

- Neuroimunologia

34.001

ROD PHOTORECEPTOR DIFFERENTIATION *IN VITRO* MEDIATED BY ANTI-INFLAMMATORY CYTOKINES. <sup>1</sup>Silva, A. G. L. S.; <sup>2</sup>Linden, R.; <sup>2</sup>Sholl-Franco, A. <sup>1</sup>Biofísica UFRJ; <sup>2</sup>Neurobiologia IBCCF-UFRJ

**Objetivo:**

Interleukin (IL)-4 and IL-10, anti-inflammatory cytokines with neuromodulatory effects, are implicated in retinal cell differentiation and survival. Since organotypic cultures provide powerful tools to study putative regulatory factors, we investigated the effects of IL-4 and IL-10 upon rod photoreceptor differentiation in the developing mouse retina, using an organ culture and compared it to the development of photoreceptors in mixed monolayer cultures.

**Métodos e Resultados:**

Cultures were prepared using postnatal (P0) C57BL/6 mouse retinas maintained for 1, 2, or 3 days in vitro (DIV), and for the in vivo studies, we used retinas from P0 to P18. The expression of rhodopsin was analyzed by western blotting and immunocytochemistry using a specific antibody (monoclonal antibody Rho4D2, kindly provided by Dr. R. Molday). In the retina in vivo, rod photoreceptors begin to appear at P0, and in both culture systems, Rho4D2-positive cells were identified after 1 DIV in a pattern similar to that observed in vivo. Our results demonstrated that both IL-4 and IL-10 caused a dose-dependent stimulatory effect, increasing the number of Rho4D2-positive cells, which were uniformly distributed in the monolayer culture. The maximal stimulation obtained was 150% and 165% after 3 DIV of IL-4 and IL-10 treatment, respectively. Pre-treatment with anti-IL-4, anti-IL-10 blocking antibodies, as well as the co-treatment with MAPK inhibitor (50  $\mu$ M PD-98059) blocked the stimulatory effect of IL-4 and IL-10, but the co-treatment with PI3K inhibitor (25  $\mu$ M LY-294002) had no effect. Only the increase of rodopsin-positive cells mediated by IL-10 was blocked by the inhibitor of vesicular secretion (brefeldin A), suggesting the involvement of released proteins. The use of bFGF (1-100 ng/mL) showed a dose-dependent effect in the number of rodopsin-positive cells (150 %), and the pre-treatment of the cultures with anti-bFGF antibody blocked the stimulatory effect of bFGF and IL-10.

**Conclusões:**

Overall, these results demonstrate that typical anti-inflammatory cytokines, such as IL-4 and IL-10, can induce rod photoreceptor differentiation. Moreover, the effect of both cytokines is dependent on MAPK pathways. Nevertheless, the data suggest that the effect of IL-10 is mediated by released bFGF.

34.002

EFEITO DO ESTRESSE PELO FRIO NA FAGOCITOSE IMUNOLÓGICA DESEMPENHADA POR LEUCÓCITOS POLIMORFONUCLEARES. <sup>1</sup>Marchi, L. F.; <sup>1</sup>Moreira, M. M.\*; <sup>1</sup>Costa, R. S.\*; <sup>2</sup>Baccan, G. C.; <sup>1</sup>Chedraoui-Silva, S.; <sup>1</sup>Mantovani, B. <sup>1</sup>Bioquímica e Imunologia FMRP-USP; <sup>2</sup>Biofunção, UFBA

**Objetivo:**

Muitos trabalhos mostram uma íntima relação entre o estresse e a ocorrência de variações na função imune tanto em modelos animais quanto em humanos, sendo que alguns sugerem uma imunossupressão induzida pelo estresse (Brain, Behav, and Immun. 17: 43, 2003), enquanto outros revelam um aumento da função imune (Brain, Behav, and Immun. 16: 785, 2002). Portanto, no presente estudo, observamos a influência do estresse agudo pelo frio na liberação de corticosterona e catecolaminas e na fagocitose de imunocomplexos de IgG por leucócitos polimorfonucleares.

**Métodos e Resultados:**

Camundongos BALB/c machos de 25g (n = 8, com "pool" de 4 cada) foram submetidos ao estresse agudo (4°C por 4 horas). As concentrações plasmáticas de corticosterona foram dosadas após o estresse por radioimunoensaio e as de adrenalina e noradrenalina por HPLC. Foi observado um aumento nos níveis de corticosterona (controle:  $0,028 \pm 0,002 \mu\text{g/mL}$ ; estressado:  $0,019 \pm 0,02 \mu\text{g/mL}$ ), adrenalina (controle:  $5,32 \pm 0,458 \text{ng/mL}$ ; estressado:  $10,72 \pm 0,998 \text{ng/mL}$ ) e noradrenalina (controle:  $6,48 \pm 0,576 \text{ng/mL}$ ; estressado:  $10,78 \pm 0,92 \text{ng/mL}$ ) com relação aos controles. A porcentagem de fagocitose de imunocomplexos (IgG ligada à hemácia de carneiro)

por leucócitos polimormonucleares (PMN) obtidos do sangue dos camundongos estressados foi menor que a verificada no grupo controle (controle:  $81,6 \pm 1,66$ ; estressado:  $66 \pm 2$ ). A mesma diminuição ocorreu com a fagocitose de imunocomplexos opsonizados com complemento (controle:  $81,3 \pm 1,85$ ; estressado:  $65,5 \pm 1,39$ ).

**Conclusões:**

O estresse agudo pelo frio provocou uma diminuição na fagocitose por PMNs via receptores de Fc e de complemento, e isto está de acordo com outros trabalhos, os quais utilizam macrófagos como fagócitos (Acta. Physiol. Scand. 168: 431, 2000).

34.003

EFEITOS RÁPIDOS DA CORTICOSTERONA E CORTICOSTERONA-BSA SOBRE A POLIMERIZAÇÃO DA ACTINA E FOSFORILAÇÃO DE TIROSINAS EM MACRÓFAGOS MURINOS. <sup>1</sup>Baccan, G. C.; <sup>2</sup>Marchi, L. F.\*\*; <sup>2</sup>Costa, R. S.\*\*; <sup>2</sup>Chedraoui-Silva, S.; <sup>2</sup>Mantovani, B.; <sup>1</sup>Biofunção UFBA; <sup>2</sup>Bioquímica e Imunologia, FMRP-USP

**Objetivo:** A corticosterona e catecolaminas são os principais mediadores das ações desencadeadas pela ativação do eixo HPA (hipotálamo-pituitária-adrenal) durante as respostas ao estresse. Nós demonstramos, previamente, que a corticosterona, numa concentração fisiológica observada após o estresse, é capaz de inibir in vitro a capacidade fagocítica de macrófagos murinos. Este efeito foi observado em um tratamento de apenas 10 min e não foi afetado por inibidores de transcrição e tradução indicando a possibilidade de um efeito não genômico deste glicocorticóide. A partir destes dados preliminares, nós testamos se a corticosterona ligada á albumina seria capaz de desencadear os mesmos efeitos que a corticosterona.

**Métodos e Resultados:** A corticosterona-BSA não afetou a fagocitose no tratamento de 10 min, mas alterou a capacidade fagocítica dos macrófagos no tratamento in vitro de 1 h. Entretanto, o efeito observado foi o contrário do esperado, pois a porcentagem de fagocitose nas células tratadas com corticosterona-BSA foi de  $65,5 \pm 0,8$  e das células não tratadas foi de  $44,3 \pm 0,73$ . Nós também testamos se a corticosterona, a corticosterona-BSA e as catecolaminas (adrenalina e noradrenalina) poderiam afetar etapas importantes do processo fagocítico, como a polimerização da actina e a fosforilação das tirosinas, num tratamento in vitro de apenas 10 min. Nós observamos que tanto a corticosterona quanto a corticosterona-BSA não alteraram a polimerização da actina, que foi marcada com faloidina-Alexa 488 e quantificada por medições da intensidade de fluorescência (controle:  $28 \pm 2,1$ ; corticosterona:  $26,8 \pm 2,5$ ; corticosterona-BSA:  $31,5 \pm 3$ ). Já o cultivo das células com catecolaminas levou a um aumento na polimerização da actina ( $18,1 \pm 2$ ). A fosforilação de tirosinas foi avaliada através de imunomarcações com PY-20. Foi encontrado que a corticosterona e a corticosterona-BSA diminuem a fosforilação das tirosinas, mas as catecolaminas não produzem qualquer efeito (intensidade de fluorescência: controle:  $24,3 \pm 1,5$ ; corticosterona:  $10,8 \pm 1,9$ ; corticosterona-BSA:  $18 \pm 1,8$ ; catecolaminas:  $23,7 \pm 1,4$ ).

**Conclusões:** Esses dados mostram que mediadores importantes das respostas ao estresse, como a corticosterona e catecolaminas afetam eventos relacionados com a fagocitose em apenas 10 min, indicando a possível relevância destas ações nos efeitos do estresse. Outra conclusão interessante é que a corticosterona pode agir provavelmente não genomicamente afetando a fosforilação de actinas. Esse efeito talvez seja devido a interações com receptores presentes na superfície dos macrófagos, visto que a corticosterona-BSA, que não é capaz de atravessar membranas também alterou esse parâmetro

34.004

ALTERAÇÕES NO NÚMERO DE HEMÓCITOS E NA EXPRESSÃO DE ÓXIDO NÍTRICO DO MOLUSCO *BIOMPHALARIA TENAGOPHILA* INDUZIDAS PELA QUEBRA DO CICLO-CIRCADIANO COMO CONSEQUÊNCIA DE ILUMINAÇÃO CONTÍNUA. <sup>1</sup>Waissel, I.; <sup>2</sup>Natal, C. L.; <sup>1</sup>Langone, F.; <sup>2</sup>Mineo, J. R. <sup>1</sup>Biologia IB-UNICAMP; <sup>2</sup>Biologia UFU

**Objetivo:** Determinar o possível efeito do estresse induzido por iluminação contínua nos parâmetros imunológicos de gastrópodes da espécie *Biomphalaria tenagophila*.

**Métodos e Resultados:**

Foram utilizados 143 animais adultos, divididos em grupos, controle e experimental, para a contagem dos hemócitos circulantes (n=93) e dosagem de óxido nítrico (n=50). Em todos experimentos os animais dos grupos controle e teste permaneceram em aquários idênticos, sob as

mesmas condições físico-químicas. Após um período de adaptação, 14h de claro e 10h de escuro, a iluminação do grupo teste era mantida durante 12h, 24h, 36h e 48h. Nos grupos da abordagem imunológica, ao final de cada período experimental, os animais eram submetidos à punção de hemolinfa da região cefalo-podal e os hemócitos eram contados em câmara de Neubauer, ou era feita a dosagem de óxido nítrico pelo método colorimétrico de Griess. O tratamento estatístico foi feito pelo teste t-Student. O número de hemócitos/ $\mu$ l foi maior nos animais de todos os grupos controle: 12h, 24h, 36h, 48h ( $174,6 \pm 26,4$ ) quando comparados com os de 12h ( $134,5 \pm 35,6$ ), 24h ( $113,6 \pm 36,3$ ), 36h ( $97,7 \pm 13,9$ ) e 48h ( $77 \pm 16,1$ ) de iluminação contínua,  $p < 0,01$ . A expressão de óxido nítrico,  $10^{-6}$  M, foi maior nos do grupo controle ( $235,9 \pm 8,0$ ) quando comparados com os grupos de 12h ( $155,5 \pm 11,8$ ), 24h ( $144,7 \pm 10,3$ ), 36h ( $133,8 \pm 5,5$ ) e 48h ( $72,6 \pm 16,7$ ) de iluminação contínua, sendo  $p < 0,01$ .

#### **Conclusões:**

A iluminação contínua pode representar, para o molusco estudado, um fator de estresse que leva à interferência na atividade citotóxica (produção de óxido nítrico) e de expressão de células do sistema imunológico (hemócitos circulantes) do animal.

34.005

IMMUNOLocalIZATION OF THE INTERLEUKIN-4 RECEPTOR ALPHA CHAIN IN OCULAR TISSUES DURING POSTNATAL STAGES. Silva, A. G. L. S.<sup>\*\*</sup>; Linden, R.; Sholl-Franco, A. Neurobiologia IBCCF-UFRJ

#### **Objetivo:**

The interleukin-4 receptor alpha chain (IL-4R $\alpha$ ) is only one of several cytokine-binding polypeptides that constitute the IL-4 receptor complex, the composition of which varies in a cell-type specific fashion. The IL-4R $\alpha$  chain binds IL-4 with high affinity, leading to dimerization with another co-receptor protein to form either a type I or type II receptors. In nonhematopoietic cells, the type II receptor is formed by interaction of IL-4R $\alpha$  with IL-13R $\alpha$ , instead of IL-2R $\gamma_c$  that forms the type I receptor. The aim of this study was to investigate whether the IL-4R $\alpha$  chain is expressed in the development of rodent ocular tissue, in particular in the neural retina.

**Métodos e Resultados:** The expression of IL-4R $\alpha$  was analyzed by immunofluorescence microscopy and nuclear co-staining with DAPI or Sytox Green. Lister Hooded rats were used at various postnatal ages (P0, P2, P5, P14, and P21). The animals were anesthetized, killed by decapitation, and the eyeball dissected and fixed in 4% paraformaldehyde. The expression of IL-4R $\alpha$  was analyzed by immunohistochemistry using a specific polyclonal antibody (Santa Cruz, USA). The results showed a predominant presence of IL-4R $\alpha$  in the external region of the neuroblastic layer (NL) and in the ganglion cell layer (GCL), during early postnatal development, as well as staining of nonneuronal structures such as the lens, ciliary process, and the outer epithelium of the cornea. Along tissue development, IL-4R $\alpha$  staining concentrated in the region of the outer segments of photoreceptors, adjacent to the pigment epithelium, in the outer plexiform layer (OPL), and in the GCL. This pattern is constant in both central and peripheral regions of the retina, from P7 to P21 retinas. As development proceeds, staining in the OPL, as well as in the region of the photoreceptor outer segments increased significantly. In P21 ocular tissues, the presence of IL-4R $\alpha$  was preferentially found in the neural retina.

#### **Conclusões:**

Our data demonstrate for the first time the expression of IL-4R $\alpha$  in a well defined pattern during the development of ocular tissues, restricted early to the outer retina and GCL, and later to the outer segments of photoreceptors and OPL, suggesting a functional role for this cytokine during development of the neural retina. Our data also indicate a possible role of this cytokine in other ocular tissues, such as lens and cornea.

34.006

BDNF, BUT NOT NGF, INCREASES ROD PHOTORECEPTOR DIFFERENTIATION IN CULTURE.

<sup>1</sup>Silva, A. G. L. S.; <sup>2</sup>Linden, R.; <sup>2</sup>Sholl-Franco, A.; <sup>1</sup>Biofísica UFRJ; <sup>2</sup>Neurobiologia IBCCF-UFRJ

**Objetivo:** Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and nerve growth factor (NGF) are members of the neurotrophin family, that presents a broad range of action upon the development and maintenance of neuronal cells. Since organotypic cultures provide powerful tools to study putative

regulatory factors, we investigated the effects of BDNF and NGF upon rod photoreceptor differentiation in the developing mouse retina, using an organ culture, and compared it to the development of photoreceptors in mixed monolayer cultures.

**Métodos e Resultados:** Cultures were prepared using postnatal (P0) C57BL/6 mouse retinas maintained for 1, 2, or 3 days in vitro (DIV), expression of rhodopsin was analyzed by immunocytochemistry using a specific antibody (monoclonal antibody Rho4D2, kindly provided by Dr. R. Molday). Our results demonstrated that BDNF, but not NGF, promotes a dose-dependent stimulatory effect, increasing the number of Rho4D2-positive cells, which were uniformly distributed in the monolayer culture. The maximal stimulation obtained was 160% after 3 DIV of BDNF. The treatment of the cultures with K252a, a specific blocker of Trk receptors, as well as co-treatment with tyrosine kinase, PKC, or MAP Kinase inhibitors blocked the stimulatory effect of BDNF. On the other hand, the co-treatment with cell proliferation, and PI3K inhibitors did not block the effect of this neurotrophin. The use of an inhibitor of vesicular secretion (brefeldin A) blocked the effect of BDNF, suggesting the involvement of secreted proteins, and the use of a specific anti-bFGF protein blocking antibody produced complete inhibition of the BDNF effect.

**Conclusões:** Overall, these results demonstrate that BDNF, but not NGF, can increase rod photoreceptor differentiation. Moreover, this effect is specific and mediated by tyrosine kinase, PKC, MAP Kinase pathways. The data also indicate that the effect of BDNF is mediated by Trk receptors and depends on release of bFGF.

34.007

BEHAVIOR AND IMMUNOLOGICAL ASPECTS OF MELANOMA B16F10 DEVELOPMENT IN C57BL-6J MICE. Moura, V. D.; Sá Rocha, L. C.; Palermo-Neto, J. Patologia e Toxicologia FMVZ-USP

**Objetivo:**

Stressful life events and the ability to cope with stress may play a role in the progression of cancer, the complex relationship between stressors and tumor growth is difficult to investigate in humans.

**Métodos e Resultados:** Our studies have utilized an experimental metastases model of murine melanoma B16F10 to investigate the effects of social housing condition and dominance hierarchies on endocrine and immunological factors. We have examined: 1) the behavior of mice inoculated with different concentrations of tumoral cells ( $1 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^4$  and  $1 \times 10^5$  cells/animal iv) or PBS iv, housing five animals per cage, in open field apparatus, once a week during four consecutive weeks. and the weight of spleen, thymus, testis, adrenals and the number of tumoral nodes in the lungs was determined. 2) lymphocyte subsets determined by flow cytometry and number of tumoral nodes evaluation in dominants (D) and subdominants (S) mice after  $1 \times 10^5$  tumor cells inoculation. Results: 1) No difference was observed in behavioral analysis. A significant decrease was observed in the thymus weight of animals that received  $1 \times 10^5$  compared with control ( $0,14 \pm 0,02$ ;  $0,19 \pm 0,02$  respectively). The number of lung nodes was concentration dependent of tumoral cell. 2) An increase in lung nodes was evident in subdominant mice compared to the dominant mice ( $150,9 \pm 67,9$  and  $109,6 \pm 50,4$  respectively) but the ratio of CD4+ and CD8+ T cells have no differences (S-CD4+= $55,2 \pm 22,5\%$ ; CD8+=  $12,6 \pm 7,3\%$  – D-CD4+= $59,8 \pm 15,4\%$ ; CD8+= $11,3 \pm 6,6\%$ ).

**Conclusões:**

The melanoma development didn't promote changes in the behavior parameters analyzed in this work, however in dominance hierarchies study, differences in melanoma development was observed between dominants and subdominants mice when neuroendocrine mechanisms could be involved in this differences.

34.008

MEDINDO AS EMOÇÕES NA SALIVA. <sup>1</sup>Mendonça de Souza, A. C. F.; <sup>2</sup>Souza, G. G. L.\*\*; <sup>2</sup>Vieira, A.\*; <sup>2</sup>Barros, E.\*; <sup>2</sup>Fischer, N.L.\*; <sup>3</sup>Rumjanek, V. M. B. D.; <sup>2</sup>Volchan, E. <sup>1</sup>Neurobiologia IBCCF-UFRJ; <sup>2</sup>IBCCF-UFRJ; <sup>3</sup>Bioquímica Médica UFRJ

**Objetivo:** Estudos anteriores mostraram que estímulos com carga afetiva modulam o humor e provocam reações fisiológicas mensuráveis. Neste trabalho, utilizamos fotos com conteúdo afetivo para modular o estado emocional. Em seguida procedeu-se à indução de estresse através da

tarefa de apresentação oral. O volume salivar e a concentração de imunoglobulina A (IgAs) foram mensurados durante o experimento.

**Métodos e Resultados:** Estudantes (n=44, idade  $21,8 \pm 2,83$  anos), não fumantes e sem histórico psicopatológico, foram instruídos a se abster de cafeína ou álcool e de exercícios físicos no dia do teste. Após 30 min de habituação ao ambiente do laboratório, um grupo (A) visualizava uma seqüência de fotos agradáveis e outro (B), desagradáveis. Após lerem um texto sobre um tema neutro, os voluntários tinham 3 min para preparar e até 9 min para discorrer sobre o tema, enquanto eram filmados por uma video-camera. Foram coletadas 7 amostras de saliva: início, pós-adaptação, apresentação de fotos, preparação do discurso, pós-discurso e recuperação (x2). A observação de fotos agradáveis e desagradáveis reduziu significativamente os estados de afeto negativo e positivo, respectivamente. Para ambos grupos, o volume salivar foi significativamente menor durante a apresentação das fotos (A:  $670,2 \pm 553,7$   $\mu$ L; B:  $703,7 \pm 487$   $\mu$ L) e no período de preparo do discurso (A:  $625,4 \pm 436,4$   $\mu$ L; B:  $747,4 \pm 389,9$   $\mu$ L) do que no basal (A:  $1014 \pm 407,2$   $\mu$ L; B:  $982,2 \pm 335,3$   $\mu$ L); e a concentração de IgAs foi significativamente maior após o discurso (A:  $9,3 \pm 4,08$  mg/dL; B:  $7,6 \pm 2,39$  mg/dL) do que no basal (A:  $5,7 \pm 1,73$  mg/dL; B:  $5,4 \pm 1,68$  mg/dL), recuperando-se após 10 min.

**Conclusões:**

Em suma, o estresse de apresentação oral estimula um aumento transiente de IgAs e a observação de fotos com conteúdo afetivo reduz o volume salivar. Embora cada grupo tenha recebido um estimulação afetiva distinta, ambos demonstraram uma modulação semelhante nos parâmetros analisados. Os efeitos das fotos sobre o volume parecem estar relacionados com a ativação emocional provocada, independente do conteúdo hedônico. A indução prévia de estados afetivos distintos não influenciou a resposta ao estresse de secreção de IgAs.

34.009

EFEITOS DO EXERCÍCIO AERÓBICO SOBRE ALGUMAS RESPOSTAS IMUNES CELULARES E HUMORAIS EM RATOS WISTAR. <sup>1</sup>Schmitt, C. B.; <sup>1</sup>Taranto, A. M.; <sup>2</sup>Ignácio, Z. M.; <sup>3</sup>Hackl, L. P. N.; <sup>4</sup>Perazzolo, L. M. <sup>1</sup>Fisioterapia UNIVALI; <sup>2</sup>Psicologia, UNIVALI; <sup>3</sup>Farmacologia do SNC UFSC; <sup>4</sup>Bioquímica, UNIVALI

**Objetivo:** A atividade física regular e moderada pode modular positivamente respostas imunológicas desencadeadas pelo organismo, como a proliferação de linfócitos/granulócitos, células NK, citocinas e imunoglobulinas (J. Sports Med. Phys. Fitness, 44: 207, 2004; J. Am. Coll. Nutr. 23: 331, 2004). O nível de  $\beta$ -endorfina no fluido cérebro-espinhal de ratos é aumentado após o exercício físico, agindo sobre receptores opióides e melhorando a imunidade (Int. J. Sports Med., 21:S20, 2000). O presente trabalho avaliou o efeito do treinamento aeróbico em ratos sobre alguns parâmetros imune-celulares (contagem de leucócitos totais circulantes: LTC) e humorais (respostas imunes primária: RIP e secundária: RIS).

**Métodos e Resultados:** Ratos machos ( $300 \pm 32$ g) foram repartidos em dois grupos: treinados (T; n=12) que realizaram sessões diárias de corrida em esteira (20min, V=16m/min) por 32 dias, e sedentários (S; n=12) que permaneceram na esteira desligada. Aos 17º e 24º dias de treinamento, os animais foram imunizados com hemácias de carneiro (HC;  $0,5 \times 10^9$  cél/mL), o sangue coletado e os LTC contados (Câmara de Neubauer). Os títulos de anti-HC (média geométrica e intervalo de confiança L1/ L2), avaliados por hemaglutinação, não foram estatisticamente diferentes entre os grupos, apesar do ligeiro aumento observado nos T (RIP=88, L1=63/L2=123; RIS=256, L1=184/L2=356) comparado aos S (RIP=68, L1=23/L2=206; RIS=181, L1=88/L2=374). Nos animais T, o LTC foi estatisticamente superior ( $1,1 \times 10^7 \pm 5,4 \times 10^5$  cél/mL) aos LTC dos ratos S ( $9,2 \times 10^6 \pm 5,4 \times 10^5$  cél/mL) (p=0,027).

**Conclusões:** Os resultados sugerem que o exercício aeróbico em ratos influencia a resposta imune celular pelo aumento de LTC. Novos estudos devem contudo ser realizados aumentando a velocidade e o tempo do treinamento, bem como o nº de HC inoculadas/animal para comprovar nossos resultados em relação à resposta imune humoral.

34.010

NITRIC OXIDE INVOLVEMENT ON LEUKOCYTE REDISTRIBUTION IN HYPOTHYROID ENDOTOXEMIC RATS. <sup>1</sup>Rodriguez, T. T.; <sup>2</sup>Amoedo, M.; <sup>2</sup>Moreira, P.; <sup>2</sup>Ramalho, M. J. P.; <sup>1</sup>Biotecnologia UFBA; <sup>2</sup>Bioregulação ICS-UFBA

**Objetivo:**

We investigate the effects of previous injection of L-NAME, a NO synthase inhibitor, and L-Arginine (L-Arg) on blood leukocyte subsets redistribution (lymphocytes, neutrophils, Total T, T-helper, cytotoxic and NK cells), through lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammatory response in thyroidectomized (TX) rats.

**Métodos e Resultados:**

Male Wistar rats (200-280g) TX or sham operated (N), 8 per group, were intraperitoneally (i.p.) injected with L-NAME (10mg/Kg) or L-Arg (200mg/Kg) or the same volume of saline (SL), 30 min before LPS i.p., 250 $\mu$ g/100g b.wt. Blood samples were collected before (-30 min) and after treatment with L-NAME, L-Arg or SL (0 min) and after 240 min of endotoxemia. Lymphocyte subsets were measured using two-color flow cytometry.

After 240min of endotoxemia, leukocyte numbers in N-SL and TX-SL groups were characterized by a decrease in lymphocyte,  $p < 0,05$  (N-SL; -30min:  $7205 \pm 1429$ ; 240min:  $1077 \pm 131 \times 1000/\mu$ l; TX-SL; -30min:  $8036 \pm 1111$ ; 240min:  $2259 \pm 222 \times 1000/\mu$ l), and an increase in neutrophil numbers (N-SL; -30min:  $630 \pm 147$ ; 240min:  $8421 \pm 1359 \times 1000/\mu$ l; TX-SL; -30min:  $580 \pm 186$ ; 240min:  $5690 \pm 554 \times 1000/\mu$ l). L-NAME and L-Arg decreased lymphocyte numbers through endotoxemia in N and TX rats, respectively. Neutrophil numbers showed an increase in TX-L-NAME and TX-L-Arg groups after 240min of LPS. Total T cells, T-helper and cytotoxic cells numbers showed a significant endotoxemic-induced decrease in N-SL and TX-SL groups. L-NAME and L-Arg decreased total T cells, T-helper and cytotoxic cells numbers in N and TX rats, respectively, through endotoxemia. NK cells numbers were increased significantly in TX-L-NAME while it was decreased in TX-L-Arg group, after 240min of LPS.

**Conclusões:**

Our results suggest that NO modulates leukocyte trafficking which results in a redistribution of leukocytes between the blood and other immune compartments, in a different manner, in N and TX rats.

**UFBA, Pronex**

34.011

EFEITOS DO DIAZEPAM NA ATIVIDADE DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS C57BL-6J. <sup>1</sup> Moura, V. D.; <sup>2</sup> Sá-Rocha, L. C.; <sup>3</sup> Palermo-Neto, J.; <sup>1</sup> Patologia e Toxicologia - FMVZ, USP; <sup>2,3</sup> Patologia, USP

**Objetivo:** Estudar os efeitos da administração de diazepam nas doses de 0,6; 1,0 e 2,0mg/kg na fagocitose e produção de espécies reativas de oxigênio de macrófagos peritoneais estimulados pelo bacilo Onco-BCG. Estudar os efeitos *in vitro* do diazepam nas concentrações de 7 ng (E1); 70ng (E2) e 7 $\mu$ g (E3) na fagocitose de macrófagos peritoneais estimulados pelo bacilo Onco-BCG.

**Métodos e Resultados:**

Camundongos de 2 meses de idade, pesando em média 30g foram utilizados para o estudo. A ativação dos macrófagos peritoneais foi feita pela administração de 4,0mg de bacilo/animal no dia 0 e 2,0mg de bacilo/animal no dia 4, sendo os experimentos realizados no dia 7. Os animais dos grupos experimentais e controle receberam o tratamento (via oral) por duas vezes, intervaladas de 24 horas. A coleta do lavado peritoneal foi feita 2 horas após o último tratamento. Para tanto, 5ml de PBS foram injetados na cavidade peritoneal dos animais e após massagem o líquido foi recolhido. As células do lavado foram contadas, ajustadas para o valor de  $4 \times 10^5$  células/tubo e preparadas para a incubação DCFH-DA, para avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio e com bactéria *Staphylococcus aureus* marcada com iodeto de propídio, para posterior avaliação pelo citometro de fluxo.

Os resultados mostram que houve uma tendência de diminuição na produção de radicais reativos de oxigênio, medido através da intensidade média de fluorescência emitida pelas células, apenas entre o grupo tratado 2,0mg/kg ( $791,7 \pm 196,4$ ) e controle ( $596,4 \pm 193,4$ ). Na fagocitose observou-se que o diazepam 2,0mg/kg diminuiu a fagocitose das células (C= $58,2 \pm 4,5$ , E= $50,4 \pm 7,5\%$   $p < 0,05$ ). O tratamento *in vitro* com diazepam nas doses apresentadas, mostrou uma tendência de diminuição na atividade fagocítica das células (C= $63,3 \pm 16,0$ ; E1= $60,8 \pm 21$ ; E2= $59,0 \pm 12,1$ ; E3= $57,5 \pm 10,0\%$ ).

**Conclusões:** O diazepam diminuiu a fagocitose de macrófagos peritoneais.

34.012

RESPOSTA INFLAMATÓRIA E LESÃO AXONAL EM UM MODELO DE LESÃO CEREBRAL POR EXCITOTOXICIDADE. <sup>1</sup>Lima, R. R.; <sup>2</sup>Oliveira, J. L.; <sup>2</sup>Silva, J. G.; <sup>2</sup>Freire, M. A. M.; <sup>2</sup>Diniz, C. W. P.; <sup>2</sup>Leal, W. G. <sup>1</sup>Histologia e Embriologia UFPA; <sup>2</sup>Morfologia, UFPA

**Objetivo:** O presente estudo investigou a evolução da resposta inflamatória celular e os padrões de lesão axonal em um modelo de lesão aguda do gânglio basal, com ênfase na degeneração secundária da cápsula interna

**Métodos e Resultados:**

Lesão excitotóxica primária foi induzida através da injeção de 80 nmol de N-Metil-D-Aspartato (NMDA) no estriado de ratos Wistar adultos. Os animais foram anestesiados com overdose de uma mistura de cloridrato de cetamina e cloridrato de xilazina e perfundidos 1, 3 e 7 dias após a injeção de NMDA. Para análise histopatológica da área de lesão, secções de 10 µm e 50 µm de espessura de animais injetados com NMDA e animais controle, para todos os tempos de sobrevida, foram coradas pela hematoxilina & eosina e histoquímica para NADPH-diaforase, respectivamente. Secções de 10 µm foram submetidas à imunocitoquímica para neutrófilos (anti-MBS-1), macrófagos ativados (anti-ED-1) e axônios lesados (anti-β-APP). A injeção de NMDA induziu necrose, perda neuronal e resposta inflamatória aguda conforme relatado em outros modelos de lesão excitotóxica do gânglio basal. O recrutamento de neutrófilos foi máximo no primeiro dia após lesão, diminuindo para os outros tempos de sobrevida. Marcação conspícua destas células inflamatórias foi observada na cápsula interna de ratos injetados com NMDA, mas não nos animais controle. O recrutamento de macrófagos ocorreu em tempos de sobrevida mais tardios, como previamente descrito. Axônios lesados foram mais evidentes 3 dias após a lesão primária.

**Conclusões:** Estes resultados demonstram a correlação espacial e temporal entre a presença de axônios lesados da cápsula interna e as células da resposta inflamatória aguda. Futuros estudos devem investigar se existe correlação causal entre o recrutamento de células inflamatórias e o surgimento da lesão axonal

34.013

EFEITO DA LESÃO MEDULAR EM RATOS SOBRE A RESPOSTA IMUNITÁRIA DE MACRÓFAGOS E LINFÓCITOS. <sup>1</sup>Tanhoffer, R. A.; <sup>1</sup>Nunes, E. A.; <sup>1</sup>Brito, G. A. P.; <sup>1</sup>Yamazaki, R. K.; <sup>1</sup>Pchevozniki, A. I.; <sup>1</sup>Pchevozniki, A. M.; <sup>1</sup>Nogata, C.; <sup>1</sup>Aikawa, J.; <sup>1</sup>Lissa, M. D.; <sup>1</sup>Bonatto, S. J. R.; <sup>1</sup>Mund, R. C.; <sup>1</sup>Pizato, N.; <sup>1</sup>Oliveira, H. H. P.; <sup>1</sup>Batista, V. G.; <sup>2</sup>Curi, R.; <sup>1</sup>Fernandes, L. C. <sup>1</sup>Fisiologia UFPR; <sup>2</sup>Departamento de Fisiologia, USP

**Objetivo:** A lesão medular (LM) é uma patologia altamente incapacitante devido às inúmeras seqüelas. Em adição, o indivíduo com LM convive com altas taxas de infecções, sendo estas as principais causas de morbidade e mortalidade nessa população. O objetivo deste trabalho foi determinar os efeitos da lesão medular sobre parâmetros imunitários em ratos submetidos à lesão medular na fase aguda (48 horas) e semi-aguda (5 dias pós trauma).

**Métodos e Resultados:**

Ratos Wistar machos adultos foram divididos em grupo controle (C) n=5, falso-operado (S) n=5, e lesado medular (LM) n=7. Estes grupos foram ortotansados nos tempos 48 h (agudo) [S02 e LM02] e 5 dias pós-cirurgia (secundário) [S05 e LM05]. A LM nos ratos foi por laminectomia entre a 3ª a 4ª vértebras seguida de transecção da medula espinhal. Os animais do grupo falso-operado não tiveram a medula seccionada. Após a cirurgia seguiu-se as normas do *Multicenter Animal Spinal Cord Injury Study (MASCIS)*. A capacidade fagocítica de macrófagos peritoneais (zimosan x 10<sup>7</sup> mg<sup>-1</sup> de proteína), o volume lisossomal dos macrófagos peritoneais (OD mg de proteína), e expressão de linfócitos CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> (% em 10<sup>4</sup> eventos) foram determinados. A capacidade fagocítica na fase aguda foi reduzida abruptamente (p<0,001) tanto para S02 (0,074±0,010) quanto para LM02 (0,105±0,009) comparados ao C (0,298±0,025). Nos grupos da fase semi-aguda houve efeito rebote extrapolando seus valores para S05 (1,039±0,018) e LM05 (0,954±0,034) (p<0,001). O volume lisossomal mostrou resposta semelhante à capacidade fagocítica, com os grupos da fase aguda tendo intensa redução (p<0,001), onde no S02 foi de (0,009±0,003) e LM02 (0,013±0,002) comparados ao do C (0,146±0,006). Nos grupos da fase secundária também houve efeito rebote onde em S05 foi de (0,249±0,009) e LM05 de (0,202±0,006). Não houve diferença estatística para a expressão de linfócitos CD4<sup>+</sup>; Contudo a expressão de linfócitos CD8<sup>+</sup> mostrou-se reduzida (p<0,001) para ambos os grupos com LM, LM02 (26,65±1,10) e LM05 (25,95±0,84) quando

comparados ao C (34,87±0,91). Os grupos falso-operados não foram diferentes ao C nem aos LM; S02 (34,40±0,26) e S05 (36,34±0,41).

**Conclusões:** Os dados sugerem disfunção no sistema imunitário devido à LM.

34.014

EFEITOS DO ISOLAMENTO SOCIAL NO COMPORTAMENTO DE CAMUNDONGOS E NA ATIVIDADE DE NEUTRÓFILOS CIRCULANTES. <sup>1</sup>Correia, C. S. C.; <sup>2</sup>Sakai, M. <sup>\*\*</sup>; <sup>2</sup>Fonseca, E. S. M. <sup>\*\*</sup>; <sup>2</sup>Palermo-Neto, J.; <sup>1</sup>Patologia e Toxicologia FMVZ-USP / Farmácia UniFMU; <sup>2</sup>Patologia e Toxicologia FMVZ-USP

**Objetivo:**

O estresse por isolamento social é uma variável importante nos estudos da neuroimunomodulação. O presente trabalho pretende avaliar os efeitos do isolamento social sobre o comportamento e a atividade de neutrófilos circulantes de camundongos.

**Métodos e Resultados:**

24 camundongos Balb/C machos foram divididos em 2 grupos: Controle (C) e Experimental (E). Os animais do grupo C permaneceram agrupados e os do grupo E foram mantidos isolados por 21 d. No 20º d do experimento, avaliou-se o comportamento no campo aberto (CA) e no plus maze (PM), com auxílio do software Ethovision. No 21º d coletou-se sangue para avaliação por citometria de fluxo do burst oxidativo (BO) basal, induzido por PMA e por S. aureus (SAPI) e da fagocitose de SAPI por neutrófilos.

Animais avaliados no PM apresentaram diferenças ( $p < 0.05$ ) nos seguintes dados: % de tempo nos braços abertos (C=17,18±9,39; E=9,77±4,52) e nos braços fechados (C=84,5±7,8; E=91,6±5,2) e % de entradas nos braços fechados (C=84,5±7,8; E=91,6±5,2). Não houve diferença ( $p > 0.05$ ) na locomoção total (C=1312,6±151,3; E=1228,1±163,1) e na % de entradas nos braços abertos (C=35,1±8,5; E=31,7±12,3). No CA encontrou-se diferença na locomoção na zona interna (C=421,6±100,3; E=553,9±120,5), mas não para locomoção total na arena (C=1852,2±200,7; E=1712,9±554,5), na zona externa (C=713,45±200,64; E=677,9±239,9) e na zona média (C=654,7±106,8; E=687,3±151,2). O BO induzido por PMA e SAPI foi maior ( $p < 0.05$ ) nos animais isolados (C=15,6±7,2; E=28,3±13,8) e (C=28,2±40,3; E=40,5±14,1). Não houve no BO basal (C=9,2±7,6; E=13,4±9,8), % (C=55,7±40,1; E=48,2±31,1) e intensidade (C=2,9±1,4; E=2,2±0,9) de fagocitose.

**Conclusões:**

O isolamento social aumentou os níveis de ansiedade, e aumentou o BO de neutrófilos após estímulos com PMA e SAPI. Sugere-se possível interferência com mecanismos neuro-endócrinos importantes para a integridade das inter-relações entre os SNC e SI.

34.015

EXPRESSÃO DO GENE TNF EM MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE RATAS HIPERPROLACTINÊMICAS. <sup>1</sup>Carvalho-Freitas, M. I. R.; <sup>2</sup>Teodorov, E. <sup>\*\*</sup>; <sup>3</sup>Nasello, A. G.; <sup>4</sup>Palermo-Neto, J.; <sup>4</sup>Felício, L. F. <sup>1</sup>Neurociências e Comportamento USP; <sup>2</sup>Farmacologia ICB I-USP; <sup>3</sup>Ciências Fisiológicas FCMSCSP; <sup>4</sup>Patologia FMVZ-USP

**Objetivo:** Avaliar o nível de expressão do gene Tnf, correspondente à citocina TNF- $\alpha$ , em macrófagos presentes em líquido peritoneal de ratas hiperprolactinêmicas.

**Métodos e Resultados:** Foram utilizadas 20 ratas Wistar virgens, com idade entre 90 e 120 dias, pesando entre 200 e 250 g, divididas em dois grupos iguais: Controle (C) e Tratado (T). Nos animais do grupo T, a hiperprolactinemia foi induzida por meio de 2 administrações de domperidona (2,5 mg/kg, sc), 13 e 1 hora antes da colheita do líquido peritoneal, enquanto que os animais do grupo C foram tratados com salina (10 ml/kg, sc). Posteriormente foram realizadas a extração do RNA total (protocolo do reagente TRIzol®) e a transcrição reversa, de acordo com as especificações do fabricante. Os seguintes primers foram desenhados para os procedimentos de PCR: Tnf sense- ATG TGG AAC TGG CAG AGG AG e Tnf antisense – CAA TCA CCC CGA AGT TCA GT; b-actina sense - ACC GTG AAA AGA TGA CCC AG e b-actina antisense- CTC TCA GCT GTG GTG GTG AA. A análise semi-quantitativa da expressão dos genes foi realizada por densitometria e a normalização dos dados de densidade das bandas foi avaliada com auxílio do software 1D elite®. A análise densitométrica mostrou que a expressão do gene Tnf tem sua



intensidade reduzida ( $p < 0,05$ ) em macrófagos peritoneais de animais tratados agudamente com domperidona ( $0,6 \pm 0,37$ ), em relação ao grupo controle ( $1,0 \pm 0,16$ ).

**Conclusões:** A hiperprolactinemia aguda, induzida pelo tratamento farmacológico com domperidona, leva a diminuição da expressão do gene Tnf, em macrófagos peritoneais de ratas.

34.016

MEDIDA DA ATIVIDADE LOCOMOTORA DE CAMUNDONGOS TRATADOS REPETIDAMENTE COM MORFINA: UM ESTUDO COM O ANTAGONISTA NALOXONE. <sup>1</sup>Rodrigues-Costa, E. C.; <sup>1</sup>Stankevicius, D. <sup>\*\*</sup>; <sup>2</sup>Carvalho-Freitas, M. I. R. <sup>\*\*</sup>; <sup>3</sup>Fonseca, E. S. M. <sup>\*\*</sup>; <sup>3</sup>Palermo-Neto, J.; <sup>3</sup>Felicio, L. F.; <sup>1</sup>Farmacologia ICB I-USP; <sup>2</sup>Neurociências e Comportamento, USP; <sup>3</sup>Patologia e Toxicologia FMVZ-USP

**Objetivo:**

O uso repetido de morfina produz um aumento progressivo na locomoção de roedores, fenômeno conhecido como sensibilização comportamental. O objetivo deste estudo foi validar o protocolo da sensibilização comportamental em camundongos, e caracterizar o envolvimento opioidérgico nesta resposta com o uso do bloqueador de receptores opióides, naloxone.

**Métodos e Resultados:**

Quarenta e oito camundongos Balb/c com 8-12 semanas de idade e pesando de 20-35g foram divididos ao acaso, nos diferentes grupos conforme a tabela abaixo. No experimento 1, animais dos grupos MS e MM foram pré-tratados com 20 mg/kg (s.c) de morfina durante quatro dias (1, 2, 3 e 6) enquanto àqueles dos grupos SS e SM receberam durante o mesmo período injeções de 10 ml/kg (s.c.) de salina. No dia 9, os animais foram desafiados com salina ou morfina e 30 minutos depois, mediu-se por 5 minutos a locomoção total (central + periférica) dos mesmos no campo aberto. No experimento 2, os animais dos grupos MSM e MNM foram pré-tratados com 20 mg/kg (s.c) de morfina durante quatro dias, conforme descrito no experimento 1. No dia 9, os animais dos grupos MSM e MNM foram pré-tratados respectivamente com 10 ml/kg (s.c.) de salina e 1 mg/kg (s.c.) de naloxone. Após 30 minutos, os animais de ambos os grupos foram desafiados com morfina. Aos trinta minutos da última injeção os mesmos foram observados no campo aberto por 5 minutos. A tabela a seguir mostra os resultados obtidos.

Grupos <sup>1</sup>	Locomoção (cm/ 5 min)		
	Central	Periférica	Total
<b>Experimento 1</b>			
SS	141,2±18,2	1325,0±35,0	1479,8±57,4
SM	212,5±50,3	2024,1±184,0 <sup>a</sup>	2236,7±197,5 <sup>a</sup>
MS	114,1±10,0	1219,1±67,4 <sup>c</sup>	1273,7±96,2 <sup>c</sup>
MM	416,2±64,6 <sup>ab</sup>	2883,8±223,9 <sup>ab</sup>	3413,0±237,6 <sup>abc</sup>
<b>Experimento 2</b>			
MSM	464,9±86,6	3415,0±173,6	3914,1±135,2
MNM	196,9±70,7 <sup>d</sup>	1410,4±266,5 <sup>d</sup>	1607,3±244,7 <sup>a</sup>

<sup>1</sup> SS (salina+salina); SM (salina+morfina); MS (morfina+salina); MM (morfina+morfina); MSM (morfina+salina+morfina) e MNM (morfina+naloxone+morfina). Valores expressos como média  $\pm$  erro padrão. <sup>a</sup> $P < 0,05$  x SS; <sup>b</sup> $P < 0,05$  x MS; <sup>c</sup> $P < 0,05$  x SM e <sup>d</sup> $P < 0,05$  x MSM.

**Conclusões:**

Os resultados obtidos sugerem a participação de receptores opióides na expressão do fenômeno da sensibilização comportamental e, ainda, mostram que a dose de 20 mg/kg de morfina, utilizada nestes experimentos, pode ter um efeito ansiogênico.