sup> Fisioterapia, UNICID; <sup>2</sup>Cardio-Pneumologia INCor; <sup>3</sup>Fisiologia InCor-HC-FMUSP

**Objetivo:**

Leukocyte-endothelium interaction is known to be a remarkable event at the beginning of a systemic inflammatory response syndrome. The aim of this study was to evaluate leukocyte-endothelium interactions in superfused mesenteric post-capillary venules after hemorrhagic shock/reperfusion and cecal ligation and puncture in rats.

**Métodos e Resultados:**

Wistar rats (200-250g) were submitted to the following interventions: a) 0 hour: anesthesia with sodium pentobarbital (50mg/kg IP), hemorrhagic shock (MAP~40mmHg lasting 1 hour)+reperfusion with lactated Ringer's solution (3x shed blood) + 25% of the shed blood; b) 24 hours: anesthesia+cecal ligation+puncture; c) 48 hours: anesthesia+cecal resection+peritoneal lavage; d) 72 hours: anesthesia+mesentery intravital microscopy (venules diameter: 15-25µm).

**Results:** Data are presented as mean ± SD (Table).

Leukocyte-endothelium interactions in rat mesenteric post-capillary venules.

Groups	n	Rolling cells /10 min	Adherent cells /100µm venule lenght	Migrated cells/5.000 µm <sup>2</sup>
SHAM	4	100±13	3±1	2±1
+CLP	6	215±25*	15±1*	15±1*

+CLP+REL	3	106±13	5±1	5±1
HS+25%	4	215±14*	14±2*	16±1*
+CLP	5	219±9*	20±2*	16±1*
+CLP+REL	4	105±12	8±1	8±1
HS+25%+RL	3	175±10*	12±0*	13±1*
+CLP	3	207±16*	16±1*	16±1*
+CLP+REL	4	102±12	4±1	15±1*

HS, hemorrhagic shock; 25%, reinfusion of 25% of the shed blood volume; LR, lactated Ringer's solution; CLP, cecal ligation and puncture; REL, cecal resection and peritoneal lavage; \*, p<0,01 compared to SHAM

#### Conclusões:

The double hit-model induced a severe inflammatory injury similar to CLP alone. The inflammation was overcome by REL. Up to 72 hours of reperfusion with lactated Ringer's solution and 25% of the shed blood volume, inflammation is still evidenced by the increased number of migrated cells in the perivascular tissue.

31.020

ROLE OF SELECTINS IN ALLERGEN-INDUCED  $\gamma\delta$  T CELL MIGRATION. <sup>1</sup>Costa, M. F. S.<sup>\*\*</sup>; <sup>2</sup>Bachini, E.; <sup>2</sup>Penido, C.; <sup>2</sup>Henriques, M. G. M. O. <sup>1</sup>Farmacologia Aplicada, FIOCRUZ; <sup>2</sup>Far-Manguinhos FIOCRUZ

**Objetivo:**  $\gamma\delta$  T cells are involved in several inflammatory diseases, and it has been demonstrated an increase in  $\gamma\delta$  T cell numbers in pleural washes of allergen challenged mice and bronchoalveolar fluids from asthmatic patients (Immunol. Today 19:22, 1998). Moreover, these cells contribute to allergic airway inflammation regulating IgE and IL-5 levels as well as eosinophil recruitment (Science 280:1265, 1998). It has been described that selectins mediate lymphocyte migration to the inflammatory site in response to various stimuli (J. Exp. Med. 186:1701, 1997; J. Immunol. 15:162,1999; International Immunol. 14:751, 2002). However, the mechanisms involved in  $\gamma\delta$  T cell migration into allergic sites are still unclear. In the present study we investigated the role of selectins in  $\gamma\delta$  T cell recruitment in antigen-challenged mice.

**Métodos e Resultados:** The intrathoracic (i.t.) injection of ovalbumin (12.5  $\mu$ g/cav.) into sensitized C57Bl/10 mice induced a significant increase in the numbers of total leukocytes (Sal 1.6±0.18 X Ova 3.7±0.4 x10<sup>6</sup> cells/cavity) and  $\gamma\delta$  T cells in the pleural cavity within 48h (Sal 0.8±0.8 X Ova 1.9±0.3 x10<sup>3</sup> cells/cavity, n=8) after the stimulus.  $\gamma\delta$  T cell accumulation remained significantly above control values until 120h (Sal 1.6±0.4 X Ova 3.6±0.6 x10<sup>3</sup> cells/cavity, n=8). The influx of  $\gamma\delta$  T cells into the mice pleural cavity was inhibited by the pre-treatment with fucoidan (10 mg/Kg, i.v.; Sal 0.6±0.1 X Ova 2.4±0.5 X Fuc 1.1±0.2 x10<sup>3</sup> cells/cavity, n=8), a potent inhibitor of selectin function. According to this, flow cytometry analysis showed an important shedding of L-selectin molecules from  $\gamma\delta$  T cells recovery from challenged mice when compared with control animals (Sal 30.17 X Ova 12.98, IgG 1.66, n=6). P values  $\leq$  0.05 were regarded as significant.

**Conclusões:** Taken together such results established a role for selectins on the mobilization of  $\gamma\delta$  T cells into the mice pleural cavity induced by ovalbumin.

31.021

LEUKOCYTE LIPID BODY FORMATION INDUCED BY *HISTOPLASMA CAPSULATUM*. <sup>1</sup>Sorgi, C. A.; <sup>2</sup>Peres, C. M.\*\*; <sup>2</sup>Turato, W. M.\*\*; <sup>2</sup>Bolzoni, R. M. F.\*\*; <sup>2</sup>Medeiros, A. I.; <sup>3</sup>Bozza, P. T.; <sup>2</sup>Faccioli, L. H.; <sup>1</sup>Bioquímica e Imunologia USP; <sup>2</sup>Análises Clínicas Toxicológicas e Bromatológicas FCFRP-USP; <sup>3</sup>Fisiologia e Farmacodinâmica FIOCRUZ

**Objetivo:** Lipid bodies (LBs) are rapidly inducible, lipid-rich cytoplasm domains and sites for eicosanoid-forming enzyme localization which may have specific roles in enhanced inflammatory mediator production during pathology. In this work, we analyzed the lipid body occurrence in histoplasmosis and its correlation with eicosanoid metabolism.

**Métodos e Resultados:** C57/Bl6 mice, weighing 18-20 g were used. For *in vivo* experiments, 100  $\mu$ L of PBS was inoculated intratracheally in the control group or a sub lethal dose of *H. capsulatum* (Hc) ( $5 \times 10^5$  yeast cells in a volume of 100  $\mu$ L) in the infected group. On days 1, 5, 7 and 14 after injection, the bronchoalveolar lavage fluid (BALF) was recovered, the cells fixed and stained with osmium tetroxide to enumerate the LBs. Other fraction of cells was stimulated with A23187 and ELISA assayed eicosanoids in the supernatants. For *in vitro* experiments, alveolar macrophages from BALF in naïve animal, were incubated with dead fungus, alkali-insoluble fraction 1 (F1) which contains mainly  $\beta$ -glucan from the cell wall of Hc and LPS for 0, 1, 4, 8, 16 and 24 hours. Control cells were incubated with medium (RPMI). The LBs were enumerated. At 5 days post-infection (p.i.), in Hc infected animals LBs formation increased in comparison with PBS inoculated animals (PBS:  $6.01 \pm 0.6$ ; Hc:  $14.4 \pm 0.8$ ;  $p < 0,005$ ;  $n=6$ ), maximum within 7 days (PBS:  $8.01 \pm 0.6$ ; Hc:  $20.4 \pm 0.8$ ;  $p < 0,001$ ;  $n=6$ ) and decreased thereafter. This increase in LBs correlate with leukotriene  $B_4$  ( $LTB_4$ ) production that was maximum at 7 days p.i. (PBS:  $48.0 \pm 2.6$ ; Hc:  $24\ 000 \pm 26.0$  pg/mL;  $p < 0,001$ ;  $n=6$ ). The dead fungus, F1 and LPS increased lipid body formation within 1 hour (RPMI:  $5.8 \pm 0.5$ ; Dead fungus:  $9.6 \pm 0.7$ ; F1:  $14.3 \pm 0.8$ ; LPS:  $13.2 \pm 0.4$ ;  $p < 0,005$ ;  $n=3$ ) in cell culture, maximum within 8 hours (RPMI:  $8.7 \pm 0.6$ ; Dead fungus:  $17.0 \pm 0.8$ ; F1:  $21.7 \pm 0.7$ ; LPS:  $20.2 \pm 0.8$ ;  $p < 0,001$ ;  $n=3$ ) and decrease thereafter.

**Conclusões:** The infection by Hc induced time-dependent increase in the numbers of LBs in pulmonary leukocytes and leukotrienes generation, like as the dead fungus. Therefore,  $\beta$ -glucan appears to be the responsible compound for inducing LBs and  $LTB_4$  increase.

31.022

ESTUDO PRELIMINAR DAS CÉLULAS DA HEMOLINFA DO CAMARÃO *MACROBRACHIUM OLFERSI*. Rosa, R. D.\*\*; Rosado, D. B.; Bandeira, P. T.\*; Kayser, M.\*; Gargioni, R.; Barracco, M. A. BEG-UFSC

**Objetivo:**

*M. olfersi* (Decapoda: Palaemonidae), popularmente conhecido como pitú, é uma espécie de camarão (menos de 90mm) que habita ambientes dulciaquícolas e estuarinos em todo o Brasil. O objetivo do presente trabalho foi o de realizar um estudo morfológico básico das células da hemolinfa ou hemócitos de adultos de *M. olfersi* para subsidiar estudos posteriores sobre a imunologia desta espécie.

**Métodos e Resultados:**

Indivíduos adultos foram coletados em mananciais de água doce do Parque Municipal da Lagoa do Peri, na Ilha de Santa Catarina. A hemolinfa ( $n=10$ ) foi extraída diretamente da cavidade cardíaca, em uma solução anticoagulante contendo EDTA, e utilizada para a determinação dos hemogramas e a caracterização dos hemócitos. As células circulantes foram analisadas em esfregaços frescos observados ao microscópio de contraste de fase ou através da coloração Giemsa. Nos esfregaços foram identificados dois tipos básicos de hemócitos: hemócitos hialinos (HH) e hemócitos granulares (HG). Os HH distinguem-se dos HG pela ausência de grânulos citoplasmáticos. Foram encontrados HH pequenos ( $12\ \mu$ m), com aspecto indiferenciado e com alta relação núcleo-citoplasmática e HH de maior tamanho ( $15\ \mu$ m), com citoplasma mais abundante e eosinófilo na coloração Giemsa. Os HG, por sua vez, também possuem um tamanho variado ( $12-17\ \mu$ m) e seu citoplasma geralmente eosinófilo, caracteriza-se por uma abundância de grânulos comumente

basófilos na coloração Giemsa. A contagem total de hemócitos (THC), realizada em câmara de Neubauer, foi de  $7.345 \pm 1.866$  células/mm<sup>3</sup> de hemolinfa. Os hemócitos granulares são predominantes na hemolinfa, representando cerca de 64% das células circulantes.

**Conclusões:**

Uma avaliação hemato-imunológica mais completa está em progresso em nosso laboratório, com a finalidade de compreender os aspectos funcionais destas células e seu envolvimento no sistema imune de *M. olfersi*.

31.023

AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIFÚNGICA E ANTIPARASITÁRIA DO FATOR ANTI-LIPOPOLISSACARÍDEO (ALF) PRODUZIDO NOS HEMÓCITOS DO CAMARÃO *LITOPENAEUS VANNAMEI*. <sup>1</sup>Lofgren, S.E.; <sup>2</sup>Smânia Jr., A.; <sup>2</sup>Steindel, M.; <sup>3</sup>Bachère, E.; <sup>1</sup>Barracco, M. A.; <sup>1</sup>Biologia Celular Embriologia e Genética UFSC; <sup>2</sup>Microbiologia e Parasitologia CCB-UFSC; <sup>4</sup>, Université. Montpellier I

**Objetivo:** Peptídeos antimicrobianos (PAM) são moléculas efetoras do sistema imune inato que podem apresentar atividade contra uma ampla variedade de microrganismos, sendo bons candidatos potenciais para novos agentes terapêuticos. Neste trabalho, foram investigadas a atividade antifúngica e antiparasitária do peptídeo ALF (fator anti-lipopolissacarídeo de 11,3kDa), produzido nos hemócitos do camarão *L. vannamei* e já caracterizado quanto à sua atividade antibacteriana. Sua estabilidade a diferentes salinidades foi também avaliada.

**Métodos e Resultados:**

O ALF utilizado neste trabalho foi produzido em sistema recombinante (leveduras) e caracteriza-se por ter uma potente atividade contra bactérias Gram negativas, incluindo bactérias marinhas do gênero *Vibrio*. Nos ensaios antifúngicos, esporos de fungos dermatófitos, *Microsporum canis* e *Trichophyton mentagrophytes* ( $10^4$  esporos/mL) foram incubados com diluições seriadas de ALF (0,02-50µM) por 48h, sendo as concentrações mínimas inibitórias (MIC) do peptídeo determinadas através de densidade óptica (630nm). O ALF não teve efeito sobre o crescimento de ambas espécies de fungos, em nenhuma concentração testada. A atividade antiparasitária foi avaliada incubando-se as formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* e promastigotas de *Leishmania brasiliensis* ( $10^7$  células/mL) com diluições seriadas de ALF (0,78-100µM) por períodos de 5h (atividade parasiticida) e de 24 e 72h (atividade antiproliferativa), utilizando o método colorimétrico do MTT. O ALF teve uma fraca atividade antiproliferativa apenas sobre *L. brasiliensis* (redução de 20% na viabilidade celular) após 24 e 72h de incubação, a partir de 50µM. Com relação à sua estabilidade a diferentes salinidades (28-450mM NaCl), o ALF perde sua atividade (pelo menos 4x) em altas salinidades (mais de 112mM NaCl) e aumenta sua atividade (de 2 a 4x) em salinidades baixas (28mM NaCl).

**Conclusões:** Apesar de seu potente efeito contra bactérias Gram negativas, o ALF não se mostrou ativo contra os fungos filamentosos testados e apresentou uma fraca atividade antiparasitária e apenas contra *L. brasiliensis*. A atividade do ALF decresce significativamente em altas salinidades e aumenta em baixas salinidades.

31.024

BACTÉRIAS REDUTORAS DE SULFATO (BRS) INDUZEM APOPTOSE EM CÉLULAS EPITELIAIS INTESTINAIS HUMANAS. <sup>1</sup>Souza, C. O.; <sup>1</sup>Campos, NE; <sup>1</sup>Coutinho-Silva, R.; <sup>2</sup>Coutinho, C. M. L. M. <sup>1</sup>Imunobiofísica IBCCF-UFRJ; <sup>2</sup>Biologia Celular e Molecular UFF

**Objetivo:** A colite ulcerativa é uma doença inflamatória aguda e crônica do intestino grosso e tem sido associada ao aumento na incidência de câncer de cólon. Vários estudos sugerem o possível envolvimento de BRS na etiologia dessa doença. O objetivo do trabalho é estudar a infecção *in vitro* de linhagens de células epiteliais humanas com cepa pura de BRS, buscando identificar um possível mecanismo de citotoxicidade destas bactérias sobre células epiteliais intestinais humanas

**Métodos e Resultados:**

Cepa de BRS *Desulfovibrio indonensiensis* foi cultivada usando o meio seletivo Postgate C. Linhagem de células epiteliais intestinais humanas HCT8 foi mantida em meio DEMEM com bicarbonato de sódio suplementado com soro fetal bovino 10%, penicilina (100µg/ml) e estreptomomicina (100 µg/ml). Foram realizados ensaios *in vitro* de infecção, incubando-se culturas de células HCT8 com BRS por diferentes períodos de tempo. As células usadas como controle e

aquelas infectadas com BRS foram processadas para análise de apoptose pelo uso de tampão de lise contendo brometo de etídeo, através da leitura de células hipodiplóides em citômetro de fluxo. BRS induziu apoptose nas células HCT8. As células que foram infectadas por 24h com o dobro da concentração de bactérias mostraram apoptose maior (24±6%) se comparadas com aquelas inoculadas com concentração de  $1 \times 10^5$  bactérias/ml (9±3%). Observou-se, também, aumento da apoptose em função dos tempos de infecção testados (24h e 48h).

**Conclusões:** Nossos estudos sugerem que BRS podem ser citotóxicas, possuindo a habilidade de induzir apoptose em células epiteliais intestinais humanas. A apoptose induzida em células HCT8 aumentou nas situações de aumento da concentração de bactérias inoculadas e de tempos maiores de infecção. Os resultados reforçam dados da literatura que apontam para um possível envolvimento de BRS na etiologia da doença colite ulcerativa.

31.025

DEXAMETHASONE AND ALLERGENIC SENSITIZATION UPREGULATE EXPRESSION OF A4 INTEGRINS IN EOSINOPHIL PRECURSORS. <sup>1</sup>Gaspar Elsas, M. I.; <sup>2</sup>Vieira, J. L.; <sup>1</sup>Sales, S. C. M. <sup>\*\*</sup>; <sup>3</sup>Silva, C. P. J. D. <sup>\*\*</sup>; <sup>3</sup>Maximiano, E. S. <sup>\*\*</sup>; <sup>1</sup>Rodrigues, M. P. A.; <sup>1</sup>Aragão, L. S. <sup>\*</sup>; <sup>1</sup>Masid, D. <sup>\*</sup>; <sup>4</sup>Vargaffig, B.B.; <sup>3</sup>Elsas, P. P. X.; <sup>1</sup>Pediatria FIOCRUZ / Instituto Fernandes Figueira; <sup>2</sup>Hanseníase IOC-FIOCRUZ; <sup>3</sup>Imunologia UFRJ; <sup>4</sup>Farmacologia USP

**Objetivo:**

a4 integrins are expressed on multipotent hemopoietic progenitors and play a role in their migration, homing, and proliferation. Systemic treatment with dexamethasone (Dex), in murine models of allergic inflammation, blocks eosinophil (EOS) recruitment to inflammatory sites. By contrast, Dex significantly increases eosinophil precursor responses to IL-5 in bone-marrow cultures. Eosinophils generated in the presence of IL-5 and Dex are highly aggregated and morphologically immature, suggesting that increased expression of adhesion molecules is accompanied by a maturational arrest.

To evaluate the effect of Dex and allergenic sensitization on the expression of a4, b1 and b7 integrins during eosinopoiesis, and to correlate integrin expression with aggregation and morphological maturation.

**Métodos e Resultados:**

We evaluated the expression of a4 integrins (b1 and b7) in bone-marrow liquid cultures from naive, from ovalbumin-sensitized or from Dex-treated BALB/c mice, established in the presence of IL-5 ( $1 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ ), alone or in association with Dex ( $10^{-7} \text{ M}$ ). Integrin expression was evaluated at day 7 of culture by immunocytochemistry and by flow cytometry.

Dex ( $10^{-7} \text{ M}$ ) significantly increased the frequency of a4<sup>+</sup> cells, as well as the intensity of expression of a4 in eosinophil precursors, relative to IL-5 control cultures ( $P < 0,001$ ). Dex significantly increased the frequency of b1<sup>+</sup> eosinophils ( $P < 0,001$ ), but not the frequency of b1<sup>+</sup> mononuclear cells. In Dex-treated cultures, a4 integrin expression was highest in the region of contact between neighboring cells in aggregates. Neutralizing anti-a4 antibody, when added at day 3 of culture, was able to dissociate the clusters of aggregated immature eosinophils and made it possible for them to undergo terminal differentiation. By contrast, addition of anti-a4 antibody, at day 1 of culture, blocked eosinophilic differentiation induced by IL-5 (alone or in association with Dex). Ovalbumin sensitization and challenge increased a4 expression in bone-marrow cultures, but no maturational arrested was seen.

**Conclusões:** Both Dex and allergic sensitization enhance a4 integrin expression in developing EOS. a4 integrins play a dual role in EOS differentiation.

31.026

DIABETES: AVALIAÇÃO DO PODER ANTIOXIDANTE DO PLASMA POR MTT E A PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ROS) POR GRANULÓCITOS DE PACIENTES DIABÉTICOS. <sup>1</sup>Medina, L. O.; <sup>1</sup>Cunha, E. P. <sup>\*\*</sup>; <sup>1</sup>Veloso, C. A. <sup>\*</sup>; <sup>1</sup>Calsolari, M. R.; <sup>2</sup>Chaves, M. M.; <sup>1</sup>Nogueira-Machado, J. A.; <sup>1</sup>Imunologia Molecular e Celular Santa Casa de Misericórdia; <sup>5</sup>Bioquímica e Imunologia, UFMG

**Objetivo:** ROS estão envolvidas na patogenia do diabetes. Atualmente tem sido discutido o efeito antioxidante da albumina plasmática. Neste trabalho quantificamos simultaneamente, a produção

de ROS produzidos por granulócitos e a capacidade antioxidante do plasma em diabéticos tipo II (T2D) e não diabéticos (N.D).

**Métodos e Resultados:** ROS foi quantificado por quimioluminescência e o poder antioxidante do plasma por redução de MTT. Os resultados foram expressos em RLU/min  $\times 10^{-3}$  M e D.O. 570 nm para a produção de ROS e redução de MTT. Os resultados mostraram que o plasma do diabético (T2D) e do não diabético (N.D) reduziram o MTT de forma semelhante: T2D(n=6) =  $0.317 \pm 0.038$ , N.D(n=6) =  $0.375 \pm 0.029$  (N.S). Com relação à produção de ROS por granulócitos, os resultados foram: T2D(n=17) =  $63 \pm 17$ , N.D(n=22) =  $28 \pm 7$  (N.S). Para mimetizar o efeito do meio hiperglicêmico as células foram tratadas com um análogo de diacilglicerol (DAG), éster de forbol (PBD) 10-7M, durante 45 min. Os resultados foram: T2D(n=17) =  $224 \pm 63$ , N.D(n=22) =  $42 \pm 10$  ( $p < 0.05$ ). Este trabalho foi aprovado pelo comitê de ética da Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte (SCM-BH).

#### **Conclusões:**

Estes resultados nos permitem concluir que:

1. A redução do MTT pelo plasma favorece a idéia do seu efeito antioxidante;
2. Não houve diferença entre o poder antioxidante do plasma nem na produção de ROS por granulócitos de pacientes diabéticos ou não;
3. No entanto, em presença de PDB a produção de ROS em diabéticos foi maior;
4. Estes dados, no seu conjunto, sugerem que o balanço oxidante/antioxidante no diabetes parece ser alterado na presença de PDB, que funciona com DAG, o qual tem a sua síntese induzida pela hiperglicemia.

31.027

CARACTERIZAÇÃO DOS EFEITOS DO GLUTAMATO MONOSSÓDICO SOBRE AS CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DE GLICOSE E SOBRE A FUNCIONALIDADE DE CÉLULAS DO SISTEMA IMUNITÁRIO EM RATOS WISTAR. Grando, F. C. C.; <sup>2</sup> Nunes, E. A. <sup>\*\*</sup>; Miranda, D. T. S. Z. <sup>\*\*</sup>; Batista, V. G. <sup>\*\*</sup>; Brito, G. A. P. <sup>\*\*</sup>; Bonatto, S. J. R. <sup>\*\*</sup>; Twardowschy, A. <sup>\*</sup>; Oliveira, H. H. P. <sup>\*\*</sup>; <sup>9</sup> Muehlmann, L. A. <sup>\*</sup>; Rubbo, G. F. S. <sup>\*</sup>; Fernandes, L. C.; Nishiyama, A. Fisiologia Celular UFPR

**Objetivo:** O tratamento com glutamato monossódico (GMS) em ratos neonatos provoca alterações neurotóxicas, resultando em distúrbios metabólicos e endócrinos. O objetivo deste trabalho foi de avaliar o efeito do GMS sobre as concentrações séricas de glicose e sobre a funcionalidade de neutrófilos e linfócitos de ratos Wistar.

**Métodos e Resultados:** Ratos Wistar neonatos receberam injeção subcutânea de 4mg/g peso corporal de GMS durante 5 dias consecutivos. O sangue dos animais, com 80 dias, foi coletado para determinação de glicose. Foram observadas alterações significativas na glicemia em relação ao grupo controle. Também procedeu-se o teste de tolerância oral à glicose (TTGO) após administração via oral de 2g/kg peso corpóreo de glicose. Os neutrófilos foram coletados para avaliação da produção de NO, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e O<sub>2</sub><sup>-</sup>. Coletou-se gordura epididimal e órgãos linfóides. Os linfócitos foram cultivados na presença de concanavalina A e a capacidade proliferativa e o metabolismo foram estimados pelo método da incorporação da timidina radiomarcada e redução do MTT, respectivamente. Os resultados demonstram que ratos tratados com GMS apresentam aumento em 114% na massa lipídica do epidídimo e que, estes animais apresentam intolerância à glicose. Observou-se que houve aumento de até 58% no tamanho dos órgãos linfóides de ratos tratados com GMS. Verificou-se também que neutrófilos apresentaram alterações nas produções de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, enquanto linfócitos apresentaram alterações em sua capacidade proliferativa.

**Conclusões:** O tratamento de ratos Wistar neonatos com GMS altera o TTGO e a funcionalidade de células do sistema imunitário.

31.028

DIABETES TIPO 2: COMPARAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ROS) POR GRANULÓCITOS PURIFICADOS E SANGUE BRUTO. <sup>1</sup>Veloso, C. A.; <sup>2</sup>Cunha, E. P. <sup>\*\*</sup>; <sup>2</sup>Medina, L. O. <sup>\*\*</sup>; <sup>2</sup>Calsolari, M. R.; <sup>2</sup>Chaves, M. M.; <sup>2</sup>Nogueira-Machado, JA; <sup>1</sup>Imunologia Molecular e Celular Santa Casa de Misericórdia; <sup>2</sup>Bioquímica e Imunologia, Santa Casa de Misericórdia

**Objetivo:** Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) têm importante papel na patogenia do diabetes. O objetivo do presente trabalho visa avaliar comparativamente a produção de ROS por granulócitos purificados e sangue bruto sob estimulação ou não de éster de forbol (PDB).

**Métodos e Resultados:**

Granulócitos (G) foram purificados em gradiente Ficoll-hypaque e o sangue bruto (SB) diluído ou não foi coletado em heparina e usado diretamente. Sangue bruto (SB) (100 µL) ou granulócitos (1 x 10<sup>6</sup>/100 µL) foram adicionados ao tubo contendo 200 µL de luminol; 500 µL de PBS na ausência ou presença de 30 µL de PDB (10-5M ou 10-7M). A produção de ROS foi quantificada em luminômetro (Magic Analyzer - Ciba Corning) durante 60 minutos. O PDB foi adicionado após 15 minutos de reação. Os nossos resultados obtidos em RLU/min ("relative light units") foram expressos pela relação entre o experimento realizado na presença (E) ou ausência (C) de PDB. Os valores para sangue bruto (SB) foram: não diabético (ND) = 8.58 ± 0.79 (N = 5); diabético (D) = 9.2 ± 1.37 (N = 6), (NS) e para granulócitos (G), ND = 1.5 ± 0.08 (N = 22) e D = 3.7 ± 1.0 (N = 15), (P<0.05).

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Santa de Misericórdia de Belo Horizonte (SCM-BH).

**Conclusões:**

Os presentes resultados nos permitem concluir que:

- 1) A maior produção de ROS por granulócitos de diabéticos pode sugerir implicações na imunidade inata e nos processos inflamatórios.
- 2) Somente os granulócitos foram capazes de discriminar os pacientes diabéticos dos não diabéticos com base na produção de ROS.

31.029

DIABETES: AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE NO POR CÉLULAS MONONUCLEARES DE PAÇIENTES TIPO 2 EM USO OU NÃO DE INSULINA. <sup>1</sup>Cunha, E. P.; <sup>1</sup>Veloso, C. A.\*; <sup>1</sup>Medina, L. O.\*\*; <sup>2</sup>Calsolari, M.R.; <sup>2</sup>Chaves, M. M.; <sup>1</sup>Nogueira-Machado, J. A. <sup>1</sup>Imunologia Molecular e Celular Santa Casa de Misericórdia; <sup>2</sup>Bioquímica e Imunologia Santa Casa de Misericórdia

**Objetivo:** O óxido nítrico (NO) pode apresentar papel pró ou antiinflamatório, além de sua capacidade de vasodilatação. Neste trabalho, quantificou-se a produção de NO em células mononucleares de pacientes diabéticos tipo 2 em uso ou não de insulina (DM2I e DM2NI, respectivamente).

**Métodos e Resultados:**

Células mononucleares foram purificadas segundo Bicalho et al, J.Imunolog.Meth, 40:115, 1981. O NO foi dosado pelo método de nitrito segundo Greene et al, Annals Biochemis 126:131, 1982. Resumidamente, 1x10<sup>6</sup> / 100µL de M em RPMI foram incubados na presença ou ausência de 30 µL de PDB a 37° C -5% CO<sub>2</sub>, durante 18 horas. Os tubos foram centrifugados e o sobrenadante coletado para dosagem de NO. A leitura foi realizada a 540 nm e os resultados expressos em nM (nanomolar) de nitrito ± EP: os controles não diabéticos (ND) (n=24) na ausência ou presença de PDB foram, 97 ± 11 e 83,4 ± 10, respectivamente. Os pacientes diabéticos em uso de insulina (DM2I) (n=16), contudo apresentaram um aumento significativo de NO, tanto na ausência, 168 ± 28, quanto na presença de PDB, 193 ± 35. Estes dados quando comparados com o controle ND foram significativos a p<0,05 pelo teste "t" de student. Mononucleares de pacientes DM2NI (n=10) produziram 202 ± 24 e 232 ± 28 em ausência ou presença de PDB (p<0,05) em relação ao controle (ND).

Esse trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da SCMBH.

**Conclusões:**

Os resultados permitem concluir que:

- 1)Ocorre maior produção de NO em células mononucleares de diabéticos do que nas células dos não diabéticos;
- 2)O uso de insulina não interfere com a produção de NO em células mononucleares estimulados ou não com PDB.

31.030



ALTERAÇÕES IMUNOLÓGICAS DECORRENTES DO TRATAMENTO COM DEXAMETASONA EM RATOS. <sup>1</sup>Guereschi, M. G.; <sup>2</sup>Cancellero, K. M.\*\*; <sup>3</sup>Palanch, A. C.; <sup>1</sup>Silva, C. A.; <sup>1</sup>Faculdade de Ciências da Saúde, UNIMEP; <sup>2</sup>Fisioterapia CCBS-UFSCar; <sup>3</sup>Fisiologia UNIMEP

**Objetivo:** Avaliar parâmetros imunológicos em ratos tratados com dexametasona

**Métodos e Resultados:** Ratos machos Wistar foram divididos em 2 grupos (n=6): controle (C) e tratado com dexametasona (D, 1mg/kg peso - i.p.) durante cinco dias. Os parâmetros avaliados foram: linfócitos dos linfonodos mesentéricos, linfócitos do timo, leucometria, leucograma diferencial (porcentagem de linfócitos, segmentados, bastonetes, monócitos, eosinófilos e basófilos), peso do timo e baço. A análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA seguido do teste t-student (p<0,05). A dexametasona promoveu diminuição de 42,8% (p<0,05) nos linfócitos dos linfonodos mesentéricos se comparado ao grupo controle, diminuição de 97,9% (p<0,05) nos linfócitos do timo e aumento de 203,4% (p<0,05) na leucometria (FIG1). O leucograma diferencial apresentou padrões significativamente (p<0,05) diferenciados na proporção tanto dos linfócitos (média±epm; C=64,8±1,24%; D=10±2,65%) quanto dos neutrófilos segmentados (C=31,2±0,97; D=87,3±3,18%). Com relação ao peso dos órgãos, o glicocorticoide sintético também promoveu redução significativa (p<0,05), sendo de 49,4% no timo e de 34,8% no baço(FIG2).

**Conclusões:** Concluímos que a dexametasona altera o perfil imunológico de ratos devido a capacidade de comprometer o equilíbrio homeostático do sistema imunológico representado aqui pela redução no número de células e no peso dos órgãos ligados a resposta imune.

31.031

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA SUPERÓXIDO DISMUTASE EM PORTADORES DE ESQUISTOSSOMOSE HEPATESPLÊNICA SUBMETIDOS À ESPLENECTOMIA, LIGADURA DA VEIA GÁSTRICA ESQUERDA E AUTO-IMPLANTE ESPLÊNICO. <sup>1</sup>Castro, F. M. M.; <sup>2</sup>Leite, C. R. C.\*\*; <sup>3</sup>Castro, C. M. M. B.; <sup>2</sup>Brandt, C. T.; <sup>4</sup>Paes-Silva, R. P.; <sup>4</sup>Macedo, E. M. C.; <sup>5</sup>Severo, M. S.\*; <sup>1</sup>Medicina UFPE; <sup>2</sup>Cirurgia UFPE; <sup>3</sup>Medicina Tropical UFPE; <sup>4</sup>Nutrição UFPE; <sup>5</sup>Biomedicina UFPE

**Objetivo:**

Analisar a atividade da enzima SOD em monócitos de pacientes portadores de esquistossomose mansônica, na forma hepatoesplênica, submetidos à esplenectomia, ligadura da veia gástrica esquerda e auto-implante esplênico (AI).

**Métodos e Resultados:**

Padronizou-se e procedeu-se à coleta de sangue (15mL) de voluntários adequadamente selecionados para formar o grupo Controle (C - n=15) e de pacientes com esquistossomose na forma hepatoesplênica, submetidos à esplenectomia com ligadura da veia gástrica esquerda e auto-implante esplênico (AI - n=15). Essa coleta foi feita 1 ano após a cirurgia realizada no HC-UFPE segundo protocolo próprio, no período de 1991 a 2000. Esses pacientes são acompanhados desde então no ambulatório de Cirurgia Pediátrica do HC-UFPE. Os integrantes dos dois grupos são de ambos os sexos com idade entre 10 e 25 anos.

Em seguida, realizou-se o processamento das amostras a fim de isolar os monócitos do sangue periférico.

Depois, fez-se a cultura das células, procedendo-se à reação para mensuração da atividade da SOD - ensaio hipoxantina/XOD com redução do Citocromo C. Foram colhidas amostras da reação e feitas as leituras em espectrofotômetro. Com esses dados, foram realizados os cálculos da atividade da SOD para cada grupo e comparados, mediante o teste T de Student.

Observou-se então que não houve diferença entre os dois grupos (p>0,05): AI=30,2793195UI de SOD/mg de proteína dos monócitos (DP=8,268808) e C=44,1784222UI de SOD/mg de proteína dos monócitos (DP=14,57193).

**Conclusões:**

Em conclusão, pode-se dizer que, não se observando diferença na atividade da SOD entre os dois grupos, controle e AI, não haverá alterações na produção de superóxido pelos monócitos em decorrência disso.

31.032

CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DE CÉLULAS T CD4+ E CD8+ EM MODELO MURINO DE INFLAMAÇÃO INTESTINAL ANTÍGENO-ESPECÍFICO. Rocha, C. S; de Castro Junior A. B.\*\*;

Pedruzzi, M. M. B.; Campos, S. M. N.\*\*; Paschoal, P. O.\*\*; Antunes, D. M. F.\*\*; Teixeira, G. A. P. B. Imunobiologia UFF

**Objetivo:** Estudos anteriores do nosso grupo têm mostrado uma mudança no perfil de leucócitos intraepiteliais em animais submetidos a tolerância oral ou imunização sistêmica quando re-expostos à proteína específica na dieta. Animais imunizados quando comem a proteína específica desenvolvem um processo de inflamação intestinal crônica antígeno-específico. Assim nosso objetivo foi caracterizar o perfil de células TCD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> presentes em linfonodos mesentéricos e placas de Peyer em animais submetidos ou não ao protocolo de inflamação intestinal antígeno-específico.

**Métodos e Resultados:** Camundongos fêmeas, C57BL/6J foram subdivididos em grupos normal (GN) e imune (GI). O GI foi submetido ao protocolo de imunização sistêmica caracterizado por duas imunizações subcutâneas, contendo 100mg do extrato protéico de amendoim sendo a primária com 1mg Al(OH)<sub>3</sub>. O GN foi imunizado com solução salina + 1mg Al(OH)<sub>3</sub>. Após as imunizações cada grupo foi subdividido em dois e exposto, a dieta exclusiva de amendoim *in natura* (indução da inflamação intestinal crônica antígeno específico) ou de ração. Após 14 dias destas dietas retiramos os linfonodos mesentéricos e placas de Peyer, cujas células foram marcadas com anticorpo anti-CD4<sup>+</sup>PE e anti-CD8<sup>+</sup>FITC para análise fenotípica mensuradas por citometria de fluxo. Nos *linfonodos mesentéricos* o GI que recebeu amendoim apresentou uma menor relação CD4/CD8 (1,6+0,1) quando comparado com o GN que recebeu amendoim (1,9+0,2) (p<0,05). Essa queda da relação deveu-se a uma diminuição na população de células CD4 no GI (46,24+2,5) em relação ao GN (51,5 +-1,5). Nas *Placas de Peyer* houve a mesma queda na relação CD4/CD8 entre os GI (3+0,1) e GN (3,5+0,1) que receberam amendoim (p< 0,001). Entretanto nesse caso a queda deveu-se a um aumento da população de células CD8 no GI (5,58 +-0,46) em relação ao GN (4,95 +-0,83).

**Conclusões:** Nossos resultados sugerem que as alterações histológicas observadas em nosso modelo podem ser atribuídas a alteração da relação nas populações celulares CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> nos GI's inflamados em relação ao GN.

31.033

CHRONIC HEART FIBROSIS IS ATTENUATED IN B1 KNOCKOUT MICE INFECTED BY *TRYPANOSOMA CRUZI*.<sup>1</sup> Granato A. P.;<sup>2</sup> Andrade, D. S.\*\*;<sup>3</sup> Hernandez, C. C. Q.;<sup>4</sup> Campos de Carvalho, A. C.;<sup>1</sup> Seabra, S. H.;<sup>1</sup> Lima, A. P. C.;<sup>2</sup> Pesquero, J. B.;<sup>3</sup> Muller-Esterl, W.;<sup>1</sup> Scharfstein, J.<sup>1</sup>IBCCF-UFRJ; <sup>2</sup>Biofísica, UNIFESP; <sup>3</sup>Biochemistry University of Frankfurt Medical School .

**Objetivo:**

Inflammation and tissue injury is usually accompanied by upregulation of the B<sub>1</sub> kinin receptor (B<sub>1</sub>R), via the NF-κB activation pathway. Recent studies suggest that B<sub>1</sub>R stimulation by their natural agonists, [des-Arg]-kinins, drive leukocyte transmigration through the endothelium due to upregulated adhesion molecule expression. Of further interest, there is evidence that the B<sub>1</sub>R pathway contributes to angiogenesis and tissue fibrosis in various chronic pathologies. In a previous study, we showed that B<sub>2</sub> and B<sub>1</sub> kinin receptors are sequentially involved in the early phase of inflammatory responses induced by *T. cruzi* trypomastigotes (*FASEB J.* 17(1): 73-75., 2003). Here we asked if *T. cruzi*-driven stimulation of B<sub>1</sub>R may contribute to chronic carditis in mice. To verify **1.** if *T. cruzi* trypomastigotes induce B<sub>1</sub>R on human endothelial cells (HUVECs) by activating Toll-like receptors through the activity tGPI-mucins, a potent trypomastigote-specific pro-inflammatory molecule (*J. Immun.* 167: 416-423; 2001). **2.** if chronic heart fibrosis is differentially affected in infected WT vs C57Bl/6.J129 B<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup> mice.

**Métodos e Resultados:** **1.** Immunofluorescence assays have shown that tGPI-mucin induces B<sub>1</sub>R surface expression on HUVECs within 2 hours, while LPS does it after 6 hours. B<sub>1</sub>R expression was sustained at 4 and 6 hours. **2.** *T. cruzi* trypomastigotes infect HUVECs pre-activated with tGPI-mucin (15.8 ± 1.4 amastigotes/100 cells). Presence of the B<sub>1</sub>R antagonist reduced the infection to 8.7 ± 0.5 amastigotes/100 cells. **3.** Immunohistochemistry (*Picrosirius*) showed reduced collagen deposition in the myocardium of B<sub>1</sub>R Knockout infected mice (4 months pi).

**Conclusões:**

**1.** GPI-mucin purified of trypomastigotes of *T. cruzi* induces B<sub>1</sub>R surface expression on HUVECs. **2.** *T. cruzi* trypomastigotes infect HUVECs pre-activated by tGPI-mucin through B<sub>1</sub>R pathway. **3.** B<sub>1</sub>R Knockout mice infected with *T. cruzi* showed reduced fibrosis when compared with wild type infected

mice. The TLR2-B<sub>1</sub>R signaling axis may contribute to myocardial fibrosis. *T. cruzi* may upregulate B<sub>1</sub>R through the TLR2-inducing activity of tGPI-mucins. Chronic fibrosis may be aggravated due to sustained activation of B<sub>1</sub>R by [des-Arg]-kinins generated through the combined activities of cruzipain and host carboxypeptidase M/N.

31.034

EFEITO SINÉRGICO ENTRE ATP E UTP NA INDUÇÃO DE MORTE CELULAR EM MACRÓFAGOS PERITONEAIS. <sup>1</sup>Almeida, A. G.; <sup>2</sup>Bisaggio, R. C. <sup>\*\*</sup>; <sup>2</sup>Persechini, P. M.; <sup>1</sup>Alves, L. A.; <sup>1</sup>Imunologia FIOCRUZ; <sup>2</sup>Biofísica CCS-UFRJ

**Objetivo:**

O tratamento de macrófagos peritoneais de camundongo com ATP em doses na faixa de mM leva a indução de morte celular, que pode se apresentar com características de necrose e/ou apoptose. Apesar de diversos receptores P2 terem sido descritos nestas células, o efeito de indução de morte é associado principalmente à ativação do receptor P2X<sub>7</sub>. Este receptor tem como característica marcante a indução de morte celular por necrose e/ou apoptose. Neste trabalho nos propusemos a investigar a possível interação entre receptores P2X e P2Y na morte induzida por ATP extracelular.

**Métodos e Resultados:**

Utilizamos como modelo experimental células do lavado peritoneal de camundongos suíços elicitados com tioglicolato. As células tratadas com doses de 1mM de ATP por 20 min a 37°C (14,70% ± 0,28 SD, 1 experimento significativo de um total de 6) apresentaram uma pequena diferença no percentual de células apoptóticas (controle = 12,40% ± 1,27 SD, 1 de 6). Doses maiores de ATP aumentam esse percentual apoptótico. Ao tratarmos as células simultaneamente com 1mM de ATP mais 5mM de UTP ocorre um aumento no percentual de células apoptóticas (24,10% ± 1,41 SD, 1 de 6). O tratamento com Bz-ATP, considerado o agonista mais potente e específico do receptor P2X<sub>7</sub>, também induziu apoptose. Entretanto, a potência relativa deste agonista foi menor do que o esperado. Experimentos preliminares indicaram que o uso de UDP em associação com o ATP também potencializa a indução de apoptose (controle = 16,33% ± 0,92 SD ; 1mM ATP = 24,68% ± 1,75 SD ; 1mM ATP + 5mM UDP = 44,87% ± 3,28 SD - 1 experimento).

**Conclusões:**

O fato de o Bz-ATP ser menos potente na indução de apoptose que o esperado sugere a participação de outros receptores P2 no processo de indução de morte. Nossos resultados confirmam esta hipótese, uma vez que UTP e UDP, agonistas de receptores P2Y, foram capazes de potencializar o efeito do ATP.

31.035

EXPRESSÃO DE CD39 NA SUPERFÍCIE DE LINFÓCITOS DE PACIENTES COM INFECÇÃO PELO VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA (HIV). <sup>1</sup>Leal, D. B. R. <sup>\*\*</sup>; <sup>2</sup>Moreira, C. M.; <sup>1</sup>Streher, C. A. <sup>\*</sup>; <sup>1</sup>Leal, C. A. M. <sup>\*\*</sup>; <sup>1</sup>Bertoncheli, C. M. <sup>\*</sup>; <sup>1</sup>Morsch, V. M.; <sup>1</sup>Schetinger, M. R. C.; <sup>1</sup>Química, UFSM; <sup>2</sup>LAC-HU-UFSM

**Objetivo:**

O CD39 foi anteriormente identificado como sendo um marcador de ativação de linfócitos. O objetivo deste trabalho foi determinar a expressão de CD39 na superfície de linfócitos de pacientes infectados pelo HIV.

**Métodos e Resultados:**

As amostras utilizadas foram de sangue total periférico, coletadas com EDTA. Estas foram incubadas com anticorpos monoclonais contra CD39 e CD45 (antígeno comum de leucócitos) por 25 min e as hemácias lisadas com reagente FACS. As células foram então lavadas em tampão PBS (pH 7.4), contendo 0.02% de azida sódica e 0.2% de albumina bovina, ressuspensas em tampão PBS (pH 7.4) e analisadas em citômetro de fluxo FACScalibur, usando Cellquest software (Becton Dickinson®). A expressão foi verificada em um grupo controle formado por 50 indivíduos saudáveis com sorologia negativa para anti-HIV e um grupo de 50 pacientes com sorologia positiva. As amostras humanas foram utilizadas com consentimento do Comitê de Ética do Centro de Ciências da Saúde da UFSM (protocolo n° 13690). A diferença de expressão entre os dois grupos analisados foi estatisticamente significativa (p<0,0001). A análise citométrica indicou que a percentagem média de linfócitos CD39<sup>+</sup> nos pacientes HIV-positivos (8.04 ± 0.42, n=50, SEM) foi maior que nos controles (5.25 ± 0.17, n=50, SEM).

**Conclusões:**

Os pacientes infectados pelo HIV apresentaram um aumento de expressão de CD39 na superfície de seus linfócitos, fato que confirma o estado de ativação crônica destas células durante a resposta imune à infecção pelo HIV.

31.036

EXPRESSÃO DE TLR2 E TLR4 E REMODELAMENTO DA MATRIZ EXTRACELULAR EM PULMÕES DE RATOS ENDOTOXÊMICOS. Barbeiro, D. F.; Abatepaulo, F.; Ariga, S. K. K.<sup>\*\*</sup>; Soriano, F. G.; Barbeiro, H. V.<sup>\*\*</sup> Emergências Clínicas FMUSP

**Objetivo:** Avaliar a expressão gênica de TLR2, TLR4, iNOS; a expressão da proteína COX2 em pulmão e o remodelamento da matrix extracelular pela quantificação do colágeno total na evolução da endotoxemia induzida por LPS.

**Métodos e Resultados:** LPS (10mg/kg) foi injetado (i.p.) em ratos Wistar (255±1,7g) 8, 16 ou 24 horas antes do experimento, os animais controles receberam solução fisiológica. Para a análise de colágeno total (Sirius Red) e COX2, os animais anestesiados (hidrato de cloral 10% ip) foram entubados e submetidos a uma pressão positiva nas vias aéreas de 5cm de água. Após toracotomia foi realizada a retirada do lóbulo direito dos pulmões inflados, os quais foram fixados em formol 10% para posterior processamento em parafina. Nos estudos de expressão gênica por RT-PCR foram utilizadas amostras de pulmões maceradas em nitrogênio líquido. Foi utilizado teste de ANOVA para avaliação estatística. Quando comparamos a expressão gênica (normalizadas pela expressão de GAPDH) do grupo controle e do grupo LPS, em 8h observamos aumento dos níveis basais de TLR4 (de 0,42±0,14 para 0,95±0,23), de TLR2 (de 0,46±0,003 para 0,76±0,02) e de iNOS (de 0,51±0,11 para 0,99±0,13). No período de 16h somente TLR2 permaneceu elevado (0,69±0,06). No período de 24 horas não houve diferença da expressão gênica de TLR2, TLR4 e iNOS quando comparado com o grupo controle. Os níveis de COX2 se mantiveram elevados em 8h (0,45±0,01), 16h (0,45±0,02) e 24h (0,47±0,04) quando comparados com o grupo controle (0,25±0,02). O nível de colágeno mostrou-se elevado no período de 24h (0,15±0,02) quando comparado com o grupo controle (0,05±0,01).

**Conclusões:** O aumento da COX2, da expressão gênica de TLR4, TLR2 e iNOS indicam que a indução da endotoxemia por LPS mostrou-se eficaz na resposta inflamatória e o aumento prévio destes parâmetros podem estar envolvidos no remodelamento tardio da matrix extracelular.

31.037

IMPLANTES ECTÓPICOS DE TECIDO PULMONAR ALÉRGICO INDUZEM O ACÚMULO DE PROGENITORES NO PULMÃO DO RECIPIENTE ATRAVÉS DA LIBERAÇÃO DE IL-5. <sup>1</sup>Queto, T.; <sup>1</sup>Maximiano, E. S.; <sup>2</sup>Gaspar-Elsas, M. I. C.; <sup>1</sup>Sales, S. C. M.<sup>\*\*</sup>; <sup>4</sup>Joseph, D.; <sup>5</sup>Elsas, P. P. X.; <sup>4</sup>Vargaftig, B. B.; <sup>1</sup>Pediatria, FIOCRUZ/Instituto Fernandes Figueira; <sup>2</sup>Pediatria, FIOCRUZ; <sup>4</sup>Unité de Pharmacologie Cellulaire Institut Pasteur; <sup>5</sup>Imunologia, UFRJ

**Objetivo:**

Anteriormente analisamos células hematopoiéticas do pulmão de camundongos alérgicos que poderiam responder a estímulos alergênicos e farmacológicos como a medula óssea. Estas células diferem daqueles presentes da medula óssea quanto a susceptibilidade a apoptose induzida por dexametasona. Estes estudos foram possibilitados pelo desenvolvimento, em nosso laboratório, de métodos para isolar e quantificar progenitores e precursores eosinofílicos no tecido pulmonar de animais alérgicos. No presente trabalho avaliamos a contribuição de mediadores sistêmicos, liberados pelas células presentes no tecido pulmonar, na indução de acúmulo de progenitores no pulmão alérgico utilizando um protocolo de transplante pulmonar ectópico.

**Métodos e Resultados:**

Fragmentos de pulmão de camundongos BALB/c ou CBA sensibilizados e provocados com ovalbumina (OVA) ou de camundongos CBA/Ca transgênicos que super expressam Interleucina-5 (IL-5) foram implantados ectopicamente em recipientes normais ou sensibilizados (na ausência de provocação). O acúmulo de células hematopoiéticas no pulmão dos animais recipientes foi avaliado 24 horas após o implante. Evidenciamos que os implantes ectópicos liberam IL-5 (670 ± 156 pg/mL n=11) em relação ao grupo controle (72 ± 16,8 pg/mL n=5) e são capazes de induzir o acúmulo intrapulmonar de progenitores hematopoiéticos no pulmão dos animais recebedores (29,08 ± 4,2 colônias/pulmão n=5) mas somente sob as seguintes condições: a) se os doadores

são sensibilizados e provocados ou transgênico para IL-5; b) se os recipientes são sensibilizados. Evidenciamos também que o efeito do implante sobre o pulmão do recipiente foi abolido pelo tratamento prévio dos recipientes com anticorpos neutralizantes anti-IL-5 (TRFK-5), correspondendo ao bloqueio de 90% do efeito do implante sobre a acumulação (controle isotipo:  $182,04 \pm 63,0$  colônias/pulmão n=5, tratado com TRFK-5:  $17,92 \pm 6,5$  colônias/pulmão n=5).

**Conclusões:**

A provocação alérgica induz a liberação de mediadores sistêmicos, incluindo a IL-5, que medeiam o acúmulo de progenitores hematopoiéticos no pulmão sensibilizado. A IL-5 somente não é suficiente para induzir o acúmulo de progenitores no tecido pulmonar, mas a presença da IL-5 é necessária para a indução do acúmulo de progenitores.

31.038

INDUÇÃO DE PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS TRONCO, ALTERAÇÃO DE PADRÃO DA LEUCOGRAMA E SECREÇÃO DE LINFOCINAS EM CAMUNDONGOS TOLERANTES A ENDOTOXINA (LPS). <sup>1</sup>Goloubkova, T.; <sup>2</sup>Kerkis, I.; <sup>2</sup>Kerkis, A.; <sup>3</sup>Velasco, I. T.; <sup>3</sup>Soriano, F. G. <sup>1</sup>Emergências Clínicas FMUSP; <sup>2</sup>Genética Instituto Butantan; <sup>3</sup>Clínica Médica FMUSP

**Objetivo:**

O fenômeno da resistência a mortalidade induzida com LPS em animais submetidos à exposição prévia em doses pequenos de LPS é chamado de tolerância a endotoxina. O presente estudo analisa os prováveis fatores e mecanismos celulares envolvidos na sobrevivência de animais tolerantes a LPS, avaliando a proliferação e diferenciação celular no sangue periférico, em líquido peritoneal, baço e medula óssea. Analizamos também as alterações de produção de citocinas IL-1beta, IL-10, IL-4, TNF-alfa e IF intracelular e extracelular em baço, medula óssea e soro dos animais.

**Métodos e Resultados:**

Camundongos balb/c com 6-8 sem. de vida foram tratados com injeções subcutâneas de 1,0 mg/kg por dia durante 5 dias. Apesar destes animais terem sobrevivido à dose letal de LPS (20mg/kg por dose, i.p.) todos apresentaram sinais de toxemia e redução do peso corporal inicial em 9%, em comparação ao controle. O tratamento com LPS em doses subseqüentes aumentou em 40-70% a proporção de neutrófilos no sangue, baço, líquido peritoneal e aumentou em 25-30% a quantidade de células tronco, detectadas pela presença de SSEA-1 e OCT-4, no baço e medula óssea em relação aos animais intactos e submetidos à dose letal de LPS. Além disso, foram observados os "clusters" de células marcadas como resultado de divisões celulares subseqüentes. Verificou-se aumento significativo de IL-10 intralinfocitário, além de IL-4, INF, TNF alfa, no baço de animais tolerantes à LPS.

**Conclusões:** Estes resultados indicam que a indução de tolerância a endotoxina em camundongos previne a mortalidade relacionada a doses letais de LPS, estimulando a proliferação de células tronco nos órgãos hematopoiéticos, inclusive extramedular, aumentando proporção de neutrófilos e parcialmente alterando o padrão de secreção de citocinas e conseqüentemente resposta inflamatória de Th1 para Th2 em linfócitos

31.039

PROTECTIVE ROLE OF CCL6 DURING SEVERE SEPSIS THROUGH INTERFERON-G GENERATION. <sup>1</sup>Coelho, A. L.; <sup>2</sup>Benjamim, C. F.; <sup>1</sup>Hogaboam, C. M.; <sup>1</sup>Kunkel, S. L. <sup>1</sup>Pathology University of Michigan; <sup>2</sup>Imunologia UFRJ

**Objetivo:**

Our group has previously demonstrated that CCL6 chemokine enhances the survival of mice following cecal ligation and puncture (CLP) surgery. CCL6 is a unique chemokine that is induced by type 2 cytokines, such as IL-4 and IL-13, but CCL6 is not induced by LPS. The goal of this study was to investigate the mechanism involved in the protective role of CCL6 during the severe sepsis.

**Métodos e Resultados:**

C57/BL6 transgenically overexpressing CCL6 (Tg) in the lung and wild type (WT) were subjected to severe CLP or sham operation, and mouse survival was evaluated for up to 7 days post-CLP. Cells from the peritoneal cavity (PC) were obtained 3 days after sham or CLP surgery While the Tg-CLP group presented 90 % survival at day 7, only 20 % of the WT-CLP mice survived. An increase of the bacterial clearance was observed in Tg-CLP group when compared to WT-CLP group. The Tg mice

also exhibited significantly greater levels of CCL6 in the PC, serum and in the lung. In the Tg-CLP group, surprisingly high levels of interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) were detected in the PC and lung, whereas in the WT mice this cytokine was undetectable. Cells obtained from PC expressed IFN- $\gamma$ , but this protein was only observed in the Tg-CLP group. When mice received anti-IFN- $\gamma$  prior to CLP surgery, only 30 % of the Tg mice were alive on day 4 after CLP.

**Conclusões:**

These data suggest that the protective effect of CCL6 may be due to its ability to contain the consequences of an inappropriate type 2 cytokine response during anti-pathogen responses. CCL6 may achieve this through regulation of IFN- $\gamma$ .