

10.001 INTRACELLULAR pH IN DORSAL ROOT GANGLION NEURONS.

Taniguchi, E. Y. , Cassola, A. C. ,

Departamento de Fisiologia e Biofísica - ICB - USP

Introducao:

Neurons in the dorsal root ganglia (DRG) are sensitive neurons, in which an axon bifurcates in one branch running to the periphery and one entering the spinal chord. The neuron somata is enveloped by satellite glia cell. No synaptic input is found on each neuron. This investigation is concerned with intracellular pH regulation in the neuron somata. Cytosol acidification is promoted by different maneuvers and pH recovery is followed, attempting to identify outward proton transports through cell membrane.

Objetivos:

To analyse intracellular pH regulation in neurons of DRG.

Metodos:

Ganglia were taken from newborn rats (Comissão de ética de experimentação animal do ICB, protocol 48), treated with trypsin and dispersed cells were maintained in culture (DMEM + calf serum) in atmosphere of CO₂ 5%, 37°C. Intracellular pH was estimated with the ratiometric indicator BCECF. Cells were loaded with the acetometoxi derivative. The fluorescence measurements were done in a Leica DMI6000B microscope. The chamber housing the cells was perfused continuously with the solutions, heated in line to 37°C. Intracellular pH was changed in two ways: with a NH₄Cl pulse or with extracellular solution of acidic, 6.5, pH. In both cases, intracellular pH recovery upon return to control solution was followed. The kinetics of pH recovery is well fitted by one exponential. The determined rate constant is physically related to the proton transport mechanism. Amiloride 50 microM was applied to test the hypothesis of a Na x H antiporter. The extracellular control solution is a Tyrode: NaCl 132 mM, MgCl₂ 1.2 mM, KCl 4 mM, HEPES 10 mM, CaCl₂ 1.8 mM, Glucose 5 mM. For the ammonium pulses, NH₄Cl partially replaces NaCl (20 mM). This extracellular control solution is acidified to pH 6.5, with HCl, for the acid pulses.

Resultados:

Following the ammonium pulse, during the perfusion of control solution, the pH falls to acid levels and recovers toward the previous value (before ammonium pulse) . The rate constant for the exponential increase in pH is 0.0083 ± 0.0004 (57) s⁻¹. This rate constant is significantly reduced in the presence of amiloride to 0.0044 ± 0.0013 (11) s⁻¹. Interestingly, when intracellular pH is acidified, exposing the cells to an acidified solution, otherwise identical to the control one, the recovery is faster, with rate constant in the order of 0.0313 ± 0.0019 (48) s⁻¹.

Conclusão:

Neurons of DRG are endowed with robust proton pumping mechanism, probably Na^+/H^+ , that are clearly unveiled in the recovery of intracellular pH, after an ammonium pulse. When intracellular pH is reduced by acid extracellular solution, the recovery is faster suggesting a modulation of the exchanger by extracellular pH.

Apoio Financeiro:

Neurons of DRG are endowed with robust proton pumping mechanism, probably Na^+/H^+ , that are clearly unveiled in the recovery of intracellular pH, after an ammonium pulse. When intracellular pH is reduced by acid extracellular solution, the recovery is faster suggesting a modulation of the exchanger by extracellular pH.

Comitê de Ética:

10.002 PKC épsilon Estimula a Atividade da Cu(I)-ATPase ATP7B de Fígado de Porco

Cardoso, L. H. D. , Vieyra, A. , Lowe, J. ,
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho - IBCCF/UFRJ
INCT de Biologia Estrutural e Bioimagem - INBEB/INCT

Introdução:

O cobre é um metal essencial, porém em altas concentrações se torna extremamente tóxico. ATP7B é uma das duas ATPases transportadoras de cobre (Cu(I)-ATPase) em mamíferos e a única expressa no fígado, responsável pela excreção de cobre na bile. Estudos prévios do nosso grupo demonstraram que a proteína cinase dependente de AMPc (PKA) modula negativamente a atividade de ATP7B.

Objetivos:

Determinar se vias envolvendo PKC também são capazes de modular a atividade de ATP7B.

Metodos:

A atividade Cu(I)-ATPásica foi determinada pela diferença de Pi liberado na ausência e presença do quelante de cobre BCS (Int J Biochem Cell Biol. 43:3, 2011). O teste ANOVA de uma via com pós-teste Newman-Keuls foi usado para análise estatística ($p > 0,5$; $n \geq 4$). A detecção de isoformas de PKCs nas amostras foi realizada por Western Blotting. A análise do ciclo catalítico de ATP7B foi realizada com incubação das amostras com ATP[γ - 32 P]. Para a análise da fosforilação regulatória de ATP7B por PKC foi utilizado o corante para resíduos proteicos fosforilados Pro-Q Diamond, e as condições controle e com PMA, foram comparadas através de teste T de Student pareado.

Resultados:

A atividade de ATP7B é expressa em nmol Pi/(mg ptn x min). PMA 10 nM, análogo de diacilglicerol e ativador de PKC, estimulou a atividade de ATP7B (controle: $16,9 \pm 0,9$; PMA: $26,4 \pm 1,8$), enquanto o inibidor calfofostina C 10 nM, levou a uma diminuição da atividade (controle: $36,9 \pm 0,5$; calfofostina: $23,2 \pm 6,8$). Fosfatase lambda adicionada após pré incubação com PMA impediu o estímulo de ATP7B por PKC nos mesmos níveis que fosfatase lambda sozinha (controle: $22,8 \pm 1,1$; fosfatase: $10,1 \pm 3,0$; PMA/fosfatase: $10,2 \pm 2,4$). A inibição da fosfolipase C por U73122 100 nM levou a uma diminuição da atividade de ATP7B (controle: $39,8 \pm 5,1$; U73122: $14,7 \pm 0,7$). Diferentes isoformas de PKC (alfa, epsilon e zeta) foram encontradas nas amostras. A adição de Ca^{2+} 2 uM ou Ca^{2+} /PMA não levou a alterações na atividade, mas na presença de PMA e EGTA 20 mM houve aumento semelhante à condição com PMA sozinho, indicando que uma PKC independente de Ca^{2+} estimula ATP7B (controle: $17,5 \pm 1,7$; PMA/ Ca^{2+} : $19,1 \pm 2,7$; Ca^{2+} : $21,5 \pm$

2,3; PMA/EGTA: $35,7 \pm 2,0$). Utilizando o inibidor específico para PKC épsilon 0,5 uM, a atividade Cu(I)-ATPásica diminuiu (controle: $30,7 \pm 1,7$; iPKCe: $12,2 \pm 0,6$), demonstrando que essa isoforma de PKC independente de Ca²⁺ é a responsável pela ativação de ATP7B. Ensaio de cinética enzimática demonstraram que a sinalização por PKC altera a V_{máx}, mas não o K_m/K_{0,5} para ATP ou cobre. Experimentos de fosforilação catalítica demonstraram que não ocorre alteração nas etapas iniciais do ciclo catalítico de ATP7B (fosforilação e defosforilação), sugerindo que a alteração ocorre em uma etapa após a defosforilação de ATP7B. Ensaio de fosforilação regulatória confirmaram que ATP7B é fosforilada por PKC. Conclusão: As vias de sinalização que levam ao estímulo de fosfolipase C e PKC épsilon podem estimular o transporte ativo de Cu(I) por ATP7B, alterando o metabolismo deste metal.

Conclusão:

As vias de sinalização que levam ao estímulo de fosfolipase C e PKC épsilon podem estimular o transporte ativo de Cu(I) por ATP7B, alterando o metabolismo deste metal.

Apoio Financeiro:

As vias de sinalização que levam ao estímulo de fosfolipase C e PKC épsilon podem estimular o transporte ativo de Cu(I) por ATP7B, alterando o metabolismo deste metal.

Comitê de Ética:

Fígados de porco foram obtidos em abatedouro comercial, sob a supervisão de veterinário e vigilância sanitária, para obter as frações de membrana enriquecidas em complexo de Golgi através de centrifugação diferencial.

10.003 H⁺-dependent mechanism for inorganic phosphate uptake in the primitive fungus *Blastocladiella emersonii*

Fernandes, J. R. M. , Vieira, A. L. G. ,
Departamento de Quimica - UFRRJ
Departamento de Bioquimica - UFRJ

Introducao:

Inorganic phosphate (Pi) is an important nutrient for cellular metabolism in all forms of life because it is involved in most metabolic process, including energy metabolism and signal transduction. In the chytridiomycete *Blastocladiella emersonii*, the removal of phosphate at any time during growth induces sporulation of vegetative cells. If the phosphate is latter added to the same cultures, growth can be restored if the cells are not yet committed to sporulation, showing that phosphate limitation is sufficient to interrupt cell growth and to induce complete sporulation (Bongiorno et al. Can. J. Microbiol. 2012, 58:1104-1111). Since inorganic phosphate availability seems to be involved in cell growth and differentiation of *B. emersonii* when other nutrients are not limiting, the biochemical characterization of the mechanism by which *B. emersonii* internalizes Pi is needed to clarify several new features of the regulation of Pi metabolism.

Objetivos:

Then, the aim of the present work is: (1) to investigate the Pi transport system whereby phosphate is taken up by *B. emersonii* cells and to measure the uphill Pi uptake capacity across the plasma membrane of the fungus grown under Pi depletion, and (ii) any possible association with the transport of other species of ions.

Metodos:

We investigated the influence of H⁺ and K⁺ ionophores and inhibitors on ³²Pi transport. In all cases, at least three independent experiments were performed in triplicate. The values shown in all experiments represent the mean±SE. Comparison among the different conditions was made using an unpaired t-test or Student's t-test. Differences were considered significant at p<0.05. All statistical analyses were performed using Prism 4.0 software (GraphPad Software, San Diego, USA). We also analyzed two expressed sequence tags (ESTs) encoding a putative H⁺:Pi-transporter using bioinformatics tools.

Resultados:

The proton ionophore FCCP, bafilomycin A1 (an inhibitor of the plasma membrane H⁺ pump), nigericin (K⁺ ionophore) and SCH28080 (an inhibitor of H⁺,K⁺-ATPase) all reduced the transport of Pi, suggesting that an electric potential gradient $\Delta\psi$ is necessary for an electrogenic (influx

of a positive net charge) or electroneutral Pi uptake. Furthermore, the transport of Pi was significantly diminished upon changes in pH range between 6.4 and 8.4. The increased transport rates at the lower pH may reflect the preference for H₂PO₄⁻ over HPO₄²⁻. As Pi has a pK_a of 7.1 for the second H⁺ under physiological conditions, the ration of monovalent to divalent Pi decreases as the extracellular pH increases from 6.4 to 8.4. In addition, two expressed sequence tags (ESTs) that code for a putative H⁺:phosphate-symporter were identified in the *B. emersonii* EST database (www.blasto.iq.usp.br).

Conclusão:

These findings provide the first evidence of a H⁺:Pi-transport system in *B. emersonii*, similar to PHO84 in *S. cerevisiae*, that contributes to the acquisition of inorganic phosphate and could be involved in growth, differentiation e survival of *B. emersonii*.

Apoio Financeiro:

These findings provide the first evidence of a H⁺:Pi-transport system in *B. emersonii*, similar to PHO84 in *S. cerevisiae*, that contributes to the acquisition of inorganic phosphate and could be involved in growth, differentiation e survival of *B. emersonii*.

Comitê de Ética:

The experiments of the present work do not involve animals or human beings.

10.004 Sinvastatina inibe a secreção de insulina estimulada pela glicose em células INS-1E e ilhotas pancreáticas através da inibição da isoprenilação de proteínas e diminuição da organização estrutural e funcional da membrana

Zuniga-hertz, J. P. , Oliveira, E. R. L. , Patel, H. H. , Abdulkader, F. R. M. ,

Fisiologia e Biofísica - ICB-USP

Anesthesiology - UCSD

Introducao:

O processo de secreção de insulina estimulado pela glicose (GSIS) é regulado pelo colesterol e intermediários isoprenoides da sua biossíntese. A incorporação de grupos isoprenila em proteínas GTPases pequenas, altamente envolvidas com o tráfico e secreção do grânulo de insulina, é um evento crítico para a liberação do hormônio. O colesterol, por sua vez, é fundamental para a organização estrutural e conseqüentemente funcional de membranas celulares, cuja funcionalidade impacta diretamente desde a gênese do grânulo de secreção até a estrutura do próprio grânulo e a organização da maquinaria de secreção na membrana plasmática, aparentemente em microdomínios de membrana chamados de lipid rafts.

Objetivos:

Sendo as estatinas drogas amplamente utilizadas na clinica como inibidores da síntese de colesterol, nosso intuito foi compreender o efeito destas na GSIS desde a perspectiva dos grupos isoprenila e do efeito organizador de membrana do colesterol.

Metodos:

Células INS-1E foram tratadas com sinvastatina (SIM 1 μ M) durante 2h e 24h. Metil- β -ciclodextrina (M β CD 1mM) foi utilizada como controle de diminuição do colesterol. O envolvimento do geranylgeranyl pirofosfato (GGPP 20 μ M) na GSIS foi avaliado através da suplementação em células INS-1E durante 24h e desafiadas com SIM 2h; a insulina secretada foi medida por radioimunoensaio (RIE). O efeito da SIM nas correntes para cálcio e nos eventos de fusão de grânulo foi avaliado por eletrofisiologia em ilhotas pancreáticas de rato (Wistar, 6 meses, 300g, macho), medindo relações corrente-voltagem e capacitância em resposta a trens de despolarização. Os efeitos físicos na membrana, decorrentes da diminuição do colesterol pelo tratamento de 24h com SIM, foram avaliados através de espectroscopia de ressonância paramagnética de elétrons (EPR), medindo fluidez de membrana. Integridade de lipid rafts foi avaliada por imunofluorescência medindo agregados de rafts marcados com toxina B de cólera e através de western blot de proteínas SNARE presentes em lipid rafts obtidos por isolamento destes por ultracentrifugação em gradientes de sacarose. O efeito do colesterol na secreção foi confirmado por suplementação com colesterol de células tratadas 24h com ácido zaragózico (ZGA 20 μ M),

inibidor da síntese de colesterol que não afeta a síntese de grupos isoprenila. O conteúdo de colesterol celular foi medido por método fluorométrico.

Resultados:

O tratamento de 2h com SIM inibe a GSIS (41%) através da diminuição da geranylgeranilação de proteínas sem redução do conteúdo de colesterol. No entanto, o tratamento de 24h com SIM inibe a GSIS (35%) diminuindo o conteúdo celular de colesterol. Tanto os tratamentos de 2h e 24h com SIM diminuem a capacitância decorrente de eventos de fusão de grânulos (52 e 68%, respectivamente); somente o tratamento de 24h diminui as correntes de cálcio. 24h de SIM aumenta a fluidez de membrana (52%), desorganizando a membrana, observada através da diminuição de agregados de lipid rafts na membrana e reorganização de proteínas SNARE em frações de membrana. A suplementação com colesterol de células tratadas 24h com ZGA recupera a função secretória.

Conclusão:

A isoprenilação de proteínas e a integridade física da membrana decorrente do conteúdo de colesterol são fundamentais para a GSIS, sendo ambos parâmetros afetados negativamente pela SIM.

Apoio Financeiro:

A isoprenilação de proteínas e a integridade física da membrana decorrente do conteúdo de colesterol são fundamentais para a GSIS, sendo ambos parâmetros afetados negativamente pela SIM.

Comitê de Ética:

Protocolo CEUA ICB-USP N°5 reg

10.005 IL-4 Regulates Protein Handling in the Kidney: A New Role For A Well-Known Cytokine

Silva-filho, J. L. , Silva, L. S. , Peruchetti, D. B. , Pinheiro, A. A. S. , Caruso-neves, C. ,
1Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho - UFRJ

Introducao:

During pathophysiological conditions, the overload of albumin in proximal tubule cells induces the release of different cytokines and chemokines, resulting in the infiltration of immune cells such as macrophages and T cells, which promote renal damage. IL-4 is the hallmark cytokine that drives the Th2 phenotype of T cells and M2 phenotype of macrophages. However, the role of IL-4 in the albumin-induced acute kidney injury it is not well cleared yet. Our group verified that, in physiological conditions, IL-4R α ; knockout mice show lower urinary protein excretion, indicating that IL-4 regulates protein handling in the kidney beyond its immunoregulatory action. The elucidation of such mechanism open new perspectives to understand the role of this cytokine in the protein overload-induced acute kidney injury.

Objetivos:

The aim of this study is to evaluate the role of IL-4 and molecular mechanisms involved in the protein handling by epithelial tubule cells.

Metodos:

: LLCPK cells, a lineage of porcine proximal tubule epithelial cells were cultured for 24h in a serum-free medium while stimulated with different concentrations of porcine recombinant IL-4 (1, 5, 10, 20 and 40ng/mL). In a second setting of experiments, the cells were starved and treated with IL-4 20ng/mL at different times (5-60min, 2, 4, 6, 16, 18, 20 and 24h). After stimulation, cells were incubated with FITC-conjugated BSA to evaluate specific BSA uptake. Immunoblotting was also used to determine the IL-4-triggerred molecular pathways in LLCPK cells in the different experimental settings.

Resultados:

Immunoblotting experiments revealed that LLCPK express IL-4R α ;, which suggests that these cells may respond to IL-4. Indeed, dose-response experiments showed that IL-4 decreases BSA uptake by LLCPK cells, with potent effect at 20ng/mL. In addition, time-response experiments showed that inhibition of BSA uptake by IL-4 20ng/mL is significant after 2 hours of stimuli. This effect seems to involve strong STAT6 phosphorylation, even after 24h of stimulation.

Conclusão:

These results indicate that IL-4 could directly target proximal tubule cells, triggering signaling pathways that lead to inhibition of protein uptake.

Apoio Financeiro:

These results indicate that IL-4 could directly target proximal tubule cells, triggering signaling pathways that lead to inhibition of protein uptake.

Comitê de Ética:

Any experiment with animal or human wasn't performed in this work.

10.006 HIGH SALT DIET INDUCES TUBULAR DAMAGE WITHOUT ANY CHANGE IN BLOOD PRESSURE: INACTIVATION OF CORTICAL mTORC2/PKB PATHWAY.

Teixeira, D. E. , Albino, R. C. , Valadao, L. P. F. , Silva-Filho, J.L., Peruchetti, D. B. , Caruso-Neves, C.,

Biofisica - IBCCF

Instituto de Biofisica Carlos Chagas Filho - IBCCF

Introducao:

It is well-known that high blood pressure (BP) is associated to high salt diet (HSD), which may lead to kidney injury. In recent studies, it has been shown that HSD, without BP changes, increased renal TGF- β 1 production and MAPK activity, which are vastly associated to tubular injury and proteinuria, indicating that renal high Na⁺ content could induce local injury. However, the molecular mechanism behind the effect of HSD, without BP changes, in this process still needs to be cleared.

Objetivos:

The aim of this study was to investigate the molecular mechanisms behind tubular injury induced by high Na⁺ content without BP changes.

Metodos:

Male Balb/c mice 6-8 weeks-old were randomly separated in two groups: (1) control (normal diet - 0.3% sodium, n=3); (2) HSD (high salt diet – 8.0% sodium, n=3). Initially, both groups were allocated into metabolic cages during 2 days with normal diet and water ad libitum. After that, both groups received their specific diets during 15 days. Systolic blood pressure was checked 2-times a week by tail-cuff method. Also, urine and blood samples were collected for renal function assessments. After 15 days of treatment, kidneys were removed and renal cortex were obtained and homogenized for protein analysis.

Resultados:

Systolic blood pressure, mean arterial pressure and body weight did not alter between both groups during the treatment. HSD induced 5-fold increase of urinary flow rate, 7.4-fold in creatinine clearance (CCr), 1.3-fold in urinary sodium excretion, 9.3-fold in renal sodium clearance (CNa⁺) and 1.5-fold in renal fractional sodium excretion (FENa⁺) compared to control group. These data confirmed the high Na⁺ content in the kidneys without changes in BP. Interestingly, HSD induced 14-fold increase in UPC ratio and 2.1-fold in urinary γ -GT activity, markers of kidney damage. These results indicate a protein overload in proximal tubules and tubular injury. In addition, HSD decreased 30% of PKB phosphorylation at S473 (a specific mTORC2 substrate) in renal cortex homogenate, indicating decrease in PT cell survival.

Conclusão:

High renal sodium content may induces tubular injury through a mechanism involving PT mTORC2/PKB inactivation.

Apoio Financeiro:

High renal sodium content may induces tubular injury through a mechanism involving PT mTORC2/PKB inactivation.

Comitê de Ética:

IBCCF 098

10.007 MIS-REGULATION OF mTOR COMPLEXES DURING ALBUMINURIA IN PROXIMAL TUBULES: POSSIBLE ROLE IN TUBULOINTERSTITIAL DISEASE.

Peruchetti, D. B. , Cheng, J. , Guggino, W. B. , Caruso-Neves, C. ,

Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho - IBCCF-UFRJ

Department of Physiology - JHU

Introducao:

Albumin overload in proximal tubules (PT) induces tubulointerstitial injury. Furthermore, overactivation of mTORC1 has been observed in tubulointerstitial disease. However, a possible correlation between albumin overload and activation of mTORC1 in PT has not been established yet.

Objetivos:

We aimed to study the effect of physiologic (0.01 mg/mL) and pathophysiologic (20.0 mg/mL) albumin concentrations on the mTOR pathway in PT cells.

Metodos:

LLC-PK1 cells, a porcine PT cell line, were incubated for 30 min with albumin and/or different compounds.

Resultados:

The physiologic albumin concentration increased mTOR phosphorylation at S2481 (an mTORC2 marker) and S2448 (an mTORC1 marker) (n = 8). This effect was followed by an increase in protein kinase B (PKB) phosphorylation at S473 (an mTORC2 substrate), 4E-binding protein (BP) phosphorylation at T37/46 and S6K phosphorylation at T389, T421 and S424 (mTORC1 substrates). A pathophysiologic albumin concentration inhibited phosphorylation of S2481 and mTORC2 activity, which was correlated to the phosphorylation of RICTOR (a protein associated with mTORC2, n = 4) at T1135. On the other hand, mTORC1 phosphorylation at S2448 as well as 4E-BP1 and S6K phosphorylation were further enhanced (n = 8). This process involved (1) a reduction in surface levels of megalin (n = 3); (2) an increase in ERK1/2 phosphorylation; (3) an increase in the phosphorylation of TSC2 at the PXS*P motif (ERK1/2 target), and this effect was abolished by ERK inhibitor, n = 8); (4) phosphorylation of TSC2 at S664 (ERK1/2 target, n = 8); (5) disruption of TSC1-TSC2 complex (n = 6); (6) co-localization of Rheb and RAPTOR (a protein associated with mTORC1, n = 3); and (7) phosphorylation of S6K at S371 (ERK1/2 target which activates S6K, n = 8). ERK1/2 inhibitor abolished the stimulatory effect of the pathophysiologic albumin concentration on the phosphorylation of both mTORC1 and S6K (n = 8). S6K1 inhibitor (PF-4708671 1.0 μ M) abolished the effect of the pathologic albumin concentration on the phosphorylation of both mTORC1 and RICTOR (n = 6). We tested the possible involvement of

megalin as a sensor of albumin overload in PTs. LLC-PK1 cells were stably transfected with shRNA for megalin, which led to a 60% decrease in megalin expression (n = 6). Knockdown of megalin mimicked all the effects of pathophysiologic albumin concentrations, disrupting the normal signal transduction pathways and leading to overactivation of mTORC1 and inhibition of mTORC2.

Conclusão:

The results show that a physiologic albumin concentration activated the mTORC2/PKB/mTORC1/S6K pathway, but a pathophysiologic albumin concentration overactivated mTORC1 and inhibited mTORC2 activity. This process involved a decrease in megalin expression and activation of ERK1/2, which promoted the inhibition of TSC2 and activation of S6K. Furthermore, S6K was crucial in promoting overactivation of mTORC1 and inhibition of mTORC2. These data provide new perspectives for our understanding of the molecular mechanisms behind the effects of albumin on the progression of renal disease.

Apoio Financeiro:

The results show that a physiologic albumin concentration activated the mTORC2/PKB/mTORC1/S6K pathway, but a pathophysiologic albumin concentration overactivated mTORC1 and inhibited mTORC2 activity. This process involved a decrease in megalin expression and activation of ERK1/2, which promoted the inhibition of TSC2 and activation of S6K. Furthermore, S6K was crucial in promoting overactivation of mTORC1 and inhibition of mTORC2. These data provide new perspectives for our understanding of the molecular mechanisms behind the effects of albumin on the progression of renal disease.

Comitê de Ética:

Does not apply because we did not carry out any animal or human in vivo experiments.

10.008 LITHIUM PROTECTS PROXIMAL TUBULE AGAINST TUBULOINTERSTITIAL INJURY INDUCED BY ALBUMIN OVERLOAD.

Albino, R. C. , Oquendo, M. B. , Teixeira, D. E. , Silva, L. S. , Peruchetti, D. B. , Leal-cardoso, J. H. ,
Caruso-neves, C. ,

Instituto de Biofisica Carlos Chagas Filho - UFRJ

Instituto Superior de Ciencias Biomedicas - UECE

Introducao:

Lithium intake is the most indicated therapy for mood-disorders. However, it has been shown association between long-term lithium intake and development of kidney injury, which makes it contraindicated to patients with impaired kidney function. In this way, we hypothesized that long-term lithium intake could possibly potentiate the development of tubulointerstitial injury.

Objetivos:

The aim of this work is investigate the effects of lithium therapy in the development of tubulointerstitial injury.

Metodos:

For in vivo experiments, we used: BSA-challenged tubulointerstitial injury animal model, an in vivo model of albumin overload into proximal tubule (PT). Male BALB/C mice, 8-10 weeks-old, were randomly divided in different groups: (1) control, intraperitoneally injected (i.p.) with saline (n=9); (2) BSA, i.p. injected with BSA 10g/kg/day (n=9); (3) lithium, control group treated with lithium carbonate 0.3 g/kg/day by gavage (n=7); (4) BSA + lithium (n=17). For in vitro experiments, we used: LLC-PK1 cells, a porcine proximal tubule cell (PTC) line. The cells were incubated overnight with albumin and lithium in different conditions.

Resultados:

During in vivo experiments, no changes were observed in plasma creatinine and GFR in the different groups. However, both lithium and BSA + lithium groups showed 2-fold increase in water intake and 6.5-fold increase of urinary flow in relation to control and BSA groups. In agreement, the urine osmolarity decreased 80% in the lithium-treated groups. Surprisingly, proteinuria and high UPC ratio (both markers of kidney damage) observed in BSA group were reduced by lithium treatment at 7 and 14 days, suggesting that lithium restore the tubular protein transport previously decreased by albumin overload in PT. During in vitro experiments, lithium increased albumin-FITC uptake in a dose-dependent manner (5-30 mM) (n=6). In addition, pathophysiological albumin concentrations inhibited albumin-FITC uptake around 50% (n=7). However, higher lithium concentrations (20 and 30 mM) abolished the effect of pathophysiological albumin concentration on albumin-FITC uptake (n=5). Similar results were obtained using fluorescent microscopy (n=2). Next,

we checked the effect of lithium on PKB and ERK phosphorylation. We observed that pathophysiological albumin concentrations inhibited PKB phosphorylation at S473 (substrate for mTORC2) around 50%, while, 30 mM lithium completely abolished this effect (n=3). On the other hand, lithium alone inhibited ERK phosphorylation at T202/Y204 in 53 % (n=2), suggesting a crosstalk among these protein kinases and albumin uptake in PT.

Conclusão:

Contrary to our initial idea, these data allow us to suggest that lithium therapy may protect the PT against tubulointerstitial injury induced by albumin overload. This process seems to require PKB activation and inhibition of ERK leading to the recovery of albumin uptake, and consequently, decreasing of proteinuria.

Apoio Financeiro:

Contrary to our initial idea, these data allow us to suggest that lithium therapy may protect the PT against tubulointerstitial injury induced by albumin overload. This process seems to require PKB activation and inhibition of ERK leading to the recovery of albumin uptake, and consequently, decreasing of proteinuria.

Comitê de Ética:

IBCCF 098

10.009 CORRELATION BETWEEN Na⁺-ATPase AND NaPi-II COTRANSPORTER IN OVARIAN CANCER CELLS: POSSIBLE ROLE IN CELL SURVIVAL AND PROLIFERATION

Sirtoli, G. M. , Silva-aguiar, R. P. , Silva-filho, J. L. , Salgado-benvindo, C. , Souza, M. C. , Costa, M. F. S. , Henriques, M. G. , Rangel, L. B. A. , Caruso-neves, C. ,
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho - IBCCF-UFRJ
Instituto de Tecnologia em Fármacos - Fiocruz
Departamento de Farmacologia - UFES

Introducao:

Epithelial ovarian cancer (EOC) has the highest mortality rate among women with a gynecologic malignancy. Rangel et al (Oncogene. 22:7225, 2003) showed that EOC cells have increased mRNA for NaPi-IIb indicating that this transporter is a biomarker for ovarian cancer. However, the mechanism of regulation of this transporter as well as its function in these cells have yet to be determined. As a secondary active transporter, NaPi-IIb promotes the influx of sodium and phosphate ions coupled to the electrochemical gradient generated by a sodium pump. Recently, a second sodium pump insensitive to ouabain and K⁺ and inhibited by furosemide was cloned.

Objetivos:

We aimed to study the possible correlation between the Na⁺-ATPase and NaPi-mediated phosphate uptake in EOC cells and show its role in survival of these cells.

Metodos:

EOC cell lines, A2780, ACRP and ES-2, which differ in their responsiveness to chemotherapy, were used. We also used IOSE cells, immortalized ovarian epithelial cells, as control non-carcinogenic cells. Phosphate uptake and ATPase activity were measured as previously described and expressed as nmol Pi × min⁻¹ × mg⁻¹ protein (BBA. 1820:1001, 2012). Cell viability was measured by LDH activity assay. Cell proliferation was evaluated by CFSE staining and clonogenic assay. Cell apoptosis was measured by Annexin V/PI staining.

Resultados:

Initially, Na⁺-dependent Pi uptake sensitive to phosphonoformic acid (PFA), a specific inhibitor of NaPi-II, was 0.133 ± 0.043 , 0.130 ± 0.036 and 0.069 ± 0.014 in A2780, ACRP and ES-2 cells, respectively. These activities were about 40% higher than that observed in IOSE cells, confirming the increase in the expression of NaPi-II in EOC cells. Furthermore, pre-incubation of EOC cells with 5.0 mM monensin, a sodium ionophore, inhibited the NaPi-II-mediated Pi uptake. The Na⁺-independent Pi uptake represents less than 10% of the total Pi uptake in EOC cells and it was not changed by PFA or monensin. All EOC cells presented furosemide-sensitive,

ouabain-insensitive Na⁺-ATPase activity. This activity followed the same profile as observed for NaPi-II activity, i.e., it was higher in A2780 and ACRP cells than in ES-2 cells. Treatment with 2 mM furosemide for 2 h inhibited NaPi-II-mediated Pi uptake by 40%. The cellular viability, measured by LDH activity, was maintained throughout all experimental approaches. We assessed the influence of Na⁺-ATPase and NaPi-II-mediated Pi uptake on cell proliferation. Treatment with furosemide and PFA for 24 h decreased the percentage of proliferating A2780, ACRP and ES-2 cells by 50%. In addition, the treatment induced a two-fold increase of apoptotic and necrotic cells in EOC cells.

Conclusão:

Our results show an important interdependence between Na⁺-ATPase and NaPi-II cotransporter in EOC cell survival and proliferation, introducing a new perspective on the mechanisms involved in the progression of EOC.

Apoio Financeiro:

Our results show an important interdependence between Na⁺-ATPase and NaPi-II cotransporter in EOC cell survival and proliferation, introducing a new perspective on the mechanisms involved in the progression of EOC.

Comitê de Ética:

Trabalho com cultura de células.

10.010 AT1R ANTAGONISM RESTORES RENAL SODIUM HANDLING ALTERED BY ALBUMIN OVERLOAD IN PROXIMAL TUBULE.

Lisboa, N. L. M. , Araujo, L. A. , Lopes, J. V. , Landgraf, S. S. , Peruchetti, D. B. , Caruso-Neves, C.

Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho - IBCCF-UFRJ

Introducao:

Albumin modulates proximal tubule (PT) cells function. Previous data showed that physiological albumin concentrations induce sodium pump expression through a crosstalk between PKB/PKC and PKA pathways, while, pathophysiological albumin concentrations inhibited it. This process was related to the abundance of megalin, a sensor for albumin in PT, in the cell surface. During renal pathophysiological conditions, megalin expression is decreased. In addition, it has been shown that albumin overload in PT increases some components of renin-angiotensin system (RAS), including angiotensin II (Ang II). Furthermore, it has been shown that Ang II via AT1 receptor (AT1R) downregulates megalin expression in PT cells. Based on this idea, it is plausible to imagine that pathophysiological albumin concentrations inhibit megalin and sodium pump expression through Ang II actions, via AT1R.

Objetivos:

The aim of this work is to investigate the molecular mechanism involved in the effect of albumin overload into PT on the sodium pump regulation.

Metodos:

For in vitro experiments, we used LLC-PK1 cells, a porcine PT cell line. The cells were serum-starved and incubated overnight in absence or presence of 20.0 mg/mL albumin. Albumin 0.01 mg/mL was incubated as positive control for high (Na⁺⁺K⁺)-ATPase activity. When indicated, cells were preincubated with 10⁻⁶M losartan, an AT1R antagonist. After treatment, cells were harvested to measure (Na⁺⁺K⁺)-ATPase activity and its α 1 subunit expression. For in vivo experiments, we used a BSA-challenged tubulointerstitial animal model, a well-known model of albumin overload into PT. Male wistar rats, 14 weeks-old, were randomly separated in four groups: (1) control (n=5); (2) BSA, animals i.p. injected with BSA 10g/kg/day (n=5); (3) losartan, animals treated with losartan 30g/kg/day by gavage (n=5); and (4) BSA + losartan (n=5). After 7 days, the animals were anesthetized and euthanized for protein extraction of renal cortex, and following enzyme activities and protein expression.

Resultados:

In LLC-PK1 cells, pathophysiological albumin concentration did not change the (Na⁺⁺K⁺)-ATPase

activity in relation to the control (n=5). However, pretreatment with losartan increased 60% the enzyme activity, as much as the positive control, mimicking the physiological condition (n=5). In the rats treated with BSA, it was observed downregulation of cortical α 1 subunit expression in 50% and (Na⁺⁺K⁺)-ATPase activity. Interestingly, losartan treatment completely abolished the effect of albumin overload. In addition, fractional renal sodium excretion (FENa⁺) was 2-fold higher only in the BSA group.

Conclusão:

Together, our results and those from the literature suggest that albumin overload in PT activates Ang II/AT1R pathway, which decreases sodium pump expression as well as activity, possibly by downregulation of megalin receptor.

Apoio Financeiro:

Together, our results and those from the literature suggest that albumin overload in PT activates Ang II/AT1R pathway, which decreases sodium pump expression as well as activity, possibly by downregulation of megalin receptor.

Comitê de Ética:

IBCCF186-05/16

10.011 Efeito de análogos sintéticos da Digoxina e Digitoxina, na Na,K-ATPase

Valadares, J. M. M., Li, H. , Wang, H. L. , Bajaj, S. , Odoherly, G. A. , Barbosa, L. A. O. , Cortes, V. F. ,

Laboratório de Bioquímica Celular - UFSJ-CCO

Chemistry and Chemical Biology - NU

Introducao:

Os principais digitálicos descritos na literatura são a digoxina e a digitoxina para o tratamento da insuficiência cardíaca. O principal efeito farmacológico dessas moléculas é a inibição da Na,K-ATPase que aumenta o Na⁺ intracelular, resultando em aumento na concentração do Ca²⁺ intracelular devido a diminuição do gradiente transmembrana de Na⁺. Esses glicosídeos também vêm sendo bastante estudados como potenciais agentes antitumorais. Devido a isso Na,K-ATPase pode ser considerada um alvo importante para a avaliação dos efeitos de análogos de Digoxina e Digitoxina, uma vez que sua alta expressão e atividade estão envolvidas com desenvolvimento e progressão de diferentes tumores.

Objetivos:

Avaliar a atividade da Na,K-ATPase na presença de análogos sintéticos da Digoxina e Digitoxina.

Metodos:

Foi avaliado o efeito de 8 análogos de Digoxina e Digitoxina, (Piv-a-D-Rha-digoxin, a-L-Ami-Digoxin, a-L-Rha-Digoxin, a-L-Amicetose-Digitoxin, a-L-(1,4)-Rhamnose-Digitoxin Trisaccharide, a-L-Rhamnose-Digitoxin, a-D-Rha-Digoxin e a-D-Ami-Digoxin), na atividade da Na,K-ATPase purificada de medula renal de porco através da dosagem espectrofotométrica do fosfato inorgânico a 660 nm, conforme o método colorimétrico de Fiske e Subbarow. O IC₅₀ também foi determinado a partir do ensaio de MTT utilizando células de carcinoma de pulmão de células não pequenas (NCI-H460).

Resultados:

O composto Piv-a-D-Rha-digoxin não apresentou efeito sobre a atividade da enzima purificada, já os compostos a-L-Rha-Digoxin e a-L-Amicetose-Digitoxin foram capazes de inibir a atividade ATPásica nas concentrações de 1mM (64,5±7,4% e 63,5±8,80%, respectivamente) em relação ao controle. α;-L-(1,4)-Rhamnose-Digitoxin Trisaccharide inibiu a atividade da Na,K-ATPase nas concentrações de 500µM (65,2±9,97%) e 1mM (53,4±15,8%); e a-L-Rhamnose-Digitoxin, a-D-Rha-Digoxin, a-D-Ami-Digoxin), começaram a inibir significativamente a atividade ATPásica a partir da concentração de 100µM. Com relação ao IC₅₀, as drogas que apresentaram um menor

IC50 foram as a-L-Rha-Digoxin e a-L-Rhamnose-Digitoxin (19nM e 20nM, respectivamente). Já as Piv-a-D-Rha-digoxin e a-L-(1,4)-Rhamnose-Digitoxin Trisaccharide apresentaram IC50 de 50 μ M e 1,35 μ M, respectivamente.

Conclusão:

Os compostos testados, exceto Piv-a-D-Rha-digoxin, apresentaram efeito direto sobre a atividade da Na,K-ATPase em concentrações superiores ao efeito antitumoral encontrado, o que nos leva a acreditar que o efeito antitumoral destes compostos não está relacionado com o efeito inibitório clássico da Na,K-ATPase provocada por esta classe de compostos. Sendo assim a próxima etapa será analisar o efeito desses análogos de digitálicos em células Hela, avaliando os efeitos desses compostos nos mecanismos celulares de transdução de sinal do qual a Na,K-ATPase participa.

Apoio Financeiro:

Os compostos testados, exceto Piv-a-D-Rha-digoxin, apresentaram efeito direto sobre a atividade da Na,K-ATPase em concentrações superiores ao efeito antitumoral encontrado, o que nos leva a acreditar que o efeito antitumoral destes compostos não está relacionado com o efeito inibitório clássico da Na,K-ATPase provocada por esta classe de compostos. Sendo assim a próxima etapa será analisar o efeito desses análogos de digitálicos em células Hela, avaliando os efeitos desses compostos nos mecanismos celulares de transdução de sinal do qual a Na,K-ATPase participa.

Comitê de Ética:

O presente trabalho não utiliza cobaias ou humanos em nenhuma fase do estudo.

10.012 Mitochondrial respiration and calcium transport in rat tissues: conversely from skeletal muscle, heart and brain, isolated liver mitochondria exhibit gender dimorphism in respiratory activity.

Chweih, H. , Castilho, R. F. , Figueira, T. R. ,
Patologia Clínica - FCM

Introducao:

Previous data evidenced that isolated liver mitochondria from female rats present higher rates of resting (S4) and ADP-stimulated (S3) O₂ consumption than male. Also, estrogens are cytoprotective, drive mitochondrial biogenesis and may modulate mitochondrial calcium homeostasis in brain and heart in in vitro models. It is unknown whether such gender dimorphism occurs for other mitochondrial functions or in other tissues.

Objetivos:

Therefore, we aimed here to study whether mitochondrial respiration and mitochondrial calcium influx and efflux rates exhibit tissue-specific gender dimorphism.

Metodos:

Liver, skeletal muscle, heart and brain mitochondria were isolated from female and male Wistar rats (ethical approval #2897-1) by means of differential centrifugation. Mitochondrial respiratory states were evaluated by high-resolution oxygraph and mitochondrial calcium transport (ruthenium red-sensitive initial influx rate at 25 μ M external free calcium and sodium-dependent (at 15 mM sodium) and -independent efflux rates) was assessed by following external free calcium levels with the fluorescent probe CaGreen-5N under suitable conditions and in the presence of inhibitors of mitochondrial permeability transition.

Resultados:

In isolated male mitochondria, the rates of O₂ consumption (mean \pm SD nmol/mg/min) during S3 and S4 were, respectively, 37.59 \pm 9.77 and 8.64 \pm 2.59 in liver, 106.1 \pm 24.7 and 12.8 \pm 3.44 in skeletal muscle, 137.1 \pm 42.1 and 25.9 \pm 4.74 in heart, and 31.1 \pm 8.18 and 4.83 \pm 1.28 in brain. The rates (mean \pm SD in nmol/mg/min) of calcium influx and sodium-dependent efflux were, respectively, 228.6 \pm 77.1 and 0.69 \pm 0.39 in liver, 56.12 \pm 20.5 and 3.31 \pm 0.67 in skeletal muscle, 39.4 \pm 18.6 and 8.25 \pm 1.42 in heart, and 54.6 \pm 23.9 and 2.25 \pm 0.89 in brain from males. Among the assessed respiratory and calcium transport variables, the only statistically significant (P<0.05) difference between gender occurred for liver mitochondria O₂ consumption during S3 that was 15% higher in female than in male.

Conclusão:

Thus we conclude that gender dimorphisms for the mitochondrial functions evaluated here is tissue-specific and is confined to higher maximal ADP-stimulated respiration in isolated liver mitochondria from female rats.

Apoio Financeiro:

Thus we conclude that gender dimorphisms for the mitochondrial functions evaluated here is tissue-specific and is confined to higher maximal ADP-stimulated respiration in isolated liver mitochondria from female rats.

Comitê de Ética:

2897-1

10.013 Efeito de análogos sintéticos de hormônios tireoidianos na Na,K-ATPase

Giarola, F. C. , Rossini, A. F. , Martins, J. , Rocha, S. C. , Cortes, V. F. , Barbosa¹, L. A. , Barbosa, L. A. O. ,

Laboratório de Bioquímica Celular - UFSJ-CCO

Laboratório de Síntese Orgânica e Modelagem Molecular - UNIFESP

Introducao:

Os hormônios tireoidianos tiroxina (T4) e triiodotironina (T3) são substâncias produzidas pela glândula tireoide que possuem diversos efeitos fisiológicos. Um deles é o aumento da taxa do metabolismo basal que acontece por meio da estimulação da atividade da Na,K-ATPase. Devido a esse efeito, a Na,K-ATPase é considerada um alvo importante para a avaliação dos efeitos biológicos de substâncias iodinadas ou derivadas de hormônios tireoidianos.

Objetivos:

O objetivo deste trabalho é descrever o efeito de análogos sintéticos de hormônios tireoidianos na atividade da Na,K-ATPase e verificar a ocorrência de citotoxicidade celular.

Metodos:

Foram sintetizados 4 compostos iodados a partir de 4-hidroxiacetofenona e 4-hidroxi-3-metoxibenzaldeído, a saber: 4-hidroxi-3-iodo-5-metoxibenzaldeído; 1-(3,5-diiodo-4-fenoxifenil)etanona; 1-(4-hidroxi-3,5-diiodofenil)etanona e 1-(4-hidroxi-3-iodofenil)etanona, por meio de reações de iodação e de acoplamento nucleofílico. Estes compostos foram isolados e caracterizados por RMN de ¹H e de ¹³C, por espectroscopia no infravermelho e por espectrometria de massas. Células HeLa foram tratadas com os compostos por 48h para visualizar o efeito citotóxico medido pelo ensaio de MTT. A atividade Na,K-ATPásica foi mensurada após tratamento das células HeLa por 24h com 100 µM de cada composto. Após o tratamento, as células foram retiradas do cultivo e foi realizada uma preparação de membrana plasmática que foi utilizada para a medida da atividade ATPásica da Na,K-ATPase a partir da dosagem espectrofotométrica do fosfato inorgânico a 660 nm, conforme o método de Fiske e Subbarow. Também foi avaliado o efeito direto dos compostos em preparações de Na,K-ATPase purificadas de rim de porco.

Resultados:

Todos os experimentos foram realizados em triplicata (n=3). Os compostos sintetizados apresentaram efeito citotóxico significativo apenas na dosagem de 1 mM, com uma perda de viabilidade celular variando entre 52-77%. Entretanto, a 4-hidroxiacetofenona não apresentou nenhum efeito citotóxico quando testada em células HeLa. A avaliação da atividade Na,K-ATPásica

demonstrou que apenas os compostos 1-(4-hidroxi-3,5-diiodofenil)etanona e 4-hidroxiacetofenona na concentração de 100 μ M foram capazes de modular a atividade ATPásica, $22,18 \pm 9,7\%$ e $36,83 \pm 8,6\%$ de atividade em relação a células não tratadas. Entretanto nenhum composto foi capaz de modular a atividade da Na,K-ATPase purificada de medula renal externa isolada de rim de porco(n=3).

Conclusão:

Os resultados encontrados demonstram que a 1-(4-hidroxi-3,5-diiodofenil)etanona e 4-hidroxiacetofenona possuem efeitos importantes na modulação da Na,K-ATPase. Apesar de não apresentaram um efeito direto na atividade da Na,K-ATPase isolada, tais compostos foram capazes de modular a atividade desta enzima em células intactas. Com base em nossos resultados, pode-se sugerir que uma diminuição da expressão da enzima na membrana plasmática possa estar ocorrendo, culminando na diminuição da atividade enzimática da Na,K-ATPase.

Apoio Financeiro:

Os resultados encontrados demonstram que a 1-(4-hidroxi-3,5-diiodofenil)etanona e 4-hidroxiacetofenona possuem efeitos importantes na modulação da Na,K-ATPase. Apesar de não apresentaram um efeito direto na atividade da Na,K-ATPase isolada, tais compostos foram capazes de modular a atividade desta enzima em células intactas. Com base em nossos resultados, pode-se sugerir que uma diminuição da expressão da enzima na membrana plasmática possa estar ocorrendo, culminando na diminuição da atividade enzimática da Na,K-ATPase.

Comitê de Ética:

Não foram realizados experimentos com humanos ou animais.

10.015 Amino-Lipopolymers therapy strategy for pulmonary diseases treatment

Chiarmoni, N. , Bandeira, E. , Perrotta, R. , Fernandez-ruocco, M. J. , Prieto, M. J. , Morales, M. ,
Alonso, S. ,

Departamento de Ciencia y Tecnología, Universidad - MPBio (LBM, LaMaBio)

Carlos Chagas Filho Institute of Biophysics - 2Laboratory of Cellular and Molecular Physiology

Introducao:

In the present study, we evaluated if the combined transporters of amino-lipopolymers may induce an inflammatory response and lung injury, to be used as drug delivery system to the lung tissue. New therapy strategies are being developed to treat respiratory diseases with the purpose to overcome the limitations of conventional drugs. Liposomes are one of the presently used systems for controlled delivery of drugs to the lungs. With the advantage that lipopolymers can be prepared from compounds endogenous to the lungs. Photopolymerized liposomes combined the benefits of a transporter with the resistance and stability of polymers.

Objetivos:

The aim of this work is to develop and characterize biophysically and functionally lipopolymers-associated with aminoacids (Arg, Cys & Trp), in order to analyze if their properties had an influence when interacting with lung barriers without toxic effects.

Metodos:

Different assays such as hydrophobicity index, FTIR, cell metabolism, cellular uptake, lung injury and pulmonary mechanical parameters were described in detail in Fernandez Ruocco MJS et al, 2013 and in Xisto, D et al, 2012. Aminoacid incorporation: L-tryptophan, L-arginine and L-cysteine were dissolved in PBS and incorporated in the dry lipid film. Aminoacid concentration was 50 mol %/total lipid concentration. In vitro release of aminoacids profile of polymerized liposomes was studied in PBS. Surface modifications: the spectral characteristics of the membrane/solution interface changes were recorded upon addition of merocyanine 540 (MC540) between 400 and 600 nm at 10 °C. FTIR spectroscopy was used to study the interaction between lipopolymers and aminoacids and the changes induced by the polymerization process. Evaluation cellular uptake: Calcein uptake was evaluated in primary mesenchymal lung cells. Calcein was associated to lipopolymers with and without amino acid. Evaluation of inflammatory response and lung injury in animal model: Forty female BALB/c mice (20–25 g) were randomly assigned to 5 groups (n=8/group). Mice were anesthetized with sevoflurane, a 1-cm-long midline cervical incision was made to expose the trachea, and either lipopolymers or vehicle at a concentration of 2 mg/mL in 50 µl of PBS were intratracheally instilled with a microsyringe.

Resultados:

L-Arg is the most efficient amino acid in inducing polymerization. L-Cys is the amino acid that is released rapidly from the membrane with an encapsulation efficiency of 42 ± 5 %. All assays were from three independent measurements in duplicate. Lipopolymer with or without amino acids did not present any cytotoxic effects for cellular uptake in Caco-2 cell line. In relation with the in vivo testing, the survival rate was 100% for all groups in 24 h. Analysis of lung resistive and viscoelastic pressures, and static elastance at this point showed no difference between the groups instilled with all types of lipopolymers and aminoacid-lipopolymers.

Conclusão:

Based on the results obtained so far, lipopolymers could be used in the near future as effective carriers for amino acids and combined in a gene-therapy treatment against respiratory diseases.

Apoio Financeiro:

Based on the results obtained so far, lipopolymers could be used in the near future as effective carriers for amino acids and combined in a gene-therapy treatment against respiratory diseases.

Comitê de Ética:

There is no work with animals

10.016 Aspectos termodinâmicos da modulação de proteínas de membrana por ligantes endocanabinóides.

Silva-Gonçalves, L. C., Medeiros, D. , Arcisio-Miranda, M. ,
Biofísica - Unifesp

Introducao:

Ligantes endocanabinóides são biomoléculas endógenas com caráter anfifílico que agem primariamente, de maneira específica, por meio da ativação dos receptores de membrana CB1 e CB2 distribuídos pelo sistema nervoso. Endocanabinóides também produzem efeitos em neurônios de maneira não específica (i.e., independente dos receptores CB1 e CB2) modulando proteínas de membrana como os canais iônicos. Moléculas anfifílicas podem alterar reversivelmente os módulos elásticos da membrana na região de inserção de proteínas. Assim, um mecanismo plausível para a ação não específica de endocanabinóides em canais iônicos seria a modulação do acoplamento hidrofóbico membrana/proteína pela variação de parâmetros elásticos da membrana.

Objetivos:

Analisar os efeitos modulatórios de ligantes endocanabinóides nos parâmetros físico-químicos de membranas com o intuito de entender os efeitos não específicos destes ligantes em canais iônicos.

Metodos:

Bicamadas lipídicas planas de diferentes composições foram construídas em orifícios circulares (~15 mm de diâmetro) formados em filmes de polietileno através do método de Mueller. Estes filmes foram acoplados a uma câmara de acrílico definindo dois compartimentos, cis e trans, os quais foram preenchidos com a mesma solução tampão [Hepes (10 mM), KCl (1 M), pH 7.4]. Este conjunto foi colocado no interior de uma gaiola de Faraday sobreposta a uma mesa antivibracional. Uma alíquota da solução do peptídeo foi adicionada ao compartimento cis e a solução foi homogeneizada através de fluxo de ar obliquamente dirigido. Após a estabilização do sistema um potencial de -100 mV foi aplicado no compartimento trans. A atividade do peptídeo passou então a ser monitorada, na ausência e após sucessivas adições de ligantes endocanabinóides, que correspondiam a três diferentes concentrações dos mesmos.

Resultados:

O conjunto desses experimentos mostra que a adição sucessiva de endocanabinóide, independentemente do fosfolipídio utilizado, produz um aumento na frequência de aparecimento, no tempo de vida médio no estado aberto e, conseqüentemente, da atividade dos canais de gramicidina (sem endocanabinóide: $89,2 \pm 35,4$ (n=3) e com endocanabinóide: $927,5 \pm 152,8$ (n=3)). Alterações mais expressivas foram observadas em bicamadas com espessuras hidrofóbicas

maiores. Nenhuma alteração foi observada no nível de corrente unitária desses canais, indicando a não existência de ligação do endocanabinóide diretamente aos monômeros de gramicidina.

Conclusão:

A modificação da atividade dos canais iônicos de gramicidina pelos endocanabinóides é uma ação local, não específica e mediada pela bicamada. A amplitude de corrente permanece inalterada na presença de endocanabinóides, o que sugere a inexistência de uma ligação direta entre os endocanabinóides e a proteína. A frequência de aparecimento de canais bem como o tempo de vida médio no estado aberto cresce proporcionalmente à adição de endocanabinóides. Dessa forma, os resultados obtidos têm potencial para suportar um novo modo de ação dos ligantes endocanabinóides onde a modulação do desacoplamento hidrofóbico membrana/proteína pela alteração causada nos parâmetros elásticos da membrana pelos endocanabinóides é o principal mecanismo da sua ação direta não específica.

Apoio Financeiro:

A modificação da atividade dos canais iônicos de gramicidina pelos endocanabinóides é uma ação local, não específica e mediada pela bicamada. A amplitude de corrente permanece inalterada na presença de endocanabinóides, o que sugere a inexistência de uma ligação direta entre os endocanabinóides e a proteína. A frequência de aparecimento de canais bem como o tempo de vida médio no estado aberto cresce proporcionalmente à adição de endocanabinóides. Dessa forma, os resultados obtidos têm potencial para suportar um novo modo de ação dos ligantes endocanabinóides onde a modulação do desacoplamento hidrofóbico membrana/proteína pela alteração causada nos parâmetros elásticos da membrana pelos endocanabinóides é o principal mecanismo da sua ação direta não específica.

Comitê de Ética:

O presente trabalho envolve protocolos de experimentação animal e de experimentação humana.

10.017 Caracterização eletrofisiológica de novas variações genéticas do canal para potássio do tipo Kir2.6 relacionadas à paralisia periódica tirotóxica.

Paninka, R. M. , Silva, M. R. , Arcisio-Miranda, M.,

Biofísica - UNIFESP

Endocrinologia - UNIFESP

Introducao:

A Paralisia Periódica Tirotóxica (PPT) é uma condição clínica que se caracteriza por crises reversíveis de fraqueza muscular, associadas à tirotoxicose e hipocalcemia. A fisiopatologia da PPT ainda não está esclarecida, porém evidências sugerem que a PPT resulta de uma combinação de três fatores: ambientais, genéticos e tirotoxicose, sendo esse último imprescindível para a crise. Normalmente as crises ocorrem de madrugada ou no início da manhã, após refeições copiosas ou ricas em carboidrato, ingestão abusiva de álcool, descanso depois de exercício extenuante, com frequente recuperação antes de 72 horas. Hoje sabemos que a PPT é a mais nova forma de canalopatia endócrina a fazer parte do grande grupo de paralisias periódicas e quatro diferentes mutações foram identificadas num novo gene Kir parálogo nomeado como KCNJ18 (canal Kir2.6) e estão presentes em 33% dos pacientes [Cell 140(1):88, 2010]. Recentemente nosso grupo identificou duas mutações ainda não descritas na literatura.

Objetivos:

Estudar como as variações genéticas e novas mutações relacionadas à PPT afetam o mecanismo de gating do canal Kir2.6.

Metodos:

Após extração do DNA genômico leucocitário de pacientes com PPT, o canal Kir2.6 foi amplificado por reação em cadeia da polimerase e suas variações foram clonados em vetores plasmidiais de expressão em mamíferos e transfectados em células da linhagem HEK293T para posterior estudo eletrofisiológico. Os registros eletrofisiológicos foram obtidos 24-72 horas após a transfecção dos vetores, através do método whole-cell patch-clamp em modo de `clampeamento` de voltagem (voltage-clamp).

Resultados:

As medidas eletrofisiológicas demonstraram alterações na densidade de corrente entre o canal Kir2.6 selvagem (WT) (n=13) e os mutantes (n=9 para cada). No potencial de comando de maior relevância (-100mV), a média da corrente normalizada pela capacitância das células para o canal WT foi de -213 pA/pF, com e o erro padrão de 11 pA/pF, enquanto que para um dos mutantes, a

média foi de -356 pA/pF, com o erro padrão de 16 pA/pF. Além disso, durante nossas investigações por mutações em novos pacientes descobrimos que todos os sinapomorfismos (SNPs) conhecidos e anteriormente atribuídos ao canal Kir2.2 (gene KCNJ12), bem como as mutações já descritas em Kir2.6 estão presentes num mesmo alelo. No entanto, esse alelo difere em quatro aminoácidos do WT utilizado no presente estudo e idêntico à referência para Kir2.6 depositada no banco de sequências gênicas do NCBI.

Conclusão:

As alterações na densidade de corrente observadas poderiam ser fatores pertinentes para o esclarecimento dos eventos moleculares desencadeadores da fisiopatologia PPT. Ademais, este é o primeiro estudo que identifica os dois haplótipos de Kir2.6 – possivelmente os mais frequentes na população brasileira – e propõe uma avaliação eletrofisiológica individualizada para cada haplótipo.

Apoio Financeiro:

As alterações na densidade de corrente observadas poderiam ser fatores pertinentes para o esclarecimento dos eventos moleculares desencadeadores da fisiopatologia PPT. Ademais, este é o primeiro estudo que identifica os dois haplótipos de Kir2.6 – possivelmente os mais frequentes na população brasileira – e propõe uma avaliação eletrofisiológica individualizada para cada haplótipo.

Comitê de Ética:

CEP UNIFESP Nº 0940/11

10.018 XIAP-BIR3 domain: A thermodynamic and structural analysis of its inhibition by Smac/DIABLO mimetic compounds.

SANTOS, R. B., Oliveira, A. C. , SOUZA, T. L. F.,

Fármacos e Medicamentos - UFRJ

Bioquímica Médica - UFRJ

Introducao:

The resistance to cell death is generated in cancer cells, in many cases, due to the overexpression of IAPs family proteins (Inhibitor of Apoptosis Proteins), and among them XIAP is the most described and is greatly effective in apoptosis inhibition. Among the four domains of the XIAP structure, the BIR3 domain (XIAP-BIR3) is an important inhibitor of initiator caspases in apoptosis. In order to maintain cellular homeostasis, one protein named Smac/DIABLO can inhibit the XIAP-BIR3 endogenously from the interaction of its N-terminal tetrapeptide (AVPI). In cancer cells, Smac/DIABLO becomes inefficient due to overexpression of the IAPs, and the cell becomes insensitive to apoptosis. Therefore, Smac peptidomimetics have been proposed as drug candidates since are able to sensitize cells to death, what promotes better efficiency of usual treatments.

Objetivos:

In this work we performed a structural and thermodynamic analysis of the interaction between XIAP-BIR3 and different Smac/DIABLO peptidomimetics, for a better understanding of its inhibition mechanism. Compounds with structural similarities but with different activities were selected.

Metodos:

For this study, the XIAP-BIR3 domain was obtained through of its recombinant expression in *E. coli* and subsequent purification by affinity and molecular exclusion chromatography. We obtained a high degree of purity that was confirmed by SDS -PAGE. Circular dichroism (CD), fluorescence spectroscopy and isothermal titration calorimetry (ITC) were used to the structural and thermodynamic analyses.

Resultados:

Our fluorescence data showed that the domain alone has a high stability and that the chemical denaturation process occurs in two transitions, while the denaturation of the protein-ligand complex appear be a two-state transition. Additionally, we showed that the degree of domain stabilization was directly proportional to the affinity of the compound. The CD data showed a great change in the secondary structure of the domain in the presence of the compounds when compared to the spectrum of the free domain. ITC data revealed that the different compounds interact with favorable entropy and enthalpy but with different thermodynamic profiles.

Conclusão:

In conclusion, our data indicates that the thermodynamics changes of the interaction can be associated to the changes of BIR3-XIAP structure, what is a critical information to understanding of the gain or loss of affinity of a candidate to the IAP inhibitor.

Apoio Financeiro:

In conclusion, our data indicates that the thermodynamics changes of the interaction can be associated to the changes of BIR3-XIAP structure, what is a critical information to understanding of the gain or loss of affinity of a candidate to the IAP inhibitor.

Comitê de Ética:

Não realizo experimentação com animais ou humanos.

10.019 Efeito do estresse alcalino na resistência de *Saccharomyces cerevisiae* a antifúngicos utilizados na prática clínica

Lopes, K. A. , Vieira, A. N. , Ribeiro, M. G. L. ,
Departamento de Biologia Celular e Molecular - UFF

Introducao:

O pH é um importante fator que implica diretamente nas condições de crescimento de leveduras e até mesmo pequenas mudanças podem desencadear alterações em muitas funções celulares. Já foi demonstrado que *S. cerevisiae* cresce muito melhor em pH ácido e diferentes estudos demonstraram um conjunto de genes que são induzidos durante a resposta transcricional ao estresse alcalino, dentre os quais vários genes envolvidos no metabolismo de cobre e ferro (J. Biol. Chem. 279: 19698, 2004). O cobre é um elemento de transição indispensável a muitos organismos, atuando como cofator para diversas enzimas. Diversos mecanismos estão envolvidos na manutenção da sua homeostasia intracelular. A ATPase transportadora de cobre (Ccc2) desempenha um papel fundamental devido ao fato de transportar o Cu(I) para dentro das vesículas do trans-Golgi, onde estão localizadas as cuproproteínas recém-sintetizadas. Diversos trabalhos evidenciam a relação do cobre com o caráter virulento de alguns microorganismos (Rev. Microbiol. 60, 69–105, 2006), e mesmo *S. cerevisiae* não sendo considerada uma levedura patogênica e fazendo parte da microbiota normal da mucosa do trato gastrointestinal e respiratório, na últimas décadas a incidência de infecções pela levedura têm aumentado de forma considerável, principalmente em indivíduos imunocomprometidos (Rev. Iberoam. Micol. 30:205,2013).

Objetivos:

Submeter cepas de *S. cerevisiae* contendo variantes do gene CCC2 a diferentes valores de pH extracelular para se estudar o seu crescimento em presença dos antifúngicos fluconazol, fluorocitocina, e anfotericina-B.

Metodos:

Cepas de *S. cerevisiae* W303a onde o gene CCC2 foi truncado foram transformadas com plasmídeos contendo o gene CCC2 ou seus mutantes D627A (onde há a substituição D627A que impede a fosforilação catalítica e torna a enzima não-funcional), ΔNter (que não possui a região N-terminal, onde estão localizados os domínios de ligação de cobre ou MBDs) ou ΔMBD, que possui uma deleção nos dois MBDs. Para a detecção de sensibilidade antifúngica pelo método de disco-difusão as células foram mantidas em crescimento em meio líquido YD overnight a 200 rpm. Após o crescimento, 2×10^7 células foram aplicadas ao meio YD

sólido nos valores de pH 4,5 (sem ajuste) e 8,0 (ajustado com tampão MOPS 50 mM). Em seguida, os discos antifúngicos (1 µg, Bio-Rad Laboratories, Inc.) foram cuidadosamente assentados de forma equidistante sobre o meio com o auxílio de uma pinça estéril. O crescimento foi monitorado em estufa a 30° por 72h.

Resultados:

Os resultados preliminares demonstram que todas as cepas de *S. cerevisiae* estudadas possuem uma maior sensibilidade aos antifúngicos em pH 8, onde o halo de inibição dos antifúngicos tem um aumento significativo quando comparado ao pH 4,5. É possível observar também que todas as cepas obtiveram uma maior resistência aos discos antifúngicos de 5-fluorocitocina.

Conclusão:

Os resultados indicam que as alterações provocadas pelo estresse alcalino levam a uma diminuição da resistência a (pelo menos alguns) antifúngicos. Nas condições estudadas, Ccc2 não parece ter um papel na resistência aos antifúngicos testados, no entanto novos ensaios devem ser realizados em condições em que a atividade Cu(I)-ATPásica seja essencial, i. e., em condições limitantes de cobre e ferro.

Apoio Financeiro:

Os resultados indicam que as alterações provocadas pelo estresse alcalino levam a uma diminuição da resistência a (pelo menos alguns) antifúngicos. Nas condições estudadas, Ccc2 não parece ter um papel na resistência aos antifúngicos testados, no entanto novos ensaios devem ser realizados em condições em que a atividade Cu(I)-ATPásica seja essencial, i. e., em condições limitantes de cobre e ferro.

Comitê de Ética:

O trabalho envolve o uso de microorganismos.

10.020 PAPEL DO RECEPTOR NUCLEAR PPAR γ ; NA ATIVAÇÃO DE LEUCÓCITOS PLEURAIS DE CAMUNDONGOS INFECTADOS POR *Mycobacterium bovis* BCG.

Abreu, H. C. M. , Vieira, W. V. , Freitas, M. A. B. , Oliveira, M. P. G. , Roque, N. R. , Martins, R. S. ,
Bozza, P. T. , Almeida, P. E. ,
Departamento de Biologia - UFJF
Laboratório de Imunofarmacologia - IOC

Introducao:

Segundo a Organização Mundial de Saúde a tuberculose constitui importante causa de morte no mundo sendo considerada Emergência Global de Saúde Pública. Possui patogenia complexa e os aspectos das interações celulares e moleculares entre micobactérias e células hospedeiras não se encontram totalmente esclarecidos. Vários trabalhos têm caracterizado a participação de receptores nucleares envolvidos no metabolismo lipídico, como os PPARs, durante processos inflamatórios. Dados de nosso grupo demonstraram que a infecção de macrófagos por *M. bovis* BCG altera significativamente os níveis de expressão de PPAR γ ; e sugere a participação deste nas vias de sinalização intracelular durante a infecção por BCG in vitro, mas o verdadeiro papel deste fator transcricional na ativação de leucócitos permanece desconhecido.

Objetivos:

Neste estudo pretendemos avaliar a importância do PPAR γ ; durante a infecção por *M. bovis* BCG in vivo, avaliando seu papel no recrutamento celular, síntese de citocinas e capacidade fagocítica de macrófagos e neutrófilos, bem como seu papel na formação de corpúsculos lipídicos.

Metodos:

Foram utilizados camundongos C57Bl/6 machos adultos, aprovado pelo comitê de ética/UFJF (CEEA 078/2012). Os animais foram pré-tratados intra toracicamente com GW9662 (antagonista de PPAR γ) ou veículo 30 min antes da infecção por *M. bovis* BCG. Após 24 h os animais foram eutanasiados para obtenção da suspensão celular. As células obtidas foram contadas em câmara de Neubauer e citocentrifugadas para a contagem diferencial de leucócitos e contagem de corpúsculos lipídicos. Os níveis de KC foram analisados no sobrenadante, através do método de ELISA. Para avaliar a fagocitose do BCG em modelo de pleurisia murino, o BCG foi marcado utilizando-se o kit de viabilidade celular `LIVE/DEAD`. As análises estatísticas foram feitas com o teste não paramétrico ANOVA seguido por teste t-Student.

Resultados:

Para avaliar o efeito do PPAR γ sobre a migração celular, os animais foram pré-tratados com

GW9662 e posteriormente infectados com BCG. Foi observado que a infecção por BCG induziu a migração de mononucleares no tempo de 24 h e o tratamento com GW não interferiu na migração destas células durante a infecção (de 5.948 ± 1.881 para 7.283 ± 1.861 ; $n=5$). Mas o pré-tratamento com GW, apresentou um perfil inibitório na migração de neutrófilos durante a infecção (de 4.328 ± 1.336 para 2.486 ± 0.6754 ; $n=5$). Na análise da produção KC foi observado uma inibição na produção desta quimiocina nos animais tratados e infectados por BCG, quando comparados aos leucócitos dos animais infectados somente. Além disso, foi verificado que o pré-tratamento com o GW também inibiu significativamente a formação de corpúsculos lipídicos durante a infecção por BCG in vivo, após 24 h de infecção (de 4.300 ± 0.9300 para 0.4900 ± 0.3933 ; $n=5$). Além disso, avaliou-se a capacidade fagocítica dos leucócitos e foi demonstrado uma significativa redução no índice de fagocitose tanto de neutrófilos, quanto de macrófagos nos animais que receberam pré-tratamento com GW9662.

Conclusão:

Nossos resultados sugerem que o PPAR γ ; pode estar envolvido em vias de sinalização celular que contribuam com recrutamento de neutrófilos, formação de corpúsculos lipídicos e a fagocitose de bactérias patogênicas in vivo.

Apoio Financeiro:

Nossos resultados sugerem que o PPAR γ ; pode estar envolvido em vias de sinalização celular que contribuam com recrutamento de neutrófilos, formação de corpúsculos lipídicos e a fagocitose de bactérias patogênicas in vivo.

Comitê de Ética:

Protocolo número 078/2012 - CE

10.021 AVALIAÇÃO DO CONTEÚDO LIPÍDICO ERITROCITÁRIO, PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA E FRAGILIDADE OSMÓTICA EM PACIENTES COM CÂNCER DE CABEÇA E PESCOÇO

Goncalves, B. S. , Colodette, N. M. , Soares, J. M. A. , Santos, H. B. , Muniz, L. , Ribeiro, R. I. M. A. , Cortes, V. F. , Barbosa, L. A. O., Chaves, A. , Santos, H. L. ,
Laboratório de Bioquímica Celular - UFSJ
2. Grupo de Pesquisa em Câncer de Cabeça e Pescoço, - UFSJ

Introducao:

O envolvimento da peroxidação lipídica induzida por radicais livres e o papel dos antioxidantes na carcinogênese estão bem estabelecidos. Os subprodutos da peroxidação lipídica têm sido mostrados como causador de alterações na organização estrutural da membrana celular, incluindo diminuição da fluidez membranar, aumento da permeabilidade, inativação de enzimas ligadas a membrana, perda de ácidos graxos essenciais à membrana e possível lise dessas células.

Objetivos:

O objetivo deste trabalho foi investigar a integridade estrutural de eritrócitos de pacientes com câncer de cabeça e pescoço observando possíveis alterações lipídicas ocorridas na membrana, examinando concentrações de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), alterações do conteúdo total de fosfolídeos e colesterol.

Metodos:

As amostras neste estudo foram constituídas por indivíduos portadores de câncer de cabeça e pescoço (n=6), da unidade oncológica do Hospital São João de Deus/ Fundação Geraldo Correia, Divinópolis, MG. Amostras controles foram empregadas usando sangue de pessoas saudáveis, mesmo sexo e faixa etária das amostras de indivíduos com câncer. O projeto teve aprovação do Comitê de ética em pesquisa da UFSJ (ANS 408514) e os envolvidos na pesquisa receberam e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido. Foi realizada a extração dos lipídios das membranas eritrocitárias das amostras dos pacientes em estudo, e posterior dosagem do fosfato inorgânico liberado pela hidrólise total dos fosfolídeos, quantificação de colesterol total presente nestas membranas e a identificação e análise dos principais fosfolídeos constituintes (análise densitométrica e estatística por meio do programa GraphPadPrism® 5). Realizaram-se ensaios de fragilidade osmótica e determinação de peroxidação lipídica (TBARS).

Resultados:

Inicialmente observou-se um aumento na fragilidade osmótica nos indivíduos com câncer de cabeça e pescoço quando comparado com o grupo controle. Constatou-se uma diminuição estatisticamente significativa do conteúdo de fosfolídeos totais do grupo tumor (0.61 ± 0.08 nmol

Pi/ μ L), em comparação ao grupo controle (1.41 ± 0.11 nmol Pi/ μ L), também houve uma diminuição na concentração de colesterol no grupo tumor (0.55 ± 0.09 μ g/ μ L) em comparação ao grupo controle (1.25 ± 0.20 μ g/ μ L). A liberação de substâncias reativas TBARS utilizando o soro dos pacientes com câncer foi significativamente maior no grupo tumor (0.15 ± 0.016), quando comparados ao grupo controle (0.21 ± 0.014), mostrando alto índice de peroxidação lipídica nestas membranas. Alterações na relação molar de colesterol/fosfolípido foram observadas, sendo esta no grupo controle de 0,823 e nos pacientes com câncer de 1,05.

Conclusão:

Os resultados demonstram aumento da peroxidação lipídica levando a alterações nas concentrações de fosfolípidios e colesterol total, aumento da fragilidade osmótica, possivelmente alterando a permeabilidade da membrana e sua fluidez.

Apoio Financeiro:

Os resultados demonstram aumento da peroxidação lipídica levando a alterações nas concentrações de fosfolípidios e colesterol total, aumento da fragilidade osmótica, possivelmente alterando a permeabilidade da membrana e sua fluidez.

Comitê de Ética:

ANS 408514

10.022 Avaliação do efeito de glicosídeos cardíacos no conteúdo de fosfolipídios de células de carcinoma uterino.

Rezende, M. E. D. , Silva, L. N. D. , Pessoa, M. T. C. , Villar, J. A. F. P. , Grego, S. L. A. , Cortes, V. F. , Barbosa, L. A. O. , Santos, H. L. ,
Laboratório de Bioquímica Celular - UFSJ
Laboratório de Síntese Orgânica - UFSJ

Introdução:

Alguns estudos já demonstraram o efeito antitumoral dos glicosídeos cardíacos, entretanto pouco se sabe sobre mecanismo de ação envolvido nesse efeito. Uma via importante que pode modular as funções intracelulares é o conteúdo lipídico da membrana celular. Portanto faz-se necessário investigar se a modulação dos lipídios de células tumorais pode ser um dos possíveis mecanismos de ação dos efeitos antitumorais dos glicosídeos cardíacos.

Objetivos:

Verificar a modulação do perfil lipídico de células de carcinoma de colo uterino causado por glicosídeos cardíacos.

Metodos:

Células HeLa (carcinoma uterino) foram cultivadas até atingirem a confluência e tratadas com doses crescentes de digoxina (150nM e 1 μ M) e 21-benzilideno digoxina (21-BD) (5 e 50 μ M) por 48h. Após o tratamento as células foram extraídas com PBS e homogeneizadas. O homogenato total foi utilizado para extração lipídica com isopropanol/clorofórmio (3:1) e o extrato lipídico foi utilizado para identificação e análise dos lipídios da membrana. A dosagem de fosfolipídios totais foi realizada pelo método descrito por Chen (Anal. Chem.28:1756,1956). Foram realizados três experimentos independentes (n=3). A análise estatística dos resultados foi realizada utilizando o programa GraphPad Prism 5 e empregada análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de Tukey. As análises foram realizadas considerando 95% de significância e p-valor < 0,05.

Resultados:

Observou-se uma diminuição significativa de 42 % no conteúdo de fosfolipídios totais das células tratadas com 1 μ M de digoxina (0,11 \pm 0,039 nmolPi/ μ L) em relação ao controle (0,19 \pm 0,033 nmolPi/ μ L). O tratamento das células com 150nM de digoxina e com 5 μ M e 50 μ M de 21-BD não causaram alteração significativa no conteúdo de fosfolipídios totais em relação ao controle (Digoxina 150nM = 0,15 \pm 0,034 nmolPi/ μ L; 21-BD 5 μ M = 0,22 \pm 0,066 nmolPi/ μ L; 21-BD 50 μ M = 0,21 \pm 0,050 nmolPi/ μ L).

Conclusão:

A modulação do conteúdo lipídico, demonstrada pela diminuição do conteúdo de fosfolípidios totais das células tratadas com 1 μ M de digoxina, pode ser uma possível via para explicar o mecanismo de ação envolvido no efeito antitumoral da droga sobre essa linhagem celular, uma vez que a estrutura da caveola já foi demonstrada como importante para a ação molecular dessa classe de compostos. Estudos mais completos envolvendo dosagem de colesterol e identificação e quantificação dos principais fosfolípidios, por exemplo, devem ser realizados para elucidação total do efeito da digoxina na modulação dos lipídios da membrana plasmática.

Apoio Financeiro:

A modulação do conteúdo lipídico, demonstrada pela diminuição do conteúdo de fosfolípidios totais das células tratadas com 1 μ M de digoxina, pode ser uma possível via para explicar o mecanismo de ação envolvido no efeito antitumoral da droga sobre essa linhagem celular, uma vez que a estrutura da caveola já foi demonstrada como importante para a ação molecular dessa classe de compostos. Estudos mais completos envolvendo dosagem de colesterol e identificação e quantificação dos principais fosfolípidios, por exemplo, devem ser realizados para elucidação total do efeito da digoxina na modulação dos lipídios da membrana plasmática.

Comitê de Ética:

Cultura de Células.

OUABAIN TREATMENT ALTER THE MEMBRANE LIPID PROFILE OF RAT HIPPOCAMPUS

Braga, I. O. , Garcia, I. J. P. , Kinishita, P. F. , Scavone, C., Barbosa, L. A. O. , Cortes, V. F., Santos, H. L. ,

Laboratory of Cellular Biochemistry - UFSJ - CCO
Department of Pharmacology - USP - SP

Introducao:

Ouabain is a cardiotonic steroid that have endogenous production and was found in subnanomolar concentrations in the cerebrospinal fluid of rats. But, it's importance to the CNS is still not clearly understood (Nat Clin Pract Nephrol 4:378,2008). At low concentrations, ouabain plus kainic acid show an antiapoptotic effect (J. Pharmacol. Exp. Ther. 343:596,2012). Antiapoptotic and neuroprotective effects with low ouabain and digoxin concentrations leads the maintaining of the viability of the majority of cortical neurons due a neurotoxic stress (Neuroscience. 137: 133, 2006).

Objetivos:

The aim of this study is to evaluate the alterations of the membrane lipid content after ouabain treatment with two different doses.

Metodos:

Adult male Wistar rats were separated into four groups that received the administration of: group 1. ouabain (0.18 mg/kg) (n=6), group 2.saline (SAL) (n=6) and group 3.ouabain (1.8 mg/kg). After the treatments, animals were sacrificed after 2 hours and the samples of the hippocampus was collected for analysis of: protein concentration by Hartree methods (Analyt.Biochem. 48:422,1972); extraction and quantification of phospholipids by Higgins (Oxford.1:104,1987) and Chen et al. (Anal. Chem.28:1756,1956) methods; content total cholesterol by the method of Higgins (Oxford.1:104,1987). The statistical analysis was performed using GaphPad Prism 5 program, expressing the values as mean \pm standard deviations and subjected to analysis of variance (ANOVA), followed by post- test Turkey.

Resultados:

The results demonstrate that 1.8 mg/kg ouabain treatment caused a significant increase in

cholesterol content (2.50 ± 0.31 nmol/ μ l*10) when compared with control group (1.23 ± 0.18 nmol/ μ l*10). The 0.18 mg/kg ouabain treatment (a tenfold lower concentration) did not caused significant difference in cholesterol content compared to the control group. The total phospholipids quantification showed that only 1.8 mg/Kg ouabain treatment caused a significant increase of phospholipids levels (3.76 ± 0.96 nmol/ μ l*10) when compared to the control group (1.81 ± 0.21 nmol/ μ l*10), and 0.18 mg/kg ouabain treatment was not able to provoke changes in phospholipids content (1.88 ± 0.22 nmol/ μ l*10).

Conclusão:

Could be concluded that ouabain in a concentration of 1.8 mg/kg was able to cause a change in lipid formation in the rat hippocampus, and lower concentration compatible with endogenous production of ouabain was not involved in modulation of the neuron plasma membrane lipid profile.

Apoio Financeiro:

Could be concluded that ouabain in a concentration of 1.8 mg/kg was able to cause a change in lipid formation in the rat hippocampus, and lower concentration compatible with endogenous production of ouabain was not involved in modulation of the neuron plasma membrane lipid profile.

Comitê de Ética:

No 77 on pages. 72 book 02 app

10.024 Alpha-adrenergic agonists modulate nociceptive ion channels in dorsal root ganglia neurons.

Silveira, N. A. , Kushmerick, C. , Naves, L. A. ,
Fisiologia e Biofisica - UFMG

Introducao:

Sympathetic stimulation is frequently associated with neuropathic pain. One of the causes of neuropathic pain is changes in the channel properties of the dorsal root ganglia (DRG) cells, the first order sensorial neurons. Some ion channels, like the vanilloid receptors (TRPV1), acid sensing ion channels (ASIC) and ATP receptors (P2X), which are expressed in DRG neurons, are known to be nociceptive transducing molecules, a property that allows nociceptors to transform noxious chemical stimuli into propagated electrical signals. Besides nociceptive molecules, DRG neurons also present adrenergic receptors, which can change their excitability.

Objetivos:

In this work, we searched for modulation of TRPV1, P2X and ASIC, and for changes in neuronal excitability, by alpha-adrenergic agonists.

Metodos:

Experiments were performed using dissociated DRG cells from male rats weighing 220-280 g. $1 \mu\text{M}$ phenylephrine, an alpha-1 agonist, or $10 \mu\text{M}$ clonidine, an alpha-2 agonist, were applied to separate cultures, soon after plating and throughout the four days of experiments. Control cells received only vehicle. Recordings were done at room temperature in the absence of the adrenergic agonists. Ionic currents were measured using the whole cell configuration of the patch clamp technique. We used the current clamp mode to record the minimal current necessary to evoke action potentials. Ligand gated currents were evoked by fast application of $3 \mu\text{M}$ capsaicin (activating TRPV1), pH 7 or 6 (ASIC currents) or $50 \mu\text{M}$ ATP (P2X currents). ATP currents were separated into P2X₃-like and P2X-non₃ according to their kinetics.

Resultados:

TRPV1, ASIC and P2X current density did not change during the four days of the experiments. Treatment with phenylephrine increased P2X-non₃ currents from $-21 \pm 6,3 \text{ pA/PF}$ (n=11) to $51 \pm 10,9 \text{ pA/PF}$ (n=14) ($p < 0,05$, Student t test). In neurons that expressed ASIC currents, phenylephrine increased current threshold from $4.4 \pm 0.9 \text{ pA/pF}$ to $8.6 \pm 1.8 \text{ pA/pF}$ ($p < 0.05$, Student t test). Clonidine reduced the density of capsaicin currents from $-210 \pm 26 \text{ pA/pF}$, n=46, to $-137 \pm 28 \text{ pA/PF}$, n=38, although this difference was not statistically significant. Neither phenylephrine nor clonidine altered the density of ASIC currents.

Conclusão:

Our results show that adrenergic agonists change nociceptive transduction molecules activity and the excitability of ASIC-positive DRG neurons . This suggests that the adrenergic system may affect neuropathic pain by changes in nociceptive channels, and that ASIC positive neurons express specific voltage activated channels modulated by alpha1 agonist.

Apoio Financeiro:

Our results show that adrenergic agonists change nociceptive transduction molecules activity and the excitability of ASIC-positive DRG neurons . This suggests that the adrenergic system may affect neuropathic pain by changes in nociceptive channels, and that ASIC positive neurons express specific voltage activated channels modulated by alpha1 agonist.

Comitê de Ética:

Protocol 169/2011.

10.025 B-FABP E SUAS INTERAÇÕES COM MODELOS DE MEMBRANAS

Borba, B. P. , Filho, A. J. C. ,
Departamento de Física - USP

Introdução:

FABP (fatty acid binding protein) é uma proteína ligante de ácido graxo, membro de uma família de proteínas citoplasmáticas pequenas (14 – 16 kDa), com diversas funções, especialmente no transporte de ácidos graxos e lipídeos. A principal função das FABPs é ligar reversivelmente e transportar ligantes hidrofóbicos como ácidos graxos saturados e insaturados de cadeia longa, que fazem parte de um complexo balanço de processos como armazenamento de energia, expressão gênica, crescimento celular, síntese de membranas, respostas inflamatórias e metabólicas, atividade de canais iônicos e receptores, assim como podem modificar a estrutura de proteínas e membranas. Também são capazes de interagir com receptores da família PPAR (peroxisome proliferator-activated receptor), regulando sua expressão gênica.

Objetivos:

Os objetivos deste trabalho são expressar e purificar a proteína e observar sua interação com modelos de membrana através de medidas de ressonância magnética eletrônica (RME), assim como verificar a estrutura da proteína através de medidas de dicroísmo circular (CD), assim obtendo informações acerca de seu mecanismo de entrega da molécula de ácido graxo.

Metodos:

A proteína foi expressa em células de *E. coli*, na presença dos antibióticos Kanamicina e Cloranfenicol. As células foram rompidas por sonicação, seguidas de um processo de renovelamento através de diálise. A purificação foi feita em coluna de Ni-NTA por cromatografia de exclusão, e então concentrada em sistema Millipore. Prosseguiram-se os experimentos de RME e de CD na presença e na ausência de lipossomos constituídos pelo fosfolípideo POPC.

Resultados:

A proteína foi obtida em concentração (100 μ M) suficiente para a realização dos experimentos de RME, assim como sua pureza foi satisfatória. Os espectros de CD confirmaram a estrutura majoritariamente de folha- β ; da proteína. Os experimentos de RME utilizando sondas magnéticas introduzidas no mimético de membrana não evidenciaram grandes alterações. Mutantes da proteína em que a sonda foi inserida na região de contato com a membrana, entretanto, mostram mudanças consistentes com interação.

Conclusão:

A proteína está com pureza satisfatória, mas podemos tentar readequação do protocolo para melhorar a sua concentração, assim como podemos testar a interação com membranas usando outros lipídeos. Além disso, as mudanças espectrais observadas nos espectros de RME serão utilizadas para o entendimento do processo de docking da proteína na membrana.

Apoio Financeiro:

A proteína está com pureza satisfatória, mas podemos tentar readequação do protocolo para melhorar a sua concentração, assim como podemos testar a interação com membranas usando outros lipídeos. Além disso, as mudanças espectrais observadas nos espectros de RME serão utilizadas para o entendimento do processo de docking da proteína na membrana.

Comitê de Ética:

Não são usados animais ou humanos para a realização dos experimentos, já que estes são feitos com bactérias.

10.026 Store-operated channels and Ca²⁺ influx in mice Leydig cells.

Dagostin, A. L. A. , Varanda, W. A. ,

Fisiologia - FMRP-USP

Introducao:

Cellular calcium homeostasis and calcium signaling are very close processes, the ion's concentration in the cytoplasm must be tightly controlled and the endoplasmic reticulum (ER) plays an important role as calcium storage within the cells. Depletion of this storage activates the so called store-operated channels (SOCs), which leads to an inward Ca²⁺ current that helps to replenish the ER with extracellular calcium. In Leydig cells, fine intracellular Ca²⁺ concentration is necessary in order to maintain proper testosterone production. Since different mechanisms such as purinergic receptors, T-type Ca²⁺ channels, and intracellular Ca²⁺ mobilization from endoplasmic reticulum (through ryanodine and IP3 receptors) act to regulate intracellular Ca²⁺ concentration, SOCs may be yet another component in this system.

Objetivos:

Investigate the intracellular calcium dynamics in mouse Leydig cells after endoplasmic reticulum depletion.

Metodos:

Leydig cells were harvested through mechanical dispersion from 4 to 6 week old swiss mice's testicles and seeded in coverslips. Before recording, the cells were kept in a medium containing (in mM): NaCl (140), KCl (4.6), Glucose (10), HEPES (10), NaHCO₃ (5), CaCl₂ (1.6), MgCl₂ (1.13) ~300 mOsm/kgH₂O and pH 7.4. For recording, we used the patch clamp technique in whole-cell configuration and voltage-clamp mode. The bathing solution used for recording contained (in mM): NaCl (140), KCl (3), MgCl₂(2), Glucose (10), CaCl₂ (2), CsCl (10), HEPES (10) ~300 mOsm/kgH₂O and pH 7.4. To achieve the intracellular calcium stores depletion, thapsigargin (4μM) and IP₃(60μM) were added to the pipette solution, which contained no calcium and caesium methanesulfonate as main ion. Its resistance ranged from 2.5 to 4 MΩ when filled. The recording protocol consisted of a 400ms voltage ramp (from -130mV to -70mV), acquired at 10KHz and filtered at 2kHz. Hardware consisted of an inverted microscope (Nikkon), an ITC-16 AD-DA board (Instrutech) and a Axopatch 200B amplifier (Axon Instruments). Drugs were applied directly over the cells via pressure-driven direct perfusion.

Resultados:

Here, we demonstrate that ER depletion after SERCA blocking by addition of thapsigargin (4 μM) to the pipette solution during patch clamp recording elicits an inward current upon membrane

hyperpolarization. It is seen after we apply a ramp protocol (-130 to 70 mV in 400ms) and the rectification profile is shown. It has a current density of 5.3 ± 1.0 pA/pF (at -130mV) and a time constant of 84.0 ± 4.9 ms, consistent with a SOC current profile. It has been described that high concentrations of the lanthanide gadolinium block this SOC current. In our experiments, not only 100 μ M Gd³⁺ blocked the inward calcium current, but also high concentrations of 2-APB (400 μ M).

Conclusão:

Taken together, these data shows the existence of a SOC current in Leydig cells which may play a role in steroidogenesis through the regulation of intracellular Ca²⁺ levels.

Apoio Financeiro:

Taken together, these data shows the existence of a SOC current in Leydig cells which may play a role in steroidogenesis through the regulation of intracellular Ca²⁺ levels.

Comitê de Ética:

092/2006

10.027

Interfacial action of Polybia-MP1 peptide in phospholipid membrane

Alvares, D. S. , Ruggiero Neto, J,

Department of Physics - UNESP

Introducao:

The mastoparan peptide, Polybia-MP1, with aminoacid sequence (IDWKKLLDAAKQIL-NH₂), obtained from the venom of the social wasp *Polybia paulista*, is a potent antimicrobial peptide and exhibit antitumor activity on prostate and bladder cancer cell cultures. Its inhibitory effect on cancer cell proliferation is believed to be due to the presence of both PS and PE in the outer leaflet of these cells.

Objetivos:

In this work the impact of this peptide on lipid mixtures of phosphatidylcholine (PC) and phosphatidylserine (PS) was assessed by differential scanning calorimetry (DSC), pressure area isotherms and giant unilamellar vesicles (GUV) visualization by fluorescence microscopy.

Metodos:

Differential scanning calorimetry: Thermograms of multilamellar vesicles (MLVs) at 2.5 mg/ml were obtained with a Nano-DSC calorimeter. Peptide was added either in the hydration of lipid film at a lipid to peptide molar ratio. Compression isotherms of lipid, peptide or premixed lipid-peptide were measured on a Langmuir film balance with a Wilhelmy-plate at 20°C. Using electroformation, GUVs, made of phosphatidylcholine and phosphatidylserine at 70:30 molar ratio and entrapping 200 mM sucrose were obtained.

Resultados:

Thermograms of POPC:DPPS multilamellar vesicles (MLV) in different molar fractions of DPPS showed that the system is miscibility at the composition 7:3. This ratio the mixture undergoes a gel to liquid crystalline transition at 31°C in the absence of peptide. At this composition the peptide induced a decrease of the gel-to-liquid crystalline phase transition temperature suggesting the formation of a phase rich of lipid with lower transition temperature, suggesting that the peptide interacts preferentially with anionic component. The visualization of POPC:POPS GUVs with small fraction of NBD_PE showed by fluorescence microscopy the formation of dense regions that suggest aggregation or lipid segregation. The effect of the peptide co-spread with lipids on compression isotherm of DMPS, POPS, and mixtures POPC:DPPS and DMPC:DMPS showed that the expanded-to-compressed liquid plateau is suppressed giving rise to a second plateau with the increase of the peptide concentration. These results indicate that the peptide interacts preferentially

with PS containing monolayers.

Conclusão:

These different experimental approaches indicate that MP1 induces a phase rich in pure PC and another phase rich in peptide and PS.

Apoio Financeiro:

These different experimental approaches indicate that MP1 induces a phase rich in pure PC and another phase rich in peptide and PS.

Comitê de Ética:

Theses experiments did not involve animals

10.028 FUNCTIONAL ANALYSES OF RSV SH PROTEIN PENTAMERIC STRUCTURE BY BIOINFORMATICS TOOLS AND MOLECULAR DYNAMICS

Araujo, G. C. , Oliveira, R. J. , Araujo, A. S. , Souza, F. P. ,

Física - UNESP

Centro Multiusuário de Inovação Biomolecular - UNESP

Física - UFTM

Introducao:

The human Respiratory Syncytial Virus (hRSV) is the major cause of lower respiratory tract illnesses in children and elderly people worldwide. Its genome encodes 11 proteins including the surface protein F, G and SH which are responsible for entry and distribution of virus in the host cell. Among the surface protein, little is known about the function of SH protein. However, studies shows that presence of SH protein increase de RSV virulence degree and permeability of low molecular weight compounds, sugesting its involvement in the ion channels formation. Knowing their structure and function is fundamental to a better understanding of its mechanism.

Objetivos:

The aim of this study was modeling and caracterizing of the RSV SH protein and analysing the structural behavior in water and phopholipid bilayer environments, for understanding and evaluating the formation and activity of its pentameric structure in cell membrane.

Metodos:

The SH protein model was generated by I-TASSER server and VMD, and its funcional and structural caracteriscts was analyzed by PredictProtein and PsiPred. Molecular Dynimics Simulation were performed by GROMACS for analysis of hidrophobicit of protein central region, studies of the protein behavior in POPC membrane, pentamer formation and its activities.

Resultados:

The SH protein model prediction resulted in a linear model with a helix-alpha between amino acid 20-42 and the analysis performed by PsiPred indicated this region as transmembrane region. Molecular Dynamics Simulation showed that in solution the protein changes its linear conformations for globular conformation confirming the hydrophobicity of the central domain. The presence of the SH protein itself or of the pentamer in bilayer resulted in a decrease of the area per lipid and increased of the order parameter, giving the chains more stability and less mobility and greater alignment. The pentamer simulation showed the calculated free energy barriers for water across the membrane are near 18,2 KJ/mol and 24 KJ/mol, which suggests a transport of water molecules through the pore.

Conclusão:

Based on these results, we proposed the tertiary and quaternary structure of the SH protein and we suggested that the virulence is increased by SH protein once its presence contributes to cell stability resulting an increase in the life time of cell and a grow of viral replication activity.

Apoio Financeiro:

Based on these results, we proposed the tertiary and quaternary structure of the SH protein and we suggested that the virulence is increased by SH protein once its presence contributes to cell stability resulting an increase in the life time of cell and a grow of viral replication activity.

Comitê de Ética:

Nos estudos realizados não foram realizados nenhum tipo de experimentação animal e humana.