

Setor 06. Farmacologia da Inflamação

06.001

EFEITO DO COMPOSTO MV8612 DA *Mandevilla velutina* SOBRE AS RESPOSTAS NOCICEPTIVAS E INFLAMATÓRIAS NO MODELO DE CISTITE HEMORRÁGICA CAUSADA PELA CICLOFOSFAMIDA EM RATOS.

Santos, A. A. Jr.¹; Martins, J. P.¹; Faggiani, F. T.¹; Leal, P. C.²; Calixto, J. B.³; Campos, M. M.⁴; Morrone, F. B.¹ - ¹PUC - RS - Farmácia; ²UFSC - QMC / CFM; ³UFSC - Farmacologia; ⁴PUC - RS - Cirurgia - Odontologia

Introdução: A cistite hemorrágica é um efeito colateral freqüentemente observado em pacientes com alguns tipos de tumores sólidos ou alterações linfoproliferativas que estão sob tratamento com o quimioterápico ciclofosfamida (CYP). Os efeitos urotóxicos da CYP são atribuídos ao metabólito acroleína e podem ser parcialmente prevenidos pelo agente uroprotetor, o ácido 2-mercaptoetanosulfônico (MESNA) (Katz et al., J. Cancer Res. Clin. Oncol., 121, 128, 1995). O presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos antiinflamatórios e anti-nociceptivos do composto MV8612 da *Mandevilla velutina* no modelo de cistite hemorrágica induzida por CYP em ratos, em comparação com o MESNA. **Métodos:** Foram utilizados ratos machos Wistar (N= 6-8 por grupo; 180–200 g). A cistite foi induzida pela injeção intraperitoneal (i.p.) de CYP (100 mg/kg). As respostas nociceptivas foram avaliadas como a soma dos escores para 3 parâmetros comportamentais: grau de fechamento dos olhos, freqüência respiratória e alteração postural, em vários intervalos de tempo após a indução da cistite (15-180 min) (Boucher et al., J. Urol., 164, 203, 2000). Como parâmetros inflamatórios, foram medidos a presença de hemorragia e o peso da bexiga (48 h). **Resultados:** O tratamento com o MESNA (131 µmol/kg, i.p., 3 doses, 0,5 h antes e 4 e 8 h após a aplicação de CYP) foi capaz de reduzir de maneira significativa a presença de hemorragia (62±21 %) e o peso da bexiga (41±5 %) nos animais injetados com CYP. No entanto, o mesmo tratamento não causou alteração significativa da nocicepção induzida pela CYP. Por outro lado, a administração do composto MV8612 (10 µmol/kg, i.p., 0,5 h antes) produziu uma redução marcante das respostas nociceptivas (59±3 %) causadas pela CYP, sem, contudo, alterar significativamente os parâmetros inflamatórios (P > 0.05). **Discussão:** Os resultados apresentados permitem inferir que o composto MV8612 poderia constituir uma alternativa vantajosa para o controle dos efeitos colaterais associados à quimioterapia com CYP, especialmente se utilizado em combinação com o agente uroprotetor MESNA. Estudos adicionais estão sendo realizados a fim de confirmar esta hipótese. **Apoio Financeiro:** CNPq, PRONEX, BPA-PUCRS.

06.002

THE NON-PEPTIDE KININ RECEPTOR ANTAGONISTS FR173657 AND SSR240612: EVIDENCE FOR SKIN INFLAMMATION TREATMENT.

Petrovski, E. F.¹; Otuki, M. F.¹; Regoli, D.²; Pesquero, J. B.³; Zampronio, A. R.¹; Cabrini, D. A.¹ - ¹UFPR - Pharmacology; ²UNIFE - Pharmacology; ³UNIFESP - EPM - Biophysica

Introduction: It is postulated that several stimuli can trigger a cutaneous inflammatory response by directly inducing epidermal keratinocytes to elaborate specific proinflammatory mediators, and among them kinin peptides. The effects of kinin peptides are mediated through interaction with B₁ and B₂ receptors. Therefore, non-peptide kinin antagonists of those receptors with long-lasting efficacy and good bioavailability would be important tools to control cutaneous inflammatory responses.

Methods: Male and female Swiss and double knockout (B₁B₂R^{-/-}) mice (25–35 g) were used. Ears thickness was measured before and 30 min and 1h, after induction of skin inflammation with capsaicin (200 mg/ear) and arachidonic acid (AA) (2 mg/ear), respectively, using a digital micrometer (Great, MT-045B). In Swiss mice, peptide antagonists R-715 (B₁ receptor antagonist, 10-100 nmol/kg, i.p.), HOE140 (HOE, B₂ receptor antagonist, 0,1-100 nmol/kg), and the non-peptide antagonists SSR240612 (SSR, B₁ receptor antagonist, 0,01- 0,3 mg/ear) and FR173657 (FR, B₂ receptor antagonist, 0,03-0,3 mg/ear) topically applied (20 µl in acetone), were administered 10-15 min before the induction of skin inflammation with capsaicin. Effective doses of each antagonist were also tested in AA model. The response of the double knockout (B₁B₂R^{-/-}) mice was evaluated in both skin inflammation models. **Results:** All kinin receptor antagonists caused a significant inhibition of cutaneous neurogenic inflammation in the capsaicin model. The calculated mean ID₅₀ for HOE and SSR was: 23.83 (9.14–62.14) nmol/kg and 0.23 (0.15 – 0.36) mg/ear, respectively. The I_{max} observed for HOE, SSR, R-715 and FR was: 61±5%, 56±3%, 61±10% and 48±8%, respectively. Supporting this result, double knockout mice showed a significant inhibition of capsaicin induced ear edema (42±7%). Also, all kinin receptor antagonists caused a significant inhibition of AA-induced ear edema. However, HOE and R-715 were only capable to inhibit the edema when applied together with inhibition of 36±4%. The calculated I_{max} for SSR and FR in this model was 23±10% and 27±6%, respectively. Moreover, SSR and FR, when applied together, caused a significant inhibition of AA-ear edema with inhibition of 34±12%. In the same way, double knockout mice presented a significant inhibition (21±2%) of AA-induced ear edema. **Discussion:** These results show that the kinin system is present in the skin organization and that the involvement of both kinin receptors, B₁ and B₂, seem to be important in the skin neurogenic inflammation induced by capsaicin and in the AA-induced ear edema. Moreover, non-peptide B₁ and B₂ kinin receptor antagonists, FR and SSR, were very effective in reducing skin inflammation when topically applied suggesting that they could be useful tools in the control of skin inflammatory diseases. **Supported by:** Sanofi-Aventis, Astellas Pharma Inc., CNPq, CAPES, UFPR.

06.003

ASPIRIN-TRIGGERED LIPOXIN A₄ BLOCKS REACTIVE OXYGEN SPECIES GENERATION IN ENDOTHELIAL CELLS: A NOVEL ANTIOXIDATIVE MECHANISM

Nascimento da Silva, V.¹; Arruda, M. A.¹; Barja Fidalgo, T. C.¹; Fierro, I. M.¹ - ¹UERJ - Farmacologia

Introduction: Lipoxins and their aspirin-triggered carbon-15 epimers have emerged as mediators of key events in endogenous anti-inflammation and resolution. However, the implication of these novel lipid mediators on cardiovascular diseases such as hypertension, atherosclerosis, and heart failure has not been investigated. One of the major features shared by these pathological conditions is the increased production of reactive oxygen species (ROS) generated by vascular NAD(P)H oxidase activation. In this study, we have examined whether an aspirin-triggered lipoxin A₄ analog (ATL-1) modulates endothelial cell (EC) NAD(P)H oxidase activity. **Materials and Methods:** HUVEC or ECV 304 were cultured on glass coverslips. Cells were pre-incubated in the absence or in the presence of ATL-1; Boc-2 (100mM) or DPI (10mM) for 15 min at 37°C and exposed to angiotensin II (100nM) for 1h. Reactive oxygen species generation in endothelial cells was assessed by dihydrorhodamine 123 (DHR) and hydroethidine assays. Labeled cells were visualized by fluorescence microscopy and by flow cytometry. Confocal immunofluorescence microscopy was used to detect p47^{phox} translocation. Protein levels were detected by Western blot analysis. The cytochrome c reduction method was used to study the NAD(P)H oxidase activity. **Results:** Pre-treatment of EC with ATL-1 (1-100 nM) completely blocked ROS production triggered by different agents in a concentration-dependent fashion. Furthermore, ATL-1 inhibited the phosphorylation and translocation of the cytoplasmic NAD(P)H oxidase subunit p47^{phox} to the cell membrane in response to Ang-II as well as NAD(P)H oxidase activity. Western blot and immunofluorescence microscopy analyses showed that ATL-1 (100 nM) impaired the redox-sensitive activation of the transcriptional factor NF-κB, a critical step in several events associated to vascular pathologies. **Conclusion:** These results demonstrate that ATL-1 suppresses NAD(P)H oxidase-mediated ROS generation in EC, strongly indicating that lipoxins may play a protective role against the development and progression of cardiovascular diseases. **Supported by:** FAPERJ, CNPq, SR-2/UERJ

06.004

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA DE NANOCÁPSULAS CONTENDO INDOMETACINA OU ÉSTER ETÍLICO DE INDOMETACINA EM UM MODELO DE INFLAMAÇÃO AGUDA EM RATOS

Zilberstein, A. C. C. V.¹; Bernardi, A.²; Jager, E.³; Guterres, S. S.³; Pohlmann, A.⁴; Campos, M. M.⁵; Calixto, J. B.⁶; Morrone, F. B.¹; Battastini, A. M. O.² - ¹PUC - RS - Farmácia; ²UFRGS - Bioquímica; ³UFRGS - Farmácia; ⁴UFRGS - Química; ⁵PUC - RS - Cirurgia - Odontologia; ⁶UFSC - Farmacologia

Introdução: O controle da liberação de fármacos em sítios de ação específicos, através de vetores que permitem a otimização da velocidade de cedência e do regime de dosagem das substâncias, tem sido uma área de intensa pesquisa nos últimos dez anos. Dentre os vetores, estão as nanopartículas, que são sistemas carreadores de fármacos com diâmetro inferior a 1 μm , podendo ser constituídos de polímeros biodegradáveis (Pohlmann et al., Eur. J. Pharm. Sci., 16, 305, 2002). O termo nanopartícula inclui as nanocápsulas, as nanoesferas e as nanoemulsões, as quais diferem entre si segundo a composição e organização estrutural. Tem sido sugerido que antiinflamatórios não-esteroidais (AINEs), como o diclofenaco e a indometacina, na forma de nanocápsulas, podem apresentar maior eficácia, com importante redução nos efeitos adversos (Guterres et al., Pharm. Sci., 11, 229, 2001). O presente estudo teve por objetivo comparar a eficácia antiinflamatória da indometacina e do éster etílico de indometacina em nanocápsulas, com aquela observada para os mesmos fármacos em solução, em um modelo de inflamação aguda em ratos. **Métodos :** As nanocápsulas contendo AINEs foram preparadas pelo método de nanoprecipitação de polímeros biodegradáveis pré-formados (Fessi et al., Int. J. Pharm., 113, r1-r4, 1989). Foram utilizados ratos machos Wistar (N= 5-8 por grupo; 180–200 g). O edema de pata foi induzido pela injeção intraplantar de 100 μl de carragenina (300 μg /pata) e medido em pletismômetro em vários intervalos de tempo. Os resultados são apresentados como a percentagem de inibição em relação à área sob a curva. **Resultados:** O tratamento profilático com indometacina ou éster etílico de indometacina em solução (1 mg/kg, i.p., 30 min antes da carragenina) produziu uma inibição significativa do edema de pata causado pela carragenina (61 \pm 4 % e 61 \pm 7 %, respectivamente), que não foi diferente daquela produzida pela mesma dose dos antiinflamatórios em nanocápsulas (64 \pm 3 % e 52 \pm 7 %). Da mesma forma, o esquema terapêutico de tratamento com indometacina ou éster etílico de indometacina em nanocápsulas (1 mg/kg, i.p., 60 min após a carragenina) causou redução do edema de pata induzido pela carragenina (44 \pm 7 % e 45 \pm 6 %), que não foi significativamente distinta daquela obtida com os fármacos em solução (31 \pm 11 % e 27 \pm 7 %) ($P > 0,05$). **Discussão:** Os resultados apresentados mostram que tanto a indometacina, quanto o éster etílico deste fármaco em nanocápsulas, apresentam eficácia antiinflamatória que é comparável àquela observada para os mesmos fármacos em solução. Mais estudos com modelos crônicos de inflamação são necessários para elucidar a eficácia antiinflamatória destas formulações, bem como buscar uma via de administração mais seletiva com possível aumento do índice terapêutico. **Apoio Financeiro:** CNPq, CAPES, PRONEX, BPA-PUCRS

06.005

EFEITOS ANTIEDEMATOGÊNICOS E ANTIHIPERNOCICEPTIVOS DO PLUMIERÍDEO, UM IRIDÓIDE PRESENTE NA ALLAMANDA CATHARTICA

Bortolini, K. A.¹; Rae, G. A.¹; Malheiros, A.²; Yunes, R.³ - ¹UFSC - Farmacologia; ²UNIVALI - NIQFar / CCS; ³UFSC - QMC / CFM

Introdução: O plumierídeo (PL) é um iridóide isolado das partes aéreas da *Allamanda cathartica* (e outras espécies vegetais) que possui potente atividade anti-edematogênica na inflamação causada por diferentes agentes flogísticos (Bortolini et al.; FeSBE 2005; pg. 79). Mostrou-se também eficaz em inibir a hipernocicepção térmica neuropática induzida pela constrição do nervo infraorbital, demonstrando excelente biodisponibilidade oral (Bortolini et al.; SBFTE 2006; pg. 41). O presente trabalho avalia os efeitos da administração tópica e oral do composto plumierídeo sobre o edema de orelha em ratos e camundongos, bem como sua eficácia em inibir a hipernocicepção mecânica induzida pela injeção i.pl. de CFA em camundongos.

Métodos: Diferentes agentes flogísticos foram administrados por via tópica ou intra-dérmica na orelha direita de camundongos ou ratos, respectivamente, para indução do edema de orelha. O tratamento com o composto PL foi realizado 30 min antes, por via tópica (0,01-1 ug/orelha) ou oral (1 ug/kg). No modelo de hipernocicepção mecânica, camundongos receberam injeção i.pl. de CFA e foram submetidos à estimulação com filamentos de Von Frey, utilizando-se o método de Up and Down e o tratamento com o composto PL (1 ug/kg) se deu por via oral nos dias 1, 6 e 13. **Resultados:** O tratamento tópico com o PL foi efetivo em inibir o edema de orelha induzido por óleo de cróton a 2,5% (20 ul/orelha; 451±26 um), nas doses de 0,01; 0,1 e 1 ug/orelha em 43, 64 e 66% respectivamente. Contra o edema de orelha induzido por ácido araquidônico (2 mg/orelha; 370±46), o tratamento com PL nas doses 0,01; 0,1 e 1 ug/orelha em 62, 52 e 35%, respectivamente. Contra o edema induzido por PGE2 (30 nmol/orelha; 113±24), o tratamento tópico com PL nas doses de 0,01; 0,1 e 1, inibiu em 82, 83 e 85%, respectivamente. Em ratos, a administração oral do PL (1 ug/kg) não alterou o edema de orelha induzido pela injeção intra-dérmica de histamina (200 nmol/orelha; 570±80), serotonina (10 nmol/orelha; 1014±41), substância P (30 nmol/orelha; 976±86) ou PAF (10 nmol/orelha; 762±50), mas reduziu parcialmente aquele causado por Bradicinina (3 nmol/orelha; 929±42) ou C5a (50 nmol/orelha; 508±54) em 30 e 47%, respectivamente. O tratamento oral com PL (1 ug/kg) atenuou a hipernocicepção mecânica induzida pela injeção i.pl. de CFA de modo duradouro (3-4 dias após uma única administração oral). **Conclusão:** Estes resultados nos indicam que o PL apresenta potente atividade inibitória sobre o desenvolvimento da fase aguda da resposta inflamatória a diversos agentes flogísticos, bem como apresenta atividade anti-hipernociceptiva no modelo de dor inflamatória induzida por CFA. Estes resultados sugerem ainda que parte das ações do PL possam decorrer de sua interferência com mecanismos de sinalização celular mediadas por bradicinina, PGE2 e ou C5a. Entretanto, os estudos conduzidos até o momento são ainda insuficientes para esclarecer os verdadeiros alvos de ação deste composto. **Apoio financeiro:** CAPES, PRONEX, CNPq.

06.006

POTENCIAÇÃO DO EFEITO ANTIINFLAMATÓRIO DO CELECOXIBE PELA LATRUNCULINA B

Menezes, G. B.¹; Francischi, J. N.¹ - ¹UFMG - Farmacologia

Introdução: Durante a inflamação, eventos coordenados envolvendo leucócitos e endotélio culminam no recrutamento leucocitário para o tecido. O potencial antiinflamatório dos inibidores de COX-2, em parte promovido pela inibição da migração de leucócitos para o foco inflamatório, já é bem descrito na literatura. Porém, os mecanismos que justifiquem tais efeitos ainda necessitam ser esclarecidos. A forma dessas células, que é regulada pelo citoesqueleto, é importante para o processo de migração, de modo que esses filamentos constituem um alvo farmacológico de estudo. O objetivo deste trabalho foi estudar o efeito da associação entre um inibidor de filamentos de actina (latrunculina B) e um inibidor de COX-2 (celecoxibe) na migração leucocitária induzida por LPS para a cavidade peritoneal de ratos. **Materiais e Métodos:** LPS (*E. coli*, B4:111) foi injetado intraperitonealmente (ip) no tempo zero em ratas Holtzman adultas (140-170g) que foram ½ h antes tratadas com injeções individuais de latrunculina B (LatB; ip), celecoxibe (Cx, sc) ou com associação entre as duas drogas localmente. Animais controle foram injetados com os respectivos veículos. Os leucócitos foram contados sob microscopia ótica. **Resultados e Discussão:** O LPS induziu de maneira dose-dependente um aumento no número de leucócitos, que alcançou valores máximos com a dose de 0,3 µg/animal (C=12.0±1.3; LPS 0.3=19,0±2.5, 6ª hora, ANOVA, p<0.05). O tratamento dos animais com o Cx (6mg/Kg) reduziu significativamente o número de leucócitos no lavado peritoneal, porém tal efeito não foi obtido com a dose de 3mg/Kg. Lat B (0,5-5ng/animal), quando injetada intraperitonealmente, reduziu significativamente o recrutamento leucocitário, sendo que a menor dose (0,05ng/animal) não teve efeito significativo sobre a migração leucocitária induzida pelo LPS. Interessantemente, a associação entre as duas drogas em doses ineficazes sobre a migração leucocitária (Cx, 3mg/Kg e LatB 0,05ng/animal) resultou em efeito inibitório maior sobre o aumento do número de neutrófilos, sendo maior do que a soma individual de cada droga, caracterizando potenciação desse efeito. Nossos dados sugerem que o efeito antiinflamatório promovido pelos inibidores seletivos de COX-2 pode envolver a participação de componentes do citoesqueleto, em especial, dos filamentos de actina **Apoio Financeiro:** CNPq, CAPES e FAPEMIG

06.007

ANTI-SPASMODIC ACTIVITY OF FUKUGETIN, A POLYPRENYLATED BENZOPHENONE OBTAINED FROM *Garcinia brasiliensis*

Teixeira, P. F. D.¹; Coelho, L. P.¹; Silva, P. M. R. e¹; Cordeiro, R. S. B.¹; Santos, M. H.²; Martins, M. A.¹ - ¹FIOCRUZ - IOC - Fisiologia e Farmacodinâmica; ²UNIFENAS - Química

Aim: Synthetic compounds and plant derivatives have been screened in our laboratory in a systematic effort to discover new candidate compounds for the therapeutic control of asthma. This study was undertaken in order to investigate the possible spasmolytic action of fukugetin, a naturally occurring substance isolated from *Garcinia brasiliensis*, using as experimental model the *ex vivo* system of guinea pig trachea contraction.

Methods: Guinea pigs were previously sensitized with ovalbumin in association with Al(OH)₃ and the tracheal rings were mounted in isolated organ bath 14 days later. At the end of the equilibration period, the response to carbachol (2.5 µM) was recorded. After washout of carbachol and re-establishment of stable baseline tone, tissues were exposed to either antigen (ovalbumin, 10⁻⁹ – 10⁻⁴ g/mL), histamine (10⁻⁷-10⁻³ M), carbachol (10⁻⁸-10⁻⁴ M) or 5-HT (10⁻⁸ - 3 x 10⁻⁵ M) in the presence or absence of fukugetin (10⁻⁹ – 10⁻⁴ M). Effect of fukugetin upon calcium cumulative curves (0,01 a 30 mM) in 60 mM-KCl depolarized tissues was also assessed. In all cases, tissues were pre-incubated with fukugetin 15 min before addition of the pro-spasmodic agent, and responses expressed as percentage of 2.5 µM carbachol. **Results:** We found that fukugetin (10⁻⁸ -10⁻⁶ M) did not modify tracheal basal tonus, but induced concentration-dependent relaxation of the epithelium-intact trachea pre-contracted with carbachol. In tracheal denuded epithelium fukugetin did not inhibited the carbachol-evoked smooth muscle contraction. Tracheal contractions induced by antigen, histamine, carbachol or 5-HT were all clearly sensitive to this treatment. Fukugetin also prevented contraction-evoked by cumulative concentrations of Ca²⁺ in depolarized tissues. **Conclusion:** These findings indicate that fukugetin inhibits tracheal smooth muscle contraction induced by immunologic and non-immunologic stimulus. This effect is at least in part accounted for by inhibition of the Ca²⁺ influx through the blockade of voltage-dependent Ca²⁺ channels. **Supported by:** FAPERJ, PAPES and CNPq

06.008

STUDY OF THE ANTI-SPASMODIC EFFECT OF THE LIDOCAINE DERIVATIVE JM25-1 IN THE RAT TRACHEA SYSTEM

Coelho, L. P.¹; Santos, L. P. G.¹; Costa, J. C. S.²; Cordeiro, R. S. B.¹; Silva, P. M. R. e¹; Martins, M. A.¹ - ¹FIOCRUZ - IOC - Fisiologia e Farmacodinâmica; ²FIOCRUZ - IOC - Far-Manguinhos

Background and Aim: The effects of local anesthetic agents in the airways are heterogeneous and complex. Clinical studies show that nebulized lidocaine might be an effective treatment for asthma, but some adverse side effects to this treatment have also been reported. We have recently demonstrated that substitution of the 2,6-dimethyl radicals by the 2-trifluoromethyl group on the benzene ring of lidocaine led to analogues with reduced anesthetic potency, but superior potency relative to lidocaine in preventing anaphylactic tracheal contraction. This work was undertaken in order to investigate the antispasmodic effect of JM25-1, a non fluoride lidocaine analogue, also synthesized for reduced local anesthetic activity. **Methods:** First, the antispasmodic effect of JM25-1 was measured on rat tracheal rings contracted with carbachol (10^{-8} – 10^{-4} M), in segments with intact or mechanically denuded epithelium. Second, the role of beta2-adrenergic, potassium channel, prostanoid and nitric oxide pathways in the protective effect of JM25-1 were examined in preparations pre-contracted with carbachol, in which 1 μ M propranolol, 1 μ M glibenclamide, 10 mM TEA, 1 μ M apamin, 10 μ M indomethacin, 10 μ M SQ22.536 or 100 μ M L-NAME was added to trachea rings 10 min before JM25-1 (1 mM). Third, combinations of JM25-1 (600 μ M) with forskolin (10^{-9} – 10^{-5} M) or dibutyryl cAMP (10^{-6} – 10^{-3} M) pretreatments were performed on epithelium-intact tracheal rings pre-contracted with carbachol or 5-hydroxytryptamine (5-HT) (100 μ M). **Results:** JM25-1 (0,3 mM) inhibited carbachol-induced tracheal contraction in segments with or without epithelium equieffectively. Pretreatment with either propranolol, glibenclamide, TEA or SQ22.536 clearly reduced the JM25-1 protective effect whereas apamin, indomethacin and L-NAME were inactive. JM25-1 (600 μ M) increased the relaxant response to forskolin on the trachea pre-contracted by carbachol but not 5-HT. JM25-1 did not affect the relaxant responses to dibutyryl cAMP in the tracheal rings contracted with carbachol or 5-HT. **Conclusion:** These findings indicate that the anti-spasmodic effect JM25-1 does not require epithelium, NO-GMPc or COX pathways, but seems to be somehow dependent on the b2-adrenoreceptor, ATP-sensitive K(+) channel and cAMP pathways. In addition, since JM25-1 selectively exacerbates the relaxant effect of the adenylyl cyclase activator forskolin on the trachea pre-contracted with carbachol, without altering the dibutyryl cAMP direct relaxing effect, it is likely that at least part of JM25-1 protective effect concerns the blockade of a muscarinic receptor, probably M2. **Supported by:** FAPERJ, PDTIS and CNPq

06.009

AGGRAVATION OF PULMONARY ALLERGIC EOSINOPHIL INFILTRATION IN RATS EXPOSED TO STAPHYLOCOCCAL ENTEROTOXINS TYPE A (SEA).

Mariano, N. S.¹; Desouza, I.¹; Camargo, E.¹; Antunes, E.¹ - ¹UNICAMP - Farmacologia

Introduction: We recently showed that rat airways exposition to SEA evoke a large influx of neutrophils in bronchoalveolar lavage fluid (BAL) by mechanisms involving over-expression of CINC-2, iNOS and COX-2, as well as enhanced production of TNF- α and IL-6. Clinical evidences have showed an association between bacterial organisms and pathogenesis and/or exacerbation of human upper airway diseases, such as bronchial asthma. These studies support the hypothesis that prior exposure to *Staphylococcus aureus* (or to its enterotoxins) exacerbates these allergic diseases. Therefore, this study aimed to investigate the effect of prior exposure with SEA on ovalbumin (OVA)-induced allergic pulmonary inflammation. **Methods and Results:** Male Wistar rats were sensitized by subcutaneous injection of OVA. Fourteen days later, sensitized rats were submitted to intranasal administration of SEA (3 ng) sterile PBS buffer (control group). OVA challenge was performed 4 h after SEA exposure and BAL or bone were collected at 24 h thereafter. Our results showed that the eosinophil counts in BAL from rats primly exposed to SEA was significantly enhanced (250%) after OVA -challenge when compared with animal pre-exposed to PBS (PBS+OVA: 0.41 ± 0.09 eosinophils/mL $\times 10^6$; SEA+OVA: 1.02 ± 0.25 eosinophils/ml $\times 10^6$). No significant differences were found for neutrophils and mononuclear cells. In bone marrow of animal pre-exposed to SEA, an enhancement of mature and imature eosinophils was found, but no differences were found for bone marrow neutrophils. **Conclusions:** Our findings show that airways exposure to SEA leads to exacerbation of pulmonary eosinophil infiltration. The mechanism involved in such exacerbation is under current investigation. **Supported by:** FAPESP

06.010

ANTI-SPASMODIC ACTIVITY OF LASSBIO965, A STRUCTURAL ANALOGUE OF ROLIPRAM®

Cardozo, S. V. S.¹; Coelho, L. P.¹; Teixeira, P. F. D.¹; Silva, P. M. R. e¹; Cordeiro, R. S. B.¹; Lima, L. M.²; Barreiro, E. J.²; Serra, M. F.¹; Martins, M. A.¹ - ¹FIOCRUZ - IOC - Fisiologia e Farmacodinâmica; ²UFRJ - FM - LASSBio

Aim: Rolipram and other PDE4 inhibitors have a broad spectrum of antiinflammatory effects, including blockade of leukocyte trafficking, cytokine and chemokine release. This study was undertaken in order to investigate the possible spasmolytic action of a novel rolipram analogue LASSBio965 using as experimental model the classic *ex vivo* system of isolated rat trachea and barometric plethysmography (WBP) in mice.

Methods: Rats were previously sensitized with 50 µg ovalbumin and the tracheal rings were mounted in isolated organ bath. At the end of the equilibration period, the response to carbachol (2.5 µM) was recorded. After washout of carbachol and re-establishment of stable baseline tone, tissues were exposed to either antigen (ovalbumin, 10⁻⁹-10⁻⁴ g/mL), histamine (10⁻⁷-10⁻³ M), carbachol (10⁻⁸-10⁻⁴ M) or 5-HT (10⁻⁸ - 3 x 10⁻⁵ M) in the presence or absence of LASSBio965 (10⁻⁶-10⁻⁴ M). The preparations were pre-incubated with LASSBio965 10 min before addition of the spasmolytic agents. All responses were expressed as percentage of response to 2.5 µM carbachol. Calcium cumulative concentration-response curves (0.01 a 30 mM) in 60 mM KCl depolarized tissues was also investigated. *In vivo* settings, mice were placed in individual chambers, 1 h and 3 h after oral treatment with either vehicle (0.2% tween 80 in saline), 25; 50 or 100 mg/Kg of LASSBio965. Nonspecific airway responsiveness was measured by exposing awake mice to aerosolized PBS, followed by increasing concentrations of aerosolized metacholine (6, 12 and 25 mg/mL in PBS for 2.5 minutes) using an ultrasonic nebulizer. PenH values were measured for 3 minutes after each aerosol input using the Buxco WBP system. **Results:** We found that LASSBio965 (10⁻⁶-10⁻⁴ M) did not modify the tracheal basal tone, but induced concentration-dependent relaxation responses in rat trachea pre-contracted with 5-HT (10⁻⁴ M). It also inhibited the tracheal contractions evoked by either antigen or 5-HT, but failed to alter contractions evoked by carbachol. LASSBio965 (10⁻⁶-10⁻⁴ M) also inhibited tracheal contraction evoked by cumulative concentrations of Ca²⁺ in depolarized tissues. In contrast, it did not modify bronchial spasm induced by metacholine 1 h and 3 h after treatment of naïve Balb/c mice. **Conclusion:** These findings reveal that LASSBio965 failed to modify the pro-spasmolytic response triggered by cholinergic provocation, but was active against allergen-evoked tracheal contraction, by a mechanism, at least in part, dependent on the blockade of voltage-sensitive calcium channels. An antagonism of 5-HT receptors could also be implicated in the anti-anaphylactic effect of LASSBio 965. **Supported by:** FAPERJ, PDTIS and CNPq

06.011

INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINFLAMATÓRIA DE DERIVADOS N-ACILIDRAZÔNICOS QUINOXALÍNICOS

Mazzeu, E. F.¹; Mendonça Tributino, J. L.¹; Lima, L. M.¹; Fraga, C. A. M.¹; Barreiro, E. J.¹; Monge, A.²; Miranda, A. L. P.¹ - ¹UFRJ - FM - LASSBio; ²Universidad de Navarra - Centro de Investigación en Farmacobiología Aplicada

Introdução: Em trabalho anterior de nosso grupo avaliamos farmacologicamente uma nova série de derivados N-acilidrazônicos (NAH) quinoxalínicos nos modelos de agregação plaquetária, inflamação e analgesia, onde vários destes foram capazes de inibir o edema de pata de rato em mais de 60% (Mazzeu et al, 38º Congresso SBFTE, 2006). O presente estudo consiste no aprofundamento e continuidade da determinação do perfil anti-inflamatório e analgésico dos compostos que apresentaram estes efeitos mais significativos. Foram selecionados 6 derivados da série para a avaliação da atividade anti-hiperalgésica, determinação da potência e investigação do possível mecanismo de ação. **Métodos:** A avaliação da atividade anti-hiperalgésica foi realizada através do ensaio de Placa Quente Modificado (LAVICH, 2005). Os compostos foram administrados por via oral na dose de 100 µmol/kg; o tempo de latência registrado nos tempos de 0,5, 1, 2, 3 e 4 horas. Avaliamos também a capacidade destes derivados inibirem a produção de prostanoídeos, através do ensaio de dosagem de tromboxana B₂ em sangue humano total, estimulado por coagulação ou por LPS, de forma a inferir sobre o perfil de seletividade sobre as isoformas de ciclooxigenase, respectivamente. Foram empregadas as concentrações de 1µM, 10µM e 100µM. **Resultados:** Os compostos testados apresentaram resultados satisfatórios no ensaio de hiperalgesia, dando destaque para LASSBio 1013 que apresentou efeito anti-hiperalgésico desde a primeira hora na ordem de 70% (n=5, *p<0,05). LASSBio 1016 apresentou atividade nos tempos de 2 e 3 horas na ordem de 48% e 77% respectivamente (n=5, *p<0,05). Os compostos testados demonstraram uma inibição da atividade de ambas isoformas da enzima COX. Podemos destacar LASSBio 1013 com uma inibição na ordem de 50% tanto para COX-1 quanto para COX-2 (n=2, *p<0,05). **Conclusões:** Estes resultados demonstram que os compostos apresentam um elevado potencial anti-inflamatório, inibindo a dor associada ao processo, cuja ação parece estar relacionada com a inibição da formação de PGs a partir de ambas isoformas 1 e 2 da enzima Ciclooxigenase. **Apoio Financeiro:** PRONEX, CNPq, FAPERJ E CAPES.

06.012

ESTUDO DA ATIVAÇÃO DE FIBROBLASTOS PULMONARES POR SÍLICA E IL-13 *IN VITRO*

Ramos, T. J. F.¹; Dias, D. F.¹; Perez, S. A. C.¹; Gomes, T. D.¹; Martins, M. A.¹; Silva, P. M. R. e¹ - ¹FIOCRUZ - IOC - Fisiologia e Farmacodinâmica

Introdução: Silicose é uma patologia causada pela inalação e subsequente deposição de cristais de dióxido de silício no pulmão, sendo caracterizada por um intenso e irreversível processo fibrótico. Fibroblastos são células cruciais no contexto da fibrose tecidual. Desta forma, no presente estudo objetivamos investigar a capacidade indutora de proliferação por partículas de sílica sobre fibroblastos *in vitro*. O efeito da IL-13, um citocina reconhecidamente pró-fibrótica, foi igualmente avaliado. **Métodos:** Camundongos Swiss-Webster foram instilados por via nasal com partículas de sílica na dose de 10 mg. Para montagem de cultura primária de fibroblastos, o tecido pulmonar obtido a partir de camundongos normais e silicóticos, em 7 (fase aguda) e 28 dias (fase crônica), foi submetido ao processo de digestão com colagenase A. As células foram mantidas em cultura através de sucessivas passagens e utilizadas na condição de quarta à oitava passagem. Fibroblastos foram estimulados com sílica (0,1-10 µg/mL) e rmlL13 (1-10 ng/mL) por um período de 24 h a 37°C. A atividade proliferativa das células foi avaliada mediante técnica clássica de incorporação de [³H] timidina. **Resultados:** Inicialmente, através de técnica de imunocitoquímica, verificamos que as células isoladas apresentaram marcação positiva para a proteína a actina, o que nos deu garantia de serem fibroblastos. Verificamos que os fibroblastos provenientes de camundongos normais e silicóticos (7 dias) apresentaram aumento dose-dependente na taxa de proliferação quando da estimulação com IL-13. Interessantemente, níveis basais de proliferação de fibroblastos silicóticos foram superiores em comparação com aqueles detectados em fibroblastos normais, indicando claro estado de ativação celular. De forma coerente, estas mesmas células mostraram-se também mais reativas à estimulação com IL-13. No entanto, fibroblastos obtidos a partir de animais silicóticos crônicos não foram sensíveis à IL-13. De forma curiosa, fibroblastos provenientes de animais normais e silicóticos (7 e 28 dias) não foram responsivos à estimulação com partículas de sílica. **Discussão:** Nossos resultados mostraram que fibroblastos normais e silicóticos, de 7, porém não de 28 dias, foram capazes de proliferar frente à IL-13, em condições nas quais a sílica não apresentou qualquer atividade. Além disso, estes achados contribuem de forma importante para o esclarecimento acerca dos mecanismos envolvidos na patogênese da silicose. **Apoio Financeiro:** PAPES 4/FIOCRUZ, CNPq, FAPERJ (Brasil) e UNESCO (França).

06.013

COMPARATIVE ANALYSIS OF THE ANTI-INFLAMMATORY EFFECT OF FLUNISOLIDE AND NCX-1024 ON SILICOSIS IN MICE.

Ferreira, T. P. T.¹; Lima, J. G. M.¹; Farias-Filho, F. A.¹; Cordeiro, R. S. B.¹; Rocco, P. R. M.²; Garcia, C. S. N. B.²; Hogaboam, C.³; Wallace, J. L.¹; Martins, M. A.¹; Silva, P. M. R. e¹ - ¹FIOCRUZ - IOC - Fisiologia e Farmacodinâmica; ²UFRJ - IBCCF - Investigação Pulmonar; ³University of Michigan Medical School, USA - Pathology

Introduction: Inhalation of crystalline silica particles leads to silicosis, a chronic fibrotic disease, resistant to treatment with some steroids. The addition of a nitric oxide (NO)-releasing moiety to conventional steroids was shown to enhance their anti-inflammatory activity. So, this study was carried out in order to do a comparative analysis between the anti-inflammatory effect of flunisolide and nitrosteroid NCX-1014 on the chronic phase of silicosis in mice. **Methods:** Anaesthetized Swiss-Webster mice were instilled intranasally with silica particles (10 mg) and the analyses of inflammatory parameters made on day 28. Lung morphological alterations and collagen deposition were evaluated by means of histology using staining with hematoxylin/eosin and Gomori trichrome, respectively. Pulmonary mechanics were measured by the end-inflation occlusion method at the same time-point. Mice were treated intranasally with flunisolide and NCX-1024 (0.007 – 0.022 µmol/kg) once a day, for 7 days, starting on day 21. **Results:** Silica instillation led to a marked leukocyte infiltration, collagen deposition and granuloma formation in parallel to an increase in levels of TGF-beta in the lung tissue. Alteration in lung mechanics was noted in silicotic mice as attested by increased airway resistance (central and peripheral) and static elastance. The curative administration of flunisolide and NCX-1024 into silicotic mice dose-dependently inhibited the inflammatory infiltrate and granuloma formation as well as increase in TGF-beta levels. Maximal effect was noted at the dose of 0.022µmol/kg, when an improvement of lung function was also noted. **Discussion:** Our findings showed that flunisolide and NCX-1024 were equally effective in suppressing silica-induced lung fibrosis and mechanical alterations in silicotic mice, indicating that the addition of a NO releasing moiety to flunisolide did not improve its anti-inflammatory effect on the chronic phase of silicosis in mice. **Supported by:** PAPES4/FIOCRUZ, CNPq, FAPERJ (Brazil) & UNESCO (France).

06.014

PLETISMOGRAFIA BAROMÉTRICA DE CORPO INTEIRO: EFEITO DA TEOFILINA ADMINISTRADA POR VIA ORAL, INSTILAÇÃO NASAL OU AEROSSOL EM CAMUNDONGOS BALB/C E A/J

Nascimento, J. B.¹; Pires, A. L. de A.¹; Serra, M. F.¹; Silva, P. M. R. e¹; Martins, M. A.¹ -
¹FIOCRUZ - IOC - Fisiologia e Farmacodinâmica

Introdução e Objetivo: A avaliação de parâmetros fisiológicos associados à ventilação pulmonar em animais de laboratório é um instrumento essencial em muitas áreas da pesquisa biomédica e toxicológica. Mais recentemente, a medida do grau de obstrução de vias aéreas de forma não invasiva, através da pletismografia barométrica de corpo inteiro (WHP), vem ganhando adeptos. Este método trás algumas vantagens em relação às técnicas convencionais de medida de mecânica ventilatória, como a ausência de anestesia e a possibilidade de monitoramentos de longa duração. Entretanto, há restrições importantes a esta metodologia visto que ela está fundamentada na medida indireta do fluxo aéreo pulmonar. Neste trabalho, a WHP foi utilizada para avaliarmos o efeito de teofilina administrada por diferentes vias em camundongos BALB/C e A/J submetidos à provocação com metacolina. **Métodos:** Camundongos BALB/C e A/J adultos normais foram tratados com teofilina, ou veículo, 0,9% NaCl, por via oral (10-60 mg/kg), instilação nasal (0,1-10 µmol/25µL) ou aerossol (10 mg/mL por 30 min). Em diferentes tempos (30 min a 6 h) após o tratamento, os animais foram colocados individualmente em câmaras barométricas, e submetidos ao aerossol de PBS e soluções de concentrações crescentes de metacolina (3-25 mg/mL) por 2,5 min. A média dos valores de Penh medidos ao longo dos 5 min seguintes a cada intervalo de provocação foi utilizada como parâmetro de avaliação do estado de obstrução das vias aéreas do animal estudado. **Resultados:** A estimulação com metacolina induziu aumento concentração-resposta dos valores de Penh tanto em camundongos BALB/C como em A/J, mas mostrou-se claramente mais potente nos últimos. O tratamento com teofilina por via oral 1 h antes da provocação colinérgica foi capaz de inibir, nas duas cepas, o aumento dos valores de Penh em todas as concentrações utilizadas. Curiosamente, enquanto que em camundongos BALB/C o efeito protetor praticamente desapareceu com 2 h de tratamento, nos animais A/J o tratamento manteve-se ativo por pelo menos 5 h. Em ambas as cepas, os tratamentos com teofilina por instilação nasal ou aerossol mostraram-se inativos. **Conclusão:** Nossos resultados indicam que a WHP é uma técnica bastante útil na identificação de substâncias ativas na árvore brônquica. Os resultados sugerem também que a cepa de camundongo utilizada no ensaio, bem como a rota de administração são variáveis de grande relevância neste tipo de estudo. Por último, fica evidente a eficácia marcadamente superior da teofilina administrada por via oral, quando comparada à instilação nasal e à nebulização. **Apoio financeiro:** CNPq, FAPERJ, PDTIS

06.015

FRACTION FROM *Calotropis procera* LATEX (CP) SHOWS ANTI-INFLAMMATORY AND ANTINOCICEPTIVE EFFECTS ON ZYMOBAN-INDUCED ARTHRITIS IN RATS

Bitencourt, F. S.¹; Silvestre, P. P.¹; Cavalcante, C. F.¹; Figueiredo, J. G.²; Oliveira, R. S. B.²; Ramos, M. V.²; Ribeiro, R. A.¹; Vale, M. L.¹; Alencar, N. M. N. de¹; Vale, M. R.¹ -
¹UFC - Fisiologia e Farmacologia; ²UFC - Bioquímica e Biologia Molecular

Introduction: *Calotropis procera* is a laticiferous plant belonging to the Asclepiadaceae family. It is widely distributed in Asia, Africa and South America, and abundant in the Northeast of Brazil. Latex components seem to be able to induce interesting biological effects since the plant itself is known by its pharmacological potentialities. The anti-inflammatory and anti-nociceptive activities of a non-dialysed proteic fraction of CP was studied in zymosan-induced arthritis model, in male *Wistar* rats. **Methods:** The arthritis was induced by intra-articular injection of zymosan (1mg/animal; 50uL) in right knee joints. Thirty minutes before and 2h after the animals were treated (i.v.) with CP (3, 10, 30 and 100 mg/kg). The anti-inflammatory activity was estimated by: cells migration (CM), adenosine deaminase activity (ADA), histopathological analysis of synovial tissue (HA) and vascular permeability (VP) by Evans' blue method. The anti-nociceptive activity was estimated by paw elevation time (PET, in seconds) in an articular incapacitation model. **Results:** CP reduced PET ($p < 0.01$) with a maximum effect in dose of 3mg/kg (3.89 ± 1.06 ; 85.3%; control= 26.44 ± 3.49). The CM was reduced ($p < 0.01$) with maximum effect in dose of 3mg/kg (2042 ± 1105 ; 83.1%; control= 12119 ± 1208). ADA activity in synovial fluid was reduced ($p < 0.05$) in doses of 10mg/kg (11.09 ± 2.42 ; 51.6%) and 30mg/kg (12.15 ± 1.87 ; 46.9%) -control group (22.92 ± 3.08). The HA showed a significant reduction of scores in all doses. CP did not change VP. **Discussion:** Fraction from *Calotropis procera* latex showed anti-inflammatory effect for the reduction of the cell migration and ADA activity and for the improvement of the histopathological parameters. Also it presented an antinociceptive effect for the reduction of paw elevation time. The above data point CP as a potential pharmacological drug for the treatment of arthritis. **Keywords:** arthritis, *calotropis procera*, zymosan. **Acknowledgements:** CNPq/FUNCAP.

06.016

ESTUDO DO EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO DA LIDOCAÍNA SOBRE A RESPOSTA PULMONAR INDUZIDA POR SÍLICA EM CAMUNDONGOS.

Guedes, V. G.¹; Ferreira, T. P. T.²; Arantes, A. C. S. de²; Costa, J. C. S.³; Rocco, P. R. M.⁴; Garcia, C. S. N. B.⁴; Cordeiro, R. S. B.²; Silva, P. M. R. e²; Martins, M. A.² - ¹FIOCRUZ - IOC - Fisiologia e Farmacologia; ²FIOCRUZ - IOC - Fisiologia e Farmacodinâmica; ³FIOCRUZ - IOC - Far-Manguinhos; ⁴UFRJ - IBCCF - Investigação pulmonar

Introdução: A silicose é uma doença ocupacional, de caráter restritivo, causada pela inalação de partículas de sílica em sua forma cristalina e que se caracteriza pela ocorrência de um processo inflamatório seguido por intensa fibrose granulomatosa. A lidocaína é um anestésico local que apresenta, também, propriedades antiinflamatórias como constatado no caso de doenças de natureza alérgica. Tomando por base estas observações, neste trabalho investigamos o potencial efeito anti-inflamatório da lidocaína sobre a resposta silicótica em camundongos. **Métodos:** Camundongos Swiss-Webster foram anestesiados e instilados com sílica (10 mg), por via intranasal, e as análises realizadas 28 dias após. Por meio de técnicas de histologia foram avaliados parâmetros inflamatórios como alterações morfológicas e infiltrado leucocitário (Hematoxilina & Eosina) e deposição de colágeno (Picrosirius). A mecânica respiratória foi analisada através do sistema de oclusão ao final da inspiração, tendo-se a resistência das vias aéreas centrais e periféricas como principais pontos de análise. A administração de lidocaína se deu na forma de aerossol, em doses diárias de 1 e 2%, entre os dias 21 e 28. **Resultados:** Verificamos que camundongos silicóticos apresentaram um marcado infiltrado inflamatório e expressivo aumento no depósito de colágeno, com presença de inúmeros granulomas dispersos no parênquima pulmonar. Em paralelo foi detectada uma importante alteração da função pulmonar nos animais silicóticos, evidenciada por aumento na resistência das vias aéreas central e periférica. O tratamento dos camundongos silicóticos com lidocaína não modificou o infiltrado leucocitário e a deposição de colágeno no pulmão. Vimos, ainda, que o aumento da resistência pulmonar nos camundongos silicóticos mostrou-se igualmente refratária à lidocaína. Vale mencionar que nenhuma alteração significativa foi verificada nos animais normais submetidos a igual tratamento com lidocaína. **Discussão:** Nossos achados mostram que os animais silicóticos apresentam um processo inflamatório crônico com intensa resposta fibrótica e comprometimento da função pulmonar, fenômenos estes que não foram sensíveis ao tratamento curativo com lidocaína. Também indicam que a eficiência da lidocaína em inibir a resposta inflamatória parece estar associada à etiologia da doença em questão. **Apoio financeiro:** PAPES 4, PDTIS/FIOCRUZ, CNPq, FAPERJ e UNESCO.

06.017**FORMALDEÍDO MODULA NEGATIVAMENTE A INFLAMAÇÃO ALÉRGICA PULMONAR EM RATOS.**

Lino dos Santos Franco, A.¹; Domingos, H. V.¹; Oliveira-Filho, R. M.¹; Vargaftig, B. B.¹; Tavares de Lima, W.¹ - ¹USP - Farmacologia

Introdução: O formaldeído (FA) é um poluente ambiental amplamente utilizado em materiais de construção, produtos de madeira, têxtil, cosméticos, laboratórios de patologia, histologia e anatomia. É também exalado em ambiente doméstico, pela queima do gás de cozinha. A exposição ao FA é potencial risco à saúde constituindo importante fator de origem de asma ocupacional e ambiental. Neste estudo avaliamos o efeito da exposição ao FA sobre a inflamação pulmonar mediada por anticorpos.

Métodos Ratos Wistar machos foram expostos ou não ao FA (1%, 90min, 3 dias) e sensibilizados ou não com ovoalbumina (OA, 10mg/alumen). Após 14 dias, os ratos foram broncoprovocados (OA, 1%, 15min). Fragmentos de pulmão (explante) e o lavado broncoalveolar (LBA) foram realizados 24h após a última inalação com FA ou ao desafio. O explante pulmonar e células recuperadas no LBA foram incubadas por 24 h e o sobrenadante recolhido para quantificação de IL-1 β e NO₂. Ainda, alíquotas do soro destes ratos foram diluídos e injetados intradermalmente (100 μ l) no dorso de ratos não manipulados e após 24h o teste de anafilaxia cutânea passiva foi realizado. Verificamos também a desgranulação dos mastócitos presentes no pulmão destes animais através de análise histológica.

Resultados :	Basal	FA	OA/OA	FA/OA
LBA (x10 ⁵ cells)	6,2 \pm 0,5	17,3 \pm 1,5*	20,5 \pm 2,1*	7,5 \pm 0,7#
NO ₂ (μ M/2x10 ⁶ cell)	9,6 \pm 2,5	26,8 \pm 6,1*	6,8 \pm 2,5	59,7 \pm 7,9*#
IL-1 β (pg/ml)	123,0 \pm 11,0	115,4 \pm 7,4	119,25 \pm 4,9	320,0 \pm 32,0*#
PCA (títulos)	-----	-----	32.0 \pm 1.9	28.0 \pm 4.0
Mastócitos desgranulados	0	2.0 \pm 0.4*	4.0 \pm 0.7*	1.7 \pm 0.5* θ

*P<0,05 X basal; #P<0,05 X FA e OA/OA; θ P<0,05 X OA/OA. **Conclusões:** Nossos dados sugerem que o FA exerce efeitos seletivos e tardios sobre os mastócitos, os quais estão relacionados com o aumento na liberação de IL-1 β and NO. Assim, é relevante investigar a imunidade de indivíduos alérgicos que estão expostos ao FA.

Apoio financeiro: FAPESP, CAPES e CNPq.

06.018

INHIBITORY EFFECT OF NCX-1015 AND PREDNISOLONE ON THE LUNG ALLERGIC INFLAMMATION IN MICE

Oliveira, M. dos S. S.¹; Ferreira, T. P. T.¹; Wallace, J. L.¹; Cordeiro, R. S. B.¹; Hogaboam, C.²; Martins, M. A.¹; Silva, P. M. R. e¹ - ¹FIOCRUZ - IOC - Fisiologia e Farmacodinâmica; ²University of Michigan Medical School, USA - Pathology

Introduction: Glucocorticoids are potent anti-inflammatory drugs with therapeutic efficacy in most inflammatory conditions including asthma. The addition of a nitric oxide (NO)-releasing moiety to conventional steroids was shown to enhance their anti-inflammatory activity. In this study we investigated the anti-inflammatory effect of NO-releasing derivative NCX-1015 and prednisolone in a murine model of allergic asthma.

Methods: Balb/c mice were sensitized on day 0 and boosted on day 14 by a subcutaneous injection (0.2 ml) of a mixture containing ovalbumin (50 µg) + aluminum hydroxide (5 mg). On days 19, 20 and 21, animals were challenged intranasally with ovalbumin (25 µg/20µL). All the analyses were made 24 h after the last challenge and included: i) bronchial hyperreactivity to methacholine (non-invasive Buxco system), ii) bronchoalveolar lavage (total and differential leukocyte counts) and iii) lung parenchyma morphology (mediator quantification by ELISA and tissue sections staining with hematoxylin/eosin). NCX-1015 and prednisolone (0,14 mmoles/kg) were administered intranasally, 1 h before each challenge. **Results:** We noted that the increase in Penh following aerosol provocation with methacholine in sensitized challenge mice was sensitive to local treatment with NCX-1015 and prednisolone, though the former was slightly more potent than the latter. NCX-1015 but not prednisolone impaired the increase in total leukocyte counts in the BAL of challenged mice. The elevation in eosinophil numbers in BAL and peripheral blood was inhibited better by NCX-1015 than prednisolone. Histological analyses of lung samples revealed that there was a marked leukocyte infiltration around the airways and vessels of sensitized challenge mice, a phenomenon blocked by NCX-1015 as well as prednisolone. The increase in the levels of CC chemokines eotaxin/ RANTES and of TGFβ in the lungs was equally sensitive to both compounds. **Conclusion:** Our results show that NCX-1015 was more potent than prednisolone to prevent hyperreactivity and eosinophil recruitment following antigen challenge in mice, indicating that the nitric oxide generated from the NO-steroid compound might be acting by a complementary mechanism in order to favor inhibition of the allergic inflammatory response. More experiments are needed in order to clarify better this phenomenon. Our findings also suggest that the addition of a nitric oxide releasing moiety to steroids seems to constitute a promising therapeutic strategy for the treatment of allergic diseases such as allergic asthma. **Supported by:** FIOCRUZ, CNPq.

06.019

AIRWAY HYPERREACTIVITY IN ACUTE AND CHRONIC PHASES OF SILICOSIS IN MICE: ROLE OF TNF-ALPHA

Ciambarella, B. T.¹; Ferreira, T. P. T.¹; Arantes, A. C. S. de¹; Almeida, G. S.¹; Sampaio, E. P.²; Hogaboam, C.³; Cordeiro, R. S. B.¹; Martins, M. A.¹; Silva, P. M. R. e¹ -
¹FIOCRUZ - IOC - Fisiologia e Farmacodinâmica; ²FIOCRUZ - IOC - Hanseníase; ³University of Michigan Medical School, USA - Pathology

Introduction: Silicosis is part of a group of pulmonary pathologies caused by dust exposure (pneumoconiosis) and consequence of a long-term inhalation of silica particles in its free and crystalline form. The disease can be detected through a simple chest X ray, which reveals the presence of small nodules in the upper lungs. Marked lung functional changes have been reported though there is no evidence of airway hyperreactivity so far. This study was undertaken to investigate the occurrence of airway hyperreactivity in silicosis in mice. Since TNF-alpha is a pivotal pro-inflammatory cytokine increased in several lung pathologies, its role in the silicosis was also evaluated. **Methods:** Silica particles (10 mg) were injected by intranasal route into Swiss-Webster, TNF-alpha (-/-) and wild-type mice followed by measurement of airway responsiveness to inhaled methacholine. Inflammation was assessed by several parameters that included ELISA, RT-PCR and histology. All analyzes were performed 7 (acute phase) and 28 days (chronic phase) after silica instillation. **Results:** Silicotic mice exhibited a time-dependent leukocyte infiltration in the lung parenchyma (neutrophil and macrophages), collagen deposition and granuloma formation during the course of the disease. The mRNA expression of TNF-alpha was higher in the silicotic lungs than in those from controls, at 7 and 28 days, but a significant increase in the levels of the protein was detected only on day 28. Silica exposure also caused a time-dependent increase in airway hyperreactivity to methacholine as attested by an increase in lung resistance and reduction in compliance. TNF- alpha (-/-) mice showed a less intense inflammatory response and displayed significantly reduced airway hyperreactivity to methacholine at both time-points analyzed. **Discussion:** Our findings show that silica instillation induced a time-dependent inflammatory response in mice, which was accompanied by a marked airway hyperreactivity to methacholine. In addition, they also indicate that TNF-alpha seems to importantly contribute to several features of the silicosis, including airway hyperreactivity and inflammation. **Supported by:** PAPES4/FIOCRUZ, CNPq, FAPERJ and UNESCO

06.020

EFEITOS *IN VITRO* DO VENENO DE *Crotalus durissus terrificus* (VCdT) E DE UMA FOSFOLIPASE A₂ DESTE VENENO NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA AMINOPEPTIDASE NEUTRA APN/CD13 DE MACRÓFAGOS MURINOS.

Olivo, R. A.¹; Silveira, P. F.¹; Martins, A.²; Teixeira, C. F. P.¹ - ¹Instituto Butantan - Farmacologia; ²USP - Farmácia

Introdução: A aminopeptidase neutra APN/CD13 é uma enzima relevante para a adesão celular e modulação de mediadores inflamatórios, liberados por macrófagos. Os macrófagos representam um alvo importante para ação de venenos e toxinas ofídicas, uma vez que, após estímulo, estas células apresentam elevada capacidade secretória e de expressão de enzimas. Dessa maneira, alterações de enzimas por venenos e toxinas ofídicos, representa um campo novo de pesquisa em toxilogia de venenos animais. Os objetivos desse estudo foram avaliar os efeitos do VCdt e de uma fosfolipase A₂ (FLA₂) isolada deste veneno na atividade aminopeptidásica neutra, APN/CD13, em fração solúvel (S) e de membrana (M) de macrófagos murinos em cultura. **Métodos:** Os macrófagos da linhagem RAW 267.4 foram cultivados em frascos de poliestireno, contendo meio RPMI-SFB 10% para obtenção de monocamadas. Após formação de monocamadas, 4x10⁶ macrófagos/mL foram incubados com concentrações não citotóxicas do VCdt (3 µg/mL) ou da FLA₂ (6,5 µg/mL) ou RPMI (controle), por 1 hora, em estufa a 37°C, em atmosfera úmida, contendo 5% de CO₂. A atividade aminopeptidásica neutra APN/CD13 foi quantificada fluorimetricamente, com substrato derivado da naftilamida e expressa como picomoles de substrato hidrolisado por minuto, por miligrama de proteína (UP/mg de proteína). **Resultados:** A incubação do VCdt ou da FLA₂ com macrófagos em cultura aumentaram significativamente a atividade aminopeptidásica neutra APN/CD13 (720,1±35,3 e 754,3±32,4 UP/mg de proteína, respectivamente) somente na fração solúvel dessas células, em relação ao controle (481,2±11,7 UP/mg de proteína). **Discussão:** Os resultados obtidos demonstram que tanto o VCdt quanto a FLA₂, presente neste veneno, exercem uma ação direta e de igual magnitude na atividade APN/CD13 de macrófagos. Considerando o alto teor de FLA₂ em venenos ofídicos, pode-se sugerir que o efeito do VCdt sobre a APN/CD13 deva-se principalmente à ação de sua FLA₂. **Apoio financeiro:** FAPESP

06.021

INTERAÇÕES ENTRE ANFETAMINA (ANF), CATECOLAMINAS E CORTICOSTERONA NA REGULAÇÃO DA INFLAMAÇÃO ALÉRGICA PULMONAR (IAP) EM RATOS

Ligeiro de Oliveira, A. P.¹; Lazzarini, R.²; Cavriani, G.¹; Vanni Domingos, H.¹; Tavares de Lima, W.¹; Palermo-Neto, J.² - ¹ICB - USP - Farmacologia; ²FMVZ - USP - VPT

Introdução: O estresse e a ansiedade influenciam o curso de diversas doenças, incluindo a asma. É sabido que a ANF aumenta a liberação de corticóides após desafio estressante. A ANF aumenta o tona catecolaminérgico e, entre outros efeitos, libera dopamina e noradrenalina. Neste estudo, avaliamos o envolvimento das catecolaminas e da corticosterona na IAP em ratos tratados com ANF. **Métodos:** 30 Ratos Wistar machos foram separados ao acaso em três grupos iguais: controle imunizado (CI), ANF imunizado (AI) e imunizado + RES + ANF (IRA). Todos os animais receberam Ovalbumina/alúmen via subcutânea. Decorridos 14 dias os animais foram desafiados por inalação de Ovalbumina (1%). Os ratos do grupo AI receberam ANF (1mg/kg, via ip) 12 horas antes do desafio. Os animais do grupo IRA foram tratados por 5 dias consecutivos com reserpina (1mg/kg) + ANF (1mg/kg) 12h antes do desafio, ambos pela via ip. Os ratos do grupo CI receberam os veículos da ANF e da Res. Após 24h do desafio foram quantificadas as células do lavado broncoalveolar (LBA), do sangue, da medula óssea e os níveis de corticosterona sérica de todos os animais. **Resultados:** O número total de células do LBA ($\times 10^5$) diminuiu (5 ± 0.5) em relação àquele do grupo CI (29 ± 2) após tratamento com ANF. O pré-tratamento com Res reverteu parcialmente os efeitos da ANF no LBA (15.4 ± 1.4). No sangue, verificamos diminuição do número total de leucócitos circulantes (mm^3) no grupo AI (7.690 ± 778) em relação àquele do grupo CI (14.200 ± 662). O pré-tratamento com Res não reverteu os efeitos da ANF no número total de leucócitos circulantes. O número total de células obtidas da medula óssea ($\times 10^6$) aumentou após o tratamento com AI (309 ± 36) em relação ao grupo CI (80 ± 4), o pré-tratamento com Res reduziu o número dessas células (43 ± 3) em relação ao grupo AI. Os níveis de corticosterona sérica (ng/ml) obtidos do grupo tratado com ANF aumentou (617 ± 38) em relação ao grupo CI (363 ± 24). O pré-tratamento com Res diminuiu esses níveis em relação ao grupo AI (214 ± 37). **Conclusão:** Verificamos que as catecolaminas revertem parcialmente o número de células presentes no LBA, e na medula óssea bem como os níveis séricos de corticosterona. Sugere-se que a ANF reduza a IAP por interferir com a atividade do eixo HPA e do Sistema nervoso simpático. **Apoio Financeiro:** FAPESP 04/14128-0

06.022

STUDY OF NITRIC OXIDE INHIBITION ON HUMAN EOSINOPHIL FUNCTIONS STIMULATED WITH EOTAXIN AND RANTES IN VITRO

Lintomen, L.¹; Franchi, G. C. Jr¹; Condino-Neto, A.²; Nucci, G. de¹; Antunes, E.¹ -
¹UNICAMP - Farmacologia; ²ICB - USP - Imunologia

Introduction: Nitric oxide (NO) has been shown to modulate diverse eosinophil (EO) functions, but this is still conflicting. The CC-chemokines eotaxin and RANTES are involved in EO migration to inflammatory tissues, mainly during allergic diseases such as bronchial asthma. This study was designed to investigate the modulatory effect of NO (using L-NAME – non-selective NO synthase inhibitor) in eotaxin and RANTES-stimulated EO, and expression of adhesion molecules on EO surface. **Methods:** EO were isolated from peripheral blood of healthy volunteers (male and female, 21-45 years), using a VarioMACS system and microbeads (CD16 immunomagnetic microbeads). The EO were incubated for 4 h in RPMI 1640 medium, with or without eotaxin (100 ng/ml) or RANTES (100 ng/ml), in absence or presence of L-NAME (0.1 mM). After incubation, the cells were used in different assays. For adhesion assays, EO (50 μ l of 7×10^4 cells/ml) were added to fibronectin-coated wells and were allowed to adhere to wells for 30 minutes. EO adhesion was calculated by measuring residual EO peroxidase activity of adherent cells. For degranulation assays, the supernatant (50 μ l) of EO (90 μ l of 5×10^6 cells/ml) was collected and the EO peroxidase activity was measured. EO migration was measured using a 96 multiwell ChemoTx 101-5 chamber. The bottom compartment were filled with 29 μ l of chemotactic agent such as eotaxin (100 ng/ml) or RANTES (100 ng/ml). 25 μ l of EO (4×10^6 cells/ml) in the presence or not of L-NAME (0.1 mM) were placed directly onto the filter sites and the chamber was then incubated for 2 h. The non-migrating cells on the top of the filter were removed and the chamber was centrifuged. The filter was removed and the number of cells that migrated into the bottom compartment was determined by measuring residual EO peroxidase. For cytometry analysis, the EO (100 μ l of 3×10^6 cells/ml) were washed and the unspecific sites were blocked with human serum. EO were then incubated with the phycoerythrin-labelled-monoclonal human antibody (anti-VLA-4 or anti-Mac-1) or a suitable isotype control. The expression of adhesion molecules on the surface of EO was detected using flow cytometry. **Results:** Our results showed that eotaxin, RANTES and L-NAME (15.8 ± 2.0 , 15.7 ± 2.0 and 10.4 ± 1.6 %, respectively) significantly increased the EO adhesion to fibronectin when compared to the non-stimulated EO (6.2 ± 1.2 %) However, co-incubation of L-NAME with either eotaxin or RANTES did not affect the increased adhesion seen with the chemokines alone. The incubation with eotaxin, RANTES or L-NAME alone also caused a marked cell degranulation (0.70 ± 0.03 , 0.70 ± 0.05 and 0.70 ± 0.04 optical density, respectively) when compared to non-stimulated EO (0.39 ± 0.02). The co-incubation of L-NAME with either eotaxin or RANTES did not affect the increased degranulation seen with the chemokines alone. The EO migration is increased in response to eotaxin or RANTES (1391.8 ± 165.3 and 1328.7 ± 195.3 cells $\times 10^4$, respectively) when compared to non-stimulated EO (313.7 ± 50.7 cells $\times 10^4$). Treatment with L-NAME did not affect the EO migration in response to eotaxin (1521.4 ± 155.5 cells $\times 10^4$) or RANTES (1327 ± 232.8 cells $\times 10^4$). Eotaxin did not affect the expression of VLA-4 or Mac-1 on the EO surface (23.8 ± 2.37 and 197.14 ± 23.32 fluorescence intensity, respectively) when compared to the non-stimulated EO (25.73 ± 1.8 and 196.89 ± 9.65 , respectively). Similar results were observed with RANTES. L-NAME did not affect the expression of VLA-4 or Mac-1 in EO. **Discussion :** Our study shows that CC-chemokines eotaxin and RANTES increases the in vitro EO adhesion, degranulation and chemotaxis by NO-independent mechanisms. The failure of CC-chemokines to affect VLA-4 and Mac-1 and expression on EO surface indicates that changes in the integrin function (avidity or affinity) are rather involved in the enhanced adhesion. **Supported by:** Fapesp

06.023

THE ANTI-INFLAMMATORY POTENTIAL OF LPSF/CR-27 IN VITRO AND IN VIVO

Oliveira, T. B.¹; Uchoa, F. D. T.¹; Costa, P. C. V.¹; Santos, I. B. V.¹; Silva, T. G.¹; Lima, M. C. A.¹; Galdino, S. L.¹; Pitta, I. R.¹ - ¹UFPE - Antibióticos

Introduction: Inflammation is associated with a wide range of human diseases, pre-diseases, and conditions which are often treated with anti-inflammatory drugs. Although not fully understood, several action mechanisms are proposed to explain *in vivo* anti-inflammatory action. One of the important mechanisms is an inhibition of eicosanoid generating enzymes including phospholipase A2, cyclooxygenases, and lipoxygenases, thereby reducing the concentrations of prostanoids and leukotrienes. Novel thiazolidinones have been synthesized and exhibited anti-inflammatory activity¹. A novel bromo-indol-thiazolidinenone (LPSF/CR-27) was synthesized by a short and easy synthetic pathway. The compound was evaluated both *in vivo* for anti-inflammatory activity in the mice air pouch model and *in vitro* for COX-1 and COX-2 isoenzymes inhibition, aiming to determinate the action mechanism of LPSF/CR-27. **Methods:** LPSF/CR-27 was successfully synthesized and characterized by spectroscopic methods. The *in vivo* anti-inflammatory evaluation was done by the mice air pouch model, using carrageenan as inflammatory inducer with one hour pre-administration of LPSF/CR-27 (3 mg/kg p.o.). Air pouches were induced in Swiss mice (n=5) by subcutaneous injection of 2,5 mL sterile air 3 and 6 days prior to the experiment. Six hours after carrageenan (1mL, 1% sol.) injection, exudates were retrieved and leukocyte concentration quantified using a Newbauer Haemocytometer. A positive control group (without any treatment) and a standard control group (pre-treated with indomethacin 10mg/kg) were also included. The *in vitro* enzyme inhibition was carried out according to the commercial colorimetric kit assay for both COX-1 and -2. This assay is an indirect method: COX inhibition by LPSF/CR-27 (0,01 and 1 μ M) has been measured by the oxidation of the peroxidase co-substrate TMPD (N,N,N',N'-tetramethyl-p-phenylenediamine) to form a blue compound (610 nm) which reflect the rate of conversion of arachidonic acid to PGH₂. **Results and discussion:** LPSF/CR-27 was perfectly characterized by ¹H MNR and IR spectroscopy. The *in vivo* results confirmed that LPSF/CR-27 was effective against inflammation, with anti-inflammatory activity 54 \pm 1%, comparable with the standard drug which exhibited 55 \pm 2%. The *in vitro* COX inhibition shown that LPSF/CR-27 both 0,01 and 1 μ M concentration exhibited the same activity, 22 \pm 2,5 % to COX-1 and 10 \pm 1,6% to COX-2. Therefore, the inhibition is not dose-dependent and a slightly preference to COX-1 isoform. **Conclusion:** The results showed that LPSF/CR-27 has good antiinflammatory activity, indicating that it should be a valid lead for synthesizing new compounds that possess better activity. Further structure–activity and mechanistic studies should be useful. **References:** ¹Santos, L.C., et al. HETEROCYCL. COMM., 11 (2): 121-128 2005 **Acknowledgments:** CNPq.

06.024

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA DE UM NOVO DERIVADO TIAZOLIDÍNICO TRIMETOXILADO

Magalhaes, L. R.¹; Castro, M. C. A. B.²; Lins, T. U. L.²; Barros, C. D.²; Santos, E.²; Barbosa-Filho, J. M.¹; Galdino, S. L.²; Silva, T. G.²; Lima, M. C. A.²; Pitta, I. R.² - ¹UFPB - Tecnologia Farmacêutica; ²UFPE - Antibióticos

INTRODUÇÃO: A inflamação tem uma história antiga e rica intimamente relacionada com histórias das guerras, feridas e infecções. Trata-se é um mecanismo de defesa natural do organismo a qualquer agressão eventualmente sofrida. Sua intensidade mostra-se diretamente proporcional ao tamanho do trauma sofrido. A resposta inflamatória costuma ser dividida em três fases: a inflamação aguda, a resposta imune e a inflamação crônica (KATSUNG, 1998). **METODOLOGIA:** Foi inicialmente injetado ar estéril no dorso do animal (2,5 mL de ar) por via subcutânea, onde esta aplicação corresponde ao dia zero e a segunda aplicação foi realizada 48 horas depois da primeira que correspondeu ao dia 3. Desse modo, formou-se uma bolsa de ar no dorso do animal que tem considerável importância histológica pois é nele onde ocorrerá a migração de leucócitos polimorfonucleares e produção de exsudato. No sexto dia do ensaio administrou-se o derivado tiazolidínico trimetoxilado LPSF/GQ-38 nas doses de 0,03, 0,15, 0,3, mg/kg via oral, piroxicam (3mg/kg v.o), droga antiinflamatória não esteroideal, utilizada como padrão do teste. Após uma hora da administração dos compostos, injetou-se 1mL de uma solução de carragenina a 1% dentro da bolsa de ar. Decorridas 6 horas após a aplicação de carragenina, os animais foram sacrificados pela exposição ao éter e as bolsas lavadas com 3 mL de solução salina com EDTA como líquido de arraste. O exsudato foi diluído em solução de Turk, e então realizado a contagem dos leucócitos polimorfonucleares (PMNL) em câmara de Neubauer (KHANUM et al., 2004). **RESULTADOS E DISCUSSÃO:** Na tabela 1 estão sumarizadas as inibições produzidas pelo derivado tiazolidínico LPSF/GQ-38 sobre a migração leucocitária induzida por carragenina (cg) 1% bem como o resultados da ED50 obtido no teste do Air-Pouch. O derivado tiazolidínico trimetoxilado LPSF/GQ-38 apresentou uma atividade antiinflamatória promissora no teste do *Air-pouch*, impulsionando o aprofundamento dos estudos farmacológicos para elucidação do mecanismo de ação, bem como a síntese e avaliação biológica de novos derivados dessa série.

Tabela 1: Número de células (média ± erro padrão) encontradas no *Air-pouch* inflamatório 6 horas após a indução da inflamação

Composto	Dose	Concentração Molar	Contagem de PMNL / mL (X10 ⁵)	Percentual de Atividade Antiinflamatória (%)
LPSF/GQ-38 ED50= 0,087mg	0.3 mg/Kg	0,668mMols/kg	12,4 ± 0,07	70%
	0.15mg/Kg	0,3340 mMols/kg	12,6 ± 0,13	69%
	0.03mg/Kg	0,0668mMols/kg	17,2 ± 0,12	26,50%
Piroxicam	3 mg/Kg	9,40 mMols/kg	17,4 ± 0,08	57,86%
Controle			41,3± 0,57	

PMNL = Leucócitos polimorfonucleares. Camundongos tratados oralmente com derivado tiazolidínico **LPSF/GQ-38** nas doses mencionadas. Cada valor representa a média ± EPM (erro padrão da média) de n = 6/grupo. O percentual de inibição foi calculado de acordo com a equação: Atividade antiinflamatória % = (C-T/C) x 100. * p< 0,05; ANOVA.

KATSUNG, B. G. Farmacologia (Básica & Clínica) 6 ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 408-423, 1998. **Apoio Financeiro:** CNPq, PIBIC

06.025

EFEITO DA LECTINA DE *Cratylia floribunda* NO TRATAMENTO TÓPICO DE FERIDAS CUTÂNEAS EXPERIMENTAIS EM CAMUNDONGOS

Figueiredo, J. G.¹; Figueiredo, I. S. T.²; Teixeira, C. M.²; Pierdona, T. M.²; Cavalcante, M. F.³; Nogueira, N. A. P.⁴; Porto, A. L. F.⁵; Lima Filho, J. L.⁶; Cavada, B. S.¹; Carneiro-Leao, A. M. A.⁵; Alencar, N. M. N. de² - ¹UFC - Bioquímica e Biologia Molecular; ²UFC - Fisiologia e Farmacologia; ³UFC - DACT; ⁴UFC - Análises Clínicas e Toxicológicas; ⁵UFRPE - Morfologia e Fisiologia Animal; ⁶LIKA / UFPE - Bioquímica

Introdução: A cicatrização é um processo biológico dinâmico de reparação de lesões que compreende as fases inflamatória, proliferativa e de maturação. Este processo pode sofrer uma influência positiva de moléculas imunoestimuladoras, como as lectinas. Estas são proteínas ou glicoproteínas não pertencentes ao sistema imunológico, capazes de reconhecer sítios específicos em moléculas e ligar-se a carboidratos, sem alterar a estrutura covalente das ligações glicosídicas dos sítios. O objetivo deste trabalho foi investigar os efeitos da aplicação tópica da lectina de *Cratylia floribunda* (CFL) em feridas cutâneas experimentais. **Métodos:** Feridas cirúrgicas foram produzidas sob condições assépticas, na região dorsal torácica de camundongos Swiss (machos, com 8 semanas de idade, pesando 30±2,0g), divididos em dois grupos (n=13/grupo), segundo o tratamento empregado: Grupo C (NaCl 150mM); Grupo CFL (10µg/100mL). O tratamento foi realizado diariamente com 100 µL de cada solução nas feridas, sendo estas avaliadas clinicamente até o 12º dia de pós-operatório (PO), considerando parâmetros inflamatórios (edema, hiperemia e características exsudativas), presença de crosta e contração das feridas. **Resultados:** O edema foi observado até o 4º dia PO no grupo CFL e até o 5º dia PO no grupo C. No 5º dia PO em 54% dos animais do grupo C, enquanto que neste mesmo dia, nenhum animal do grupo CFL apresentou este sinal flogístico, sendo essa diferença estatisticamente significativa (p<0,05). A hiperemia foi observada até o 5º e 6º dia PO no Grupo CFL (8%) e C (38%), respectivamente, sendo estatisticamente diferentes do 3º ao 6º dia (p<0,05). A presença de crosta ainda foi observada nos tempos 10º e 11º dia PO, 61% e 46% dos animais do grupo C e 15% e 0% dos animais do grupo CFL (diferença estatística entre os grupos - p<0,05). A contração da área das feridas foi mais pronunciada no grupo CFL que no grupo Controle. As diferenças no percentual médio de contração foram mais evidentes no 1º (CFL = 25% e C= 3%, diferença de 22%) e 5º dia PO (CFL = 38% e C =18%, diferença de 20%), sendo P<0,05 (one-way ANOVA). **Discussão:** Estes resultados sugerem o uso dessa lectina na resolução do período inflamatório e na cicatrização de feridas cutâneas. **Palavras-chave:** Lectina, *Cratylia floribunda*, cicatrização. **Apoio Financeiro:** CAPES, FUNCAP, CNPq e UFC.

06.026

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA DE NOVO DERIVADO CLORADO TIAZOLÍDINICO (LPSF/TA-01)

Barros, C. D.¹; Oliveira, T. B.¹; Silva, J. C.¹; Luis, A. F.¹; Silva, T. G.¹; Lima, M. C. A.¹; Galdino, S. L.¹; Pitta, I. R.¹ - ¹UFPE - Antibióticos

Introdução: O processo inflamatório consiste na resposta orgânica mais precoce diante de lesão tissular ou infecção. Este processo fisiológico envolve uma ação coordenada entre o sistema imunológico e o tecido no qual ocorreu a lesão (TILLEY et al., 2001). Conhecidos pela humanidade há cerca de 100 anos, os compostos antiinflamatórios não esteróides (AINES) estão entre os agentes farmacológicos mais utilizados na prática médica. Apresentam um amplo espectro de indicações terapêuticas, como: analgesia, antiinflamação, antipirese, profilaxia contra doenças cardiovasculares (DUBOIS et al., 1998). Contudo, a maioria destes medicamentos proporciona efeitos adversos. Dentre o arsenal terapêutico existente na atualidade contra a inflamação podemos citar os derivados tiazolídínicos que mostram atividades antiinflamatória e analgésica interessantes junto com o perfil gastrointestinal de melhor segurança do que outros NSAIDs conhecidos (PREVITERA et al., 1990). Diante da necessidade da obtenção de novos fármacos com maior potência e menor toxicidade, foi sintetizado um novo agente da série 5-benzilideno-3-(3-cloro-benzil)-tiazolidina-2,4-diona (LPSF-TA) com provável ação antiinflamatória. **Método:** Foram usados camundongos machos e fêmeas adultos albinos swiss (*Mus musculus*) com cerca de 60 dias de nascidos, oriundos do Biotério do Departamento de Antibióticos -UFPE. Os animais foram separados em lotes (n=6). No primeiro dia de experimento, foram injetados 2,5mL de ar estéril no dorso do animal. No terceiro dia, foram injetados outros 2,5mL de ar estéril no mesmo local. Estes procedimentos foram realizados em ambiente estéril e os animais foram previamente anestesiados com éter etílico. No sexto dia, administrou-se a substância LPSF/TA-01 na dose de 3mg/Kg por via oral, estando os animais em jejum por 12 horas, porém com água *ad libitum*. Após 1 hora, foi injetado 1 mL de solução de carragenina 1% (p/v) na cavidade de ar formada. Passadas 6 horas, os animais foram sacrificados e o exsudato inflamatório foi aspirado com a utilização de 3 mL de uma solução salina 0,9% com EDTA 0,3% (v/v). Em seguida, prepara-se o exsudato para a contagem de PMNL em Câmara de Neubauer, diluindo-o 1:6 em solução de Turk. O percentual de atividade antiinflamatória foi obtido mediante a redução do número de PMNL entre os grupos tratados e controle (KHANUM et al., 2004). **Resultados:** O derivado LPSF/TA-01 apresentou ponto de fusão entre 138-140°C, rendimento 99% e Rf 0,87 em n-Hex/AcOEt 7:3, resultados considerados satisfatórios. Já a atividade biológica mostrou claramente a redução do número de leucócitos polimorfonucleares (PMNL) no exudato. O grupo controle apresentou um número de PMNL de $17,1 \pm 0,12 \times 10^5$ células/mL, o LPSF/TA-01 de $12,38 \pm 0,61 \times 10^5$ células/mL (66,66% de inibição) e o piroxicam de $4,13 \pm 0,28 \times 10^5$ células/mL, correspondendo a um percentual de inibição de migração de 58%. Os resultados foram expressos em média \pm erro padrão da média e foram significativos para $p < 0,05$. **Discussão:** O composto LPSF/TA-01 apresentou uma boa reatividade ao estímulo inflamatório da carragenina frente ao teste do bolsão inflamatório (Air Pouch), com um potencial de inibição de 66,66% em relação ao grupo controle, sendo o resultado considerado bom, visto que o piroxicam, antiinflamatório de escolha, apresentou uma inibição de 58%. **Apoio Financeiro:** CNPq, PIBIC/UFPE

06.027

AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DO PROCESSO CICATRICIAL INDUZIDO PELA ALANTOÍNA VEICULADA EM TRÊS FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS EM MODELO DE FERIDA ABERTA EM RATOS WISTAR

Araujo, L. U.¹; Grabe-Guimaraes, A.¹; Carneiro, C. M.²; Mosqueira, V. C. F.¹; Silva-Barcellos, N. M.¹ - ¹UFOP - Farmácia; ²UFOP - DEACL

Introdução: A cicatrização dos tecidos e órgãos é um processo biológico complexo essencial para manter a integridade do organismo. Através da utilização de substâncias tópicas o homem tenta interferir nesse processo procurando diminuir o seu período, buscando melhores resultados. A alantoína é um importante componente de várias pomadas que estimulam a cicatrização de feridas e queimaduras. **Objetivo:** Avaliar aspectos morfológicos do processo cicatricial de feridas cutâneas abertas de ratos Wistar induzidos por três formulações farmacêuticas (loção lanette, gel de carbopol e solução glicero-alcoólica) contendo ou não o princípio ativo alantoína em sua constituição. **Métodos:** Foram utilizados 140 ratos Wistar, fêmeas, adultas, divididas em quatro grupos: 1.Loção lanette (n=40); 2.Gel de carbopol (n=40); 3.Solução glicero-alcoólica (n=40); 4.Sem tratamento (n=20), grupo controle. Cada grupo tratado foi subdividido em dois: 20 animais tratados com base pura e 20 tratados com alantoína 5% veiculada nas três formulações. As preparações foram aplicadas diariamente, durante 14 dias, sobre ferida aberta, de 1 cm², previamente realizada no dorso de cada animal. A avaliação histológica do processo de cicatrização foi feita nos tempos 3, 7, 14, 21 e 28 dias após realização da ferida (n=4 por tempo). As lâminas foram coradas pela hematoxilina-eosina e tricrômico de Masson e avaliados os parâmetros de elementos celulares inflamatórios incluindo colagenização e reepitelização. **Resultados e discussão:** O grupo controle apresentou no 3° dia pós-operatório processo inflamatório intenso, com congestão, hiperemia e necrose; no 7° dia redução no número de células inflamatórias, caracterizando um tecido mais organizado; no 14° dia a área da lesão mostrou-se reduzida, mas ainda com a presença de infiltrado inflamatório discreto, com reepitelização, caracterizando um tecido em franca recuperação; já no 21° dia, o processo cicatricial está avançado, com epitélio mais delgado e com raras células inflamatórias e no 28° dia, observou-se completa cicatrização. Os animais tratados com **gel de carbopol** (base pura) apresentaram no 7°, 14° e 21° dias intenso processo inflamatório, quando comparados aos sem tratamento. Já os animais tratados com **solução glicero-alcoólica** (base pura) apresentaram inicialmente (3°, 7° e 14° dias) processo cicatricial inferior ao observado nas outras duas formulações, mas que em longo prazo (21° e 28° dias) mostrou-se melhor que o gel de carbopol. Os animais tratados com **loção lanette** (base pura) diferenciam-se dos sem tratamento por apresentarem maior processo inflamatório no 14° dia. Já nos animais tratados com **alantoína veiculada nas três bases** foi observado intenso processo inflamatório no 3°, 7° e 14° dias quando comparado aos grupos sem tratamento e bases puras; no 21° e 28° dias o grupo **gel de carbopol** apresentou ainda este perfil o que, ao contrário, não ocorreu com a **solução glicero-alcoólica e loção lanette** os quais demonstraram, ao final dos experimentos, melhor processo cicatricial, com destaque para a **loção lanette**. O uso tópico diário da **formulação loção lanette** associada ou não a alantoína, no modelo de ferida aberta em ratos, induziu uma maior organização estrutural do tecido lesado ao final dos experimentos. **Apoio Financeiro:** UFOP

06.028

AIRWAY REMODELING: DISSOCIATION BETWEEN EOSINOPHIL ACCUMULATION AND AIRWAY HYPERRESPONSIVENESS

Braga, P.¹; Gomes, T. D.¹; Dalzy, D. V.¹; Pires, A. L. de A.¹; Santos, T. P. O.¹; Silva, P. M. R. e.¹; Cordeiro, R. S. B.¹; Serra, M. F.¹; Martins, M. A.¹; Perez, S. A. C.¹ -
¹FIOCRUZ - IOC - Fisiologia e Farmacodinâmica

Background and Aim: Eosinophil accumulation into the lung is hallmark of asthmatic disease and it occurs during the early and chronic airway inflammation. These granulocytic cells releases a varied of preformed proteins from cytoplasmic specific granules and vesicles that have important immunomodulatory properties. However, it is still not possible to define the role of eosinophils in allergic response. In addition, chronic asthma is identified by airway remodeling that is accompanied by structural changes in lung architecture leading to airway hyperresponsiveness. The correlation of effector functions of eosinophils and hyperresponsiveness is still controversial. In this perspective, the aim of the present work is to correlate the kinetic of tissue eosinophil accumulation and hyperreactivity of airways in experimental chronic murine model of asthma. **Methods:** Balb/c mice were immunized with a mixed suspension of ovalbumin (OA) (50 mg) and Al(OH)₃ (5 mg) in 200 mL of 0.9% NaCl on days 0 (subcutaneously) and 14 (intraperitoneally). Fourteen days later, repetitive OA challenges (50 ug/25 uL) were intranasally instilled 3 times a week during 4 weeks. Airway hyperresponsiveness was measured using barometric plethysmography by exposing awake mice to aerosolized PBS to set a baseline value, followed by increasing concentrations of aerosolized methacholine (6, 12 and 25 mg/mL) in PBS for 2.5 min, 24 h after the last OA provocation. Lung sections were examined by light microscope in hematoxylin/eosin and Gomori's trichrome stained samples. In some animals, persistency of pathological changes was also analyzed 30 days after the last OA instillation. Moreover, IL-13 and eotaxin were measured in the supernatant of lung explants tissue cultures. **Results:** The kinetic of eosinophil accumulation in OA-stimulated mice revealed massive eosinophil infiltration in perivascular and peribronchial spaces (36%) within 2 weeks and reducing within 4 weeks (14%) though remaining significantly above the baseline levels noted in controls, according to morphometric analyses. Widespread of extracellular matrix deposition beneath the airway was also detected during the second week which was shown to keep high until fourth week, following by Gomori's trichrome staining. Eotaxin and IL-13 levels in the lung explants supernatants from OA-stimulated mice were clearly increased as compared with controls at the first week. Marked airway hyperresponsiveness was observed in OA-challenge mice from weeks 1 to 4 as compared to controls. Interestingly, an important degree of spontaneous resolution was detected 30 days post-challenge, with absence of extracellular matrix deposition and inflammatory infiltration, but airway hyperresponsiveness was still there. **Conclusion:** Our findings show that instillation of allergen-evoked airway hyperresponsiveness correlates with lung tissue inflammation and remodeling but remain intact even after their resolution. We postulate that this murine model may be a distinct approach for investigating putative candidate compounds in drug development for asthma therapy. **Supported by:** PDTIS-Fiocruz, FAPERJ and CNPq.

06.029

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE UM NOVO DERIVADO TIAZOLIDÍNICO DA SÉRIE 5-BEZILIDENO-3-(3-FLUORO-BENZIL)-TIAZOLIDINA-2,4-DIONA (LPSF/GQ-59)

Paula, M. J. D.¹; Silva, J. C.¹; Lins, T. U. L.¹; Luis, A. F.¹; Barros, C. D.¹; Silva, T. G.¹; Lima, M. C. A.¹; Galdino, S. L.¹; Pitta, I. R.¹ - ¹UFPE - Antibióticos

Introdução: Entre os mediadores que determinam o processo inflamatório se destacam as participações de moléculas resultantes de duas vias metabólicas: a via das lipoxigenases (LOX), que resultarão na síntese dos leucotrienos; e a via das cicloxigenases que originarão as prostaglandinas (PGs). Apesar do grande arsenal de medicamentos com ação antiinflamatória já existentes, incluindo-se a nova geração dos seletivos para COX-2, o grande número de efeitos colaterais ainda prevalece. Recentes estudos têm demonstrado novas alternativas para a resolução dos efeitos adversos dos antiinflamatórios já existentes, direcionando-se para novos compostos com inibição dual da 5-lipoxigenase e cicloxigenase. Dentre as substâncias que estão sendo ativamente investigadas como agentes antiinflamatórios se destacam as tiazolidina-2,4-dionas que são apontadas como potentes inibidores enzimáticos com amplas aplicações terapêuticas. **Objetivo:** Deste modo, propomos a avaliação das propriedades antiinflamatórias do novo derivado tiazolidínico (LPSF/GQ-59) através do modelo do bolsão de ar. **Métodologia:** Para a avaliação da atividade antiinflamatória foram utilizados camundongos machos e fêmeas adultos, albinos swiss (*Mus musculus*) com cerca de 60 dias de nascidos, pesando entre 25-30g, oriundos do Biotério do Departamento de Antibióticos - UFPE. Os animais foram separados em lotes (n=6). No primeiro dia de experimentação, injetou-se 2,5 mL de ar estéril no dorso do animal, repetindo o procedimento após 72 horas. No sétimo dia do ensaio experimental foi administrado o composto em estudo (LPSF/GQ-59) por via oral, em dose de 3mg/Kg. Após uma hora foi injetado 1mL de solução de carragenina (1%) dentro da bolsa de ar, de modo a induzir o processo antiinflamatório. Decorridas 6 horas após a aplicação da carragenina, os animais foram eutanasiados e em seguida, as bolsas foram lavadas com 3 mL de solução salina com EDTA 0,3% (v/v) como líquido de arraste. O exudato foi diluído em solução de Turk, e então realizada a contagem dos leucócitos polimorfos nucleares (LPN) em câmara de Neubauer (KHANUM et al., 2004). **Resultados e Discussão:** Para este estudo o efeito antiinflamatório do composto foi estimado em termos de percentual de inibição da migração de LPN calculado de acordo com a seguinte equação: Atividade antiinflamatória (%) = $[(n-n')/n] \times 100$. Como resultado obtido da avaliação biológica no teste do bolsão inflamatório na dose de 3mg/Kg o novo agente derivado da tiazolidina-2,4-diona apresentou um percentual de inibição da migração celular reproduzido por carragenina de 35% em relação ao controle negativo. O composto da série 5-bezilideno-3-benzil-tiazolidina-2,4-diona (LPSF/GQ-59) apresentou uma inibição da migração de PMNL relativamente baixa relação ao grupo controle, sendo necessário testar doses crescentes para observar se o efeito é dose-dependente, uma vez que a substância apresenta baixa toxicidade. **Apoio Financeiro:** CAPES-PIBIC/CNPq/UFPE.

06.030

EFEITO GASTROPROTECTOR DO H₂S (SULFETO DE HIDROGÊNIO) NA LESÃO GÁSTRICA INDUZIDA POR ETANOL EM CAMUNDONGOS

Medeiros, J-V. R.¹; Soares, P. M. G.¹; Nogueira, A. C. P.¹; Cunha, F. de Q.²; Ribeiro, R. A.¹; Souza, M. H. L. P.¹ - ¹UFC - Fisiologia e Farmacologia; ²FMRP - USP - Farmacologia

INTRODUÇÃO: O Álcool é um importante agente agressor da mucosa gástrica. O H₂S foi descrito como um mediador da proteção da mucosa contra a lesão por AINEs. O H₂S é formado pela ação de duas enzimas, a cistationina-β-sintetase (CBS) e a cistationina-γ-liase (CSE), usando como substrato a cisteína. Assim o objetivo deste trabalho foi investigar o efeito do pré-tratamento de doadores de H₂S (NaHS e Reagente de Lawesson's) ou antagonistas da CBS/CSE na lesão gástrica induzida por álcool em camundongos. **MÉTODOS:** Os doadores de H₂S, NaHS (150 μmol/Kg, v.o) ou o Reagente de Lawesson's (27 μmol/Kg, v.o), foram administrados 30 min antes do etanol 50% (0,5ml/25g, v.o). Os outros grupos foram tratados com os inibidores da CSE, como o propargilglicina (50 mg/Kg, v.o) ou β-cianoalanina (100 mg/kg, v.o), também 30 min antes do etanol. Depois de 1 h, os estômagos foram abertos para determinação da área da lesão usando planimetria computadorizada. Além disso, fragmentos de tecidos foram removidos para análise microscópica e dosagem de glutathiona e hemoglobina (colorimetria). **RESULTADOS:** O etanol 50% causou severa lesão gástrica (45.72±3.4 mm²). A administração de NaHS (8.44±5.7 mm²) e do Reagente de Lawesson's (19.45±7.1mm²) reduziram significativamente a lesão por álcool no estômago. Entretanto, os inibidores da CSE potencializaram a lesão, com a propargilglicina apresentando um maior efeito (76.23±10.6). **DISCUSSÃO:** O H₂S possui um efeito protetor contra a lesão gástrica induzida etanol em camundongos. **Apoio Financeiro:** CAPES, CNPq

06.031

ANTI-INFLAMMATORY AND ANTI-OEDEMATOGENIC EFFECTS OF A D-GALACTOSE BINDING LECTIN ISOLATED FROM *Synadenium carinatum* LATEX

Costa, D. S. M.¹; Rogerio, A. P.¹; Cardoso, C. R.²; Souza, M. A.³; Faccioli, L. H.⁴; Calixto, J. B.¹ - ¹UFSC - Farmacologia; ²FMRP - USP - Imunologia; ³UFU - Laboratório de Imunoparasitologia - ICBIM; ⁴FCFRP - USP - DACTB

Introduction: Extracts from the plant *Synadenium carinatum* EUPHORBIACEAE latex are widely used in folk medicine to treat several inflammatory disorders. Nevertheless the mechanisms underlying these effects remain undefined. The lectin isolated from *Synadenium carinatum* latex (ScLL) is supposed to be in part responsible for these anti-inflammatory effects. Here we have assessed the anti-inflammatory activities of ScLL in models of acute inflammation. **Methods:** We tested the anti-inflammatory activity of the ScLL in mice (male Swiss, 25-30 g) injected intraperitoneally (i.p.) with β -glucan present in fraction 1 (F1) of the *Histoplasma capsulatum* cell wall (a model of acute eosinophilic inflammation), suspended in 1 mL PBS (100 mg/ml). Control animals received PBS. Animals injected with F1 were treated orally (0.3 mL) with PBS or ScLL (1 mg/kg, 1 h prior to F1). Twenty-four hours after injection of F1, animals were submitted to euthanasia and cells from peritoneal cavities were harvested by injection of 3 mL PBS containing 0.5 % sodium citrate (PBS/SC). Following harvesting the differential cell counting was performed. In another set of experiments, paw oedema was induced in mouse by intraplantar injection (i.pl., 20 μ L) of carrageenan (300 mg/paw) into the right hind paw. The contralateral (left) paw was injected with the same volume of PBS and was used as control. Animals were pretreated with ScLL (1 mg/kg, p.o.) or with dexamethasone (0,5 mg/kg, s.c, positive control) 1h and 4h prior to carrageenan administration, respectively. The increase in paw volume was measured at different time points (30 min to 4h) with the use of a plethysmometer. After 4h of carrageenan injection, the animals were killed and the subcutaneous tissue of the injected paws was removed and neutrophil infiltration into the mouse plantar tissue was evaluated indirectly by measuring myeloperoxidase activity (MPO). The results were expressed as optical density per mg of tissue. **Results:** Oral administration of ScLL (1 mg/kg) significantly inhibited neutrophil (76 ± 6 %) and eosinophil (97 ± 1 %) recruitment into the peritoneal cavity induced by F1. Moreover, mice treated with ScLL presented a significantly reduced oedematogenic response induced by carrageenan, with inhibition in all time points evaluated. ScLL and dexamethasone treatment also significantly prevented the increase of MPO activity induced by carrageenan, with inhibition of 96 ± 3 % and 88 ± 5 % respectively. **Conclusion:** The present study show a significant anti-inflammatory activity for ScLL, providing the first description of a compound isolated from *Synadenium carinatum* extracts with anti-inflammatory properties. Our findings provide new perspectives on the possible therapeutic use of ScLL as anti-inflammatory agents. **Supported by:** CAPES, CNPq and FAPESP.

06.032

PAPEL DE MEDIADORES LIPÍDICOS NO EDEMA DE PATA INDUZIDO PELO VENENO DA SERPENTE *Bothrops moojeni*

Nascimento, N. G.¹; Olivo, R. A.¹; Sampaio, M. C.¹; Teixeira, C. F. P.¹ - ¹Instituto Butantan - Farmacologia

Introdução: O veneno da serpente *Bothrops moojeni* (VBm) induz uma reação local intensa, com edema grave, hemorragia e mionecrose em humanos e em animais de experimentação. Dentre os mediadores que modulam a inflamação estão os derivados do metabolismo do ácido araquidônico, porém não se conhece a participação desses mediadores no efeito edematogênico causado pelo VBm. O objetivo deste trabalho foi avaliar a participação de mediadores lipídicos, derivados da ciclooxigenase e lipoxigenase, no edema de pata induzido pelo VBm. **Metodologia:** Foram utilizados camundongos Swiss machos (18 a 20 g.). O edema foi medido por pletismografia (15 min, 30 min, 1 h, 3 h, 6 h e 24 h) após a injeção intraplantar de VBm (1 mg/pata direita) e salina (50 mL/pata contralateral). Grupos de animais foram tratados com dexametazona (1 mg/Kg, i.p.), um inibidor de FLA₂, 2 h antes do VBm ou com indometacina (1 mg/Kg, i.v.), inibidor da ciclooxigenase-1, 30 min antes do VBm ou com refecoxib (6 mg/Kg, p.o.), inibidor da ciclooxigenase- 2, 2 h antes do VBm, ou com zileuton (100 mg/Kg, p.o.) inibidor de lipoxigenase, 2 h antes do VBm ou com indometacina (1 mg/Kg, i.v.), associado ao cetotifeno (5 mg/Kg i.p.), estabilizador de membrana de mastócitos, 30 min antes do VBm, ou com salina, nas vias e tempos de latência correspondentes aos diferentes tratamentos (controle). **Resultados:** A injeção intraplantar de VBm causou aumento do volume das patas entre 15 min e 6 h, atingindo níveis basais na 24^a h (48,8 ± 1,6; 78,0 ± 1,8; 70,9 ± 2,0; 41,0 ± 1,8; 22,1 ± 1,0; 5,7 ± 1,0 % nos períodos de 15, 30 min; 1, 3, 6 e 24 h, respectivamente; n = 8). O pré-tratamento dos animais com dexametazona reduziu de forma significativa o edema de pata induzido pelo VBm, entre 30 min e 6 h (28,4; 32,7; 37,3; e 85,1 %; nos períodos de 30 min; 1, 3 e 6 h, respectivamente; $p < 0,002$; n = 7) em relação ao controle. A indometacina reduziu o edema induzido pelo VBm, de modo significativo entre 15 min e 3 h, com percentual médio de 41,7 ($p < 0,0002$ vs controle, n = 6), enquanto o refecoxib reduziu o edema podal entre 1 e 3 h da injeção do veneno em percentuais de 32,6 e 37,8, respectivamente, se comparados aos controles ($p < 0,004$; n = 5). O inibidor de lipoxigenase reduziu significativamente o volume das patas aos 30 min e 1 h (18,2 e 34,9 %, respectivamente; $p < 0,03$ vs controle, n = 6). Por outro lado, o tratamento concomitante da indometacina com o cetotifeno aboliu o desenvolvimento do edema causado pelo VBm, em relação ao controle. **Discussão:** Os resultados demonstram que os metabólitos do ácido araquidônico são relevantes para o efeito edematogênico do VBm. Os derivados da COX-1 participam da resposta inicial, enquanto os derivados da COX-2 parecem atuar a seguir. Além disso, os mediadores lipídicos parecem atuar de modo associado a outros liberados pelos mastócitos, para desenvolvimento do edema causado pelo VBm.

Apoio financeiro: FAPESP, CAPES e SSPSP.

06.033

ROLE OF ANNEXIN-A1 IN THE REGULATION OF LUNG FIBROSIS AND REMODELLING INDUCED BY BLEOMYCIN

Damazo, A. S.¹; Oliani, S. M.¹; Perretti, M.² - ¹UNESP - IBILCE - Biology; ²The William Harvey Research Institute - Centre of Biochemical Pharmacology

Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is a chronic, progressive form of interstitial lung disease. The process is known to involve activation of multiple cell types like fibroblast and leukocytes, resulting in cytokine release and elevated collagen expression. The modulation of these processes is of great importance¹. Several studies have recently shed some light on biochemical pathways centered on endogenous inhibitors endowed with counter-regulatory functions. Our focus has been the protein annexin-A1 (AnxA1), a potent inhibitor of leukocyte trafficking in acute and chronic inflammation, with a particular efficacy on leukocyte/endothelium interaction². The aim of this study was to explore the effects of the AnxA1 peptidomimetic, Ac2-26, in the regulation of the mechanisms involved in the pulmonary fibrosis using a well characterized model induced by bleomycin (Bleo) in mice. Pulmonary fibrosis was induced by i.t. administration of Bleo suspended in sterile PBS at 0.15 U/Kg. Another group was daily treated with 1 mg/Kg of peptide Ac2-26 i.p. Control mice received PBS only. At 0, 7, 14 or 21 days after i.t. administration, mice (n = 5 per group) were anesthetized and underwent either blood collection or bronchoalveolar lavage (BAL). Fragments of lung were collected, fixed in 4% paraformaldehyde, dehydrated in ethanol, clarified in xylene and embedded in paraplast. Sections were cut, mounted on slides, and stained with Masson's Trichrome for leukocyte quantification and connective tissue analysis. For collagen analysis the total lung hydroxyproline assay was used. Finally, AnxA1 protein expression was analyzed by immunogold labeling³. Data were analyzed by ANOVA and were expressed as the mean \pm SEM taking a P value less than 0.05 as significant. Bleo treated mice showed a significant increase in their hydroxyproline lung content in comparison with sham mice. The morphological analysis also indicated the presence of dense fibrotic areas. The daily administration of peptide Ac2-26 decreased significantly the hydroxyproline content and showed consistently less fibrotic response. The Bleo produced a rapid influx of leukocytes from the blood stream to the alveolar space. In the groups of mice treated with the peptide Ac2-26, this response was attenuated with a reduction of leukocytes in the BAL. Prompted by functional alterations detected in the AnxA1 during a model of cystic fibrosis³, we then monitored the AnxA1 expression. The epithelial cells and resident leukocytes expressed the AnxA1 under basal conditions. However, the fibrosis response reduced the AnxA1 expression. Finally the administration of peptide Ac2-26 increased the endogenous AnxA1 in the lung. In conclusion, the results of this study confirm and extend previous observations on the importance of AnxA1 in the pathogenesis of pulmonary fibrosis. This findings point to AnxA1 as a potential early and key regulator of cytokine cascades that modulates the fibrotic process and how this profile could be exploited by bioactive peptides as possible new therapeutic targets. **References:** (1) Fichtner-Feigl et al., **Nat Med**, v.12, p.99, 2006. (2) Damazo et al., **Am J Pathol**, v.166, p.1607, 2005. (3) Bensalem et al., **Mol Cell Proteomics**, v.4, p.1591, 2005. **Supported by:** FAPESP

06.034

ANÁLISE HEMATOLÓGICA E MORFOMÉTRICA DOS EFEITOS DO USO CRÔNICO DE BETAMETASONA EM RATAS DA LINHAGEM FISCHER-344

Buzelle, S. L.¹; Barros, W. M.²; Rosa, S. I. G.¹; Ribeiro, R. V.³; Semenoff, T. D. V.¹; Semenoff, A. S.¹ - ¹UNIVAG - GPA de Ciências da Saúde; ²UNIVAG - Farmácia; ³UFMT - Ciências Médicas

Introdução Em doenças inflamatórias crônicas, o uso prolongado de fármacos que suprimam a resposta inflamatória é uma alternativa para melhorar a qualidade de vida dos seres humanos. Ratos da linhagem Fischer-344 apresentam resposta exacerbada frente a estímulos químicos. O objetivo foi avaliar através de parâmetros hematológicos e morfométricos, o efeito do uso crônico de betametasona em ratos da linhagem Fischer-344. **Metodologia** Foram selecionadas 36 ratas adultas, da espécie *Rattus norvegicus*, linhagem Fischer, divididas aleatoriamente em grupo betametasona - GB - (n=12), sham - GS - (n=12) e controle - GC - (n=12). O GB recebeu, durante 2 meses, injeções diárias de betametasona 1 mg/Kg e GS recebeu, da mesma maneira, 0,1 mL de soro fisiológico. Após anestesia, procedeu-se incisão da pele e barreira abdominal e visualização da veia cava posterior. Realizou-se a punção sanguínea por coleta a vácuo, em tubos com EDTA. Procedeu-se a análise hematológica, por examinadores cegos e treinados, com os seguintes parâmetros: contagem total de eritrócitos e leucócitos, hemoglobina, hematócrito, VCM, HCM e CHCM. Para análise morfométrica foram considerados os pesos de baço, timo e adrenais. **Resultados** O teste ANOVA seguido de Bonferroni, demonstrou que em relação à análise hematológica o número de leucócitos do GB ($3,87 \pm 1,42$) foi menor comparado com GS ($5,74 \pm 1,23$) e GC ($6,51 \pm 1,90$). A concentração de hemoglobina e CHCM mostraram-se aumentados no GS ($14,97 \pm 2,44$ e $31,93 \pm 6,24$), em relação aos demais grupos (hemoglobina GB = $12,31 \pm 0,68$ e GC = $12,16 \pm 1,93$; CHCM GB = $24,61 \pm 1,66$ e GC = $25,47 \pm 4,11$). Nos demais parâmetros hematológicos inexisteram diferenças estatísticas. Os resultados da análise morfométrica demonstraram diferenças em relação ao baço, tendo peso menor no GB ($0,47 \pm 0,09$) em relação aos demais grupos (GC = $0,62 \pm 0,07$ e GS = $0,56 \pm 0,11$). **Conclusão** Conclui-se que em ratos da linhagem Fischer-344 o uso prolongado de betametasona conduziu à modificações hematológicas e morfométricas. **Apoio Financeiro:** FAPEMAT

06.035

ANTI-HYPERALGESIC AND ANTI-INFLAMMATORY PROPERTIES OF AMYRIN OCTANOATE

Marcon, R.¹; Luiz, A. P.¹; Soldi, C.²; Pizzolatti, G. M.²; Santos, A. R. S.³ - ¹UFSC - Farmacologia; ²UFSC - Química; ³UFSC - Fisiologia

INTRODUCTION: Previous data from our group have demonstrated that Amyrin Octanoate (AO), a semi-synthetic compound derived from alpha and beta-amyrin, shows a significant anti-nociceptive effect in different animal models of nociception in mice (unpublished data). In the present study, we sought to evaluate the possible anti-hyperalgesic and anti-inflammatory effects of AO. **METHODS:** Female *Swiss* mice (25-30g, n=6-8/group) and female *Wistar* rats (250-350g, n=4-6/group) were used in these experiments. AO (0.1 or 1 mg/kg, i.p.) was administered and 30 minutes later the paw hyperalgesia was induced by the intraplantar injection of 0.1 ml of bradykinin (BK; 3 nmol/paw), or prostaglandin E₂ (PGE₂; 10 nmol/paw) or phorbol miristate-acetate (PMA; 0.1 nmol/paw). Thirty minutes later, the animals were evaluated in Hargreaves (thermal hyperalgesia) and Randall & Sellito (mechanical hyperalgesia) models. Animals treated with BK received a subcutaneous injection of captopyrl (5 mg/kg) 1h earlier, in order to prevent BK degradation. The possible anti-inflammatory effect of AO was evaluated in mice which received an intraocular injection of Evans blue (25 mg/kg) 24h before the treatment with AO (0.1-10 mg/kg, i.p.) or dexamethasone (DEX; 0.5 mg/kg, s.c.). Thirty or sixty min after the treatment with AO or DEX, respectively, the animals received an intra-pleural injection of carrageenan 1% in 0.1 ml. Four hours later, mice were sacrificed by cervical dislocation and exudates from pleural cavity were collected in 1 ml of saline/heparin solution and plasma extravasations were determined by reading in a spectrophotometer at 550 nm using an Evans blue standard curve. The total and differential number of cells was also assessed in the exudates. **RESULTS:** AO 0.1 mg/kg, but not at 1 mg/kg, was effective in inhibiting the mechanical hyperalgesia induced by PGE₂ in 68±4%. The PMA-induced mechanical hyperalgesia was inhibited by AO at both 0.1 and 1 mg/kg doses with inhibition of 82±12% and 74±9%, respectively. Neither the treatments with AO 0.1 nor 1 mg/kg was able to inhibit the mechanical hyperalgesia elicited by BK. The thermal hyperalgesia induced by PGE₂ was inhibited by AO at both 0.1 and 1 mg/kg doses with inhibition of 46±10% and 51±21%, respectively. AO 1 mg/kg, but not at 0.1 mg/kg, was able to inhibited the PMA-induced thermal hyperalgesia in 76±4%. Curiously, only AO 0.1 mg/kg, but not at 1 mg/kg, inhibited the thermal hyperalgesia elicited by BK in 46±9%. Pretreatment with AO inhibited the total leukocytes number in a dose-related manner with inhibition at the dose of 10 mg/kg of 57±10% while the pretreatment with DEX inhibited this parameter in 63±8%. The ID₅₀ calculated to AO was 4.58 (2.3 – 9.11) mg/kg. The neutrophil number was also inhibited in a dose dependent manner with inhibition of 72±5% at the dose of 10 mg/kg and ID₅₀ calculated of 4.68 (2.65–8.27) mg/kg, DEX inhibited this parameter in 71±11%. The amount of mononuclear cells was altered by neither AO nor DEX treatments. DEX, but not AO, was able to inhibit the plasma extravasations in 33±7%. **CONCLUSIONS:** Our results demonstrated that AO exhibited anti-hyperalgesic and anti-inflammatory effects. Further experiments are now being conducted to investigate the mechanisms underlying these effects. **Supported by:** CNPq, CAPES, FAPESC, UFSC

06.036

AVALIAÇÃO DO EFEITO CITOPROTETOR DA AMIFOSTINA NA CARDIOTOXICIDADE INDUZIDA POR DOXORUBICINA

Freire, R. S.¹; Canoco, B. M.²; Oliveira, M. R.³; Freire, J. A. K.³; Brito, G. A. C.⁴; Ribeiro, R. A.⁵ - ¹UFC - Fisiologia e Farmacologia; ²UFC - Medicina; ³UFC - Física; ⁴UFC - Morfologia; ⁵UFC - Fisiologia e Farmacologia - UNIFAC

Introdução: A amifostina, um citoprotetor de amplo espectro com o potencial de proteger diversos órgãos e tecidos contra a toxicidade da radioterapia e/ou da quimioterapia. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito citoprotetor da amifostina na cardiotoxicidade induzida por doxorubicina. **Método:** Camundongos C57 black pesando entre 20-25g foram divididos em 6 grupos (n=6). Os animais foram tratados com amifostina (AMF) 25, 50 e 100 mg/Kg SC, dexrazoxano (CXZ-cardioxane) 500 mg/Kg IP, clássico citoprotetor clinicamente utilizado, e 0,1mL de solução salina (0,9%) 30 min antes da aplicação de 25 mg/Kg de doxorubicina (DXR). O grupo controle foi tratado apenas com 0,1mL de solução salina (0,9%). Após 72 horas do tratamento os animais foram anestesiados com tribromoetanol 25mg/Kg, submetidos a eletrocardiograma para avaliação de alterações dos segmentos QT e QRS e a coleta de amostra sanguínea para dosagem de enzimas CK e CK-MB. Em seguida os animais foram sacrificados para excisão dos corações. A análise histológica foi realizada por microscopia de força atômica (AFM) e ótica para obtenção de detalhes da estrutura do tecido cardíaco. **Resultados:** A amifostina nas doses de 50mg/Kg (QT, 83,0±1,34ms; QRS 50,6±0,60ms; CK, 194,0±1,95U/L; CK-MB, 86,0±5,0U/L) e 100mg/Kg (QT, 84,3±1,66ms e QRS, 50,8±2,16ms CK, 237,6±2,58U/L; CK-MB, 66,0±5,0U/L) foi capaz de reduzir o aumento dos intervalos QT e QRS do eletrocardiograma e o aumento das enzimas cardíacas CK e CK- MB causado pelo dano cardíaco da DXR 25mg/Kg (QT, 98,5±1,85ms; QRS, 57,2±1,70ms; CK, 605,7±14,75U/L; CK-MB, 180,0±10,0U/L), esta redução foi estatisticamente significativa. Os resultados dos grupos tratados com amifostina foram equivalentes aos dos grupos salina (QT, 81,8±1,20ms e QRS, 44,5±0,86ms CK, 121,0±10,46U/L; CK-MB, 80,0±5,0U/L) e dexrazoxano (QT, 80,83±1,13ms e QRS, 46,4±1,56ms CK, 176,2±31,86U/L; CK-MB, 146,0±5,0U/L) p<0,05 ANOVA – Bonferroni. A amifostina nas doses testadas também preveniu o dano tecidual causado pela DXR. Fato observado pela diminuição ou ausência da desorganização celular (detalhada por AFM), da vacuolização, da congestão vascular e da necrose das fibras cardíacas. **Discursão:** A amifostina nas doses de 50mg/Kg e 100mg/Kg mostrou um efeito de proteção cardíaca no modelo utilizado. Os resultados deste estudo, aliados a outros de mecanismo de ação, poderão dar-nos suporte à futuras investigações do papel protetor da amifostina na cardioxicidade induzida por doxorubicina em humanos. **Apoio Financeiro:** CNPq

06.037

NF- κ B AND CPLA₂ ARE INVOLVED IN COX-2 EXPRESSION AND PROSTAGLANDINS BIOSYNTHESIS INDUCED BY TWO SECRETORY PLA₂ (SPLA₂S) ISOLATED FROM *Bothrops asper* VENOM (BAV)

Moreira, V.¹; Souto, P.¹; Gutiérrez, J. M.²; Teixeira, C. F. P.¹ - ¹Instituto Butantan - Farmacologia; ²Universidade da Costa Rica - Instituto Clodomiro Picado

Introduction: Four myotoxins with sPLA₂ structure were isolated from Bav. Two of them are the myotoxin-III (MT-III), with catalytic activity and myotoxin-II (MT-II) which lacks enzymatic activity due to substitution of the amino acid Asp by Lys at position 49. Despite this difference, both display inflammatory effects. We previously showed that these sPLA₂s promote the synthesis of PGD₂ and PGE₂, with distinct time-courses and induce COX-2 expression in resident peritoneal macrophages. Considering that the transcription factor-kappa B (NF- κ B) is relevant for induction of COX-2 protein and that intracellular PLA₂s such as, cytosolic PLA₂ (cPLA₂) and Ca⁺²-independent (iPLA₂) can cooperate with sPLA₂ for biosynthesis of prostaglandins in leukocytes, we evaluated the involvement of these factors on MT-II- and III-induced expression of COX-2 and production of PGD₂ and PGE₂.

Methods: Peritoneal resident macrophages were obtained from male Swiss mice and incubated with MT-II or III 6.5 μ g/mL, for 4.5 or 6 h. The involvement of NF- κ B in COX-2 expression was evaluated by using the inhibitors TPCK (2.5 μ M) and SN50 (50 mg/ml). To study participation of cPLA₂ and iPLA₂ compounds AACOCF₃ (20 μ M) and PACOCF₃ (4 μ M) were used. COX-2 was determined by western blotting and PGE₂ and PGD₂ by enzyme immuno assay (EIA).

Results: Preincubation of isolated macrophages with TPCK, blocked COX-2 expression induced by MT-III and decreased by 50% the expression induced by MT-II ($p < 0.05$ vs control). In addition, treatment of cells with compound SN50 significantly reduced COX-2 expression induced by MT-II and MT-III (50 and 70% average, respectively; $p < 0.05$ vs control). Stimulation of macrophages with MT-II or MT-III increased the release of both PGD₂ (0.07 \pm 0.013; 0.6 \pm 0.1; 0.6 \pm 0.043 ng/mL for control, MT-II and MT-III, respectively; $p < 0.05$) and PGE₂ (0.4 \pm 0.1; 12.8 \pm 0.8; 9.7 \pm 0.9 ng/mL for control, MT-II and MT-III, respectively; $p < 0.05$). Inhibition of cPLA₂ by pretreating cells with compound AACOCF₃ markedly reduced PGD₂ and PGE₂ increments caused by both MT-II and MT-III ($p < 0.05$) whereas inhibition of iPLA₂ by PACOCF₃ did not affect these parameters. However, these inhibitors did not change the expression of COX-2 induced by both myotoxins.

Discussion: The obtained data indicate that NF- κ B is critical in the induction of COX-2 by both MT-II and MT-III in macrophages and that cPLA₂ is important for their stimulatory effect on PGD₂ and PGE₂ synthesis acting by a pathway different from COX-2 expression. In contrast, iPLA₂ does not participate in MTs-induced up-regulation of PGs cascade. Since MT-II lacks enzyme activity the phospholipase activity alone is not relevant for activation of this cascade. These findings show novel regulatory mechanisms for secretory PLA₂s in inflammatory cells. **Supported by:** FAPESP, CNPq.

06.038

PAPEL DO MASTÓCITO E DA HISTAMINA NO EFEITO LOCAL AGUDO CAUSADO PELO VENENO DA SERPENTE *Bothrops moojeni*

Souto, P.¹; Nascimento, N. G.¹; Lima, S. A.¹; Leiguez Jr, E.¹; Sampaio, M. C.¹; Olivo, R. A.¹; Matsubara, M. H.¹; Fernandes, C. M.¹; Moreira, V.¹; Teixeira, C. F. P.¹ - ¹Instituto Butantan - Farmacologia

Introdução: O veneno da serpente *Bothrops moojeni* (VBm) induz reações locais graves em humanos, caracterizadas por edema, hemorragia e mionecrose. Os mastócitos são células centrais na defesa do organismo, por sua capacidade de liberar uma vasta gama de mediadores que inclui a histamina. No entanto, não se conhece a participação do mastócito e seus mediadores nos efeitos locais causados pelo VBm. Este estudo visa caracterizar os efeitos locais induzidos pelo VBm em camundongos e a participação do mastócito e da histamina nesses efeitos. **Métodos:** Foram utilizados camundongos Swiss machos (18 a 22 g). O edema foi medido por pletismografia (15 min, 30 min, 1, 3, 6 e 24 h) após a injeção intraplantar (i.pl.) de VBm (1 mg/pata direita) e salina (50 mL/pata contralateral) como controle. Para o estudo do influxo leucocitário, os animais receberam injeção intraperitoneal (i.p.) de VBm (5 mg/animal) ou salina apirogênica (controle) e após 1, 3 e 6 h, foi realizada a lavagem da cavidade peritoneal para análise do infiltrado leucocitário em alíquotas diluídas em solução de Turk (1:20, v/v) e contagem total de leucócitos em câmara de Neubauer. A hemorragia foi quantificada pela determinação colorimétrica da hemoglobina após reação com solução de Drabkin após 2 h da injeção intradérmica (i.d.) de VBm (20 mg/animal) ou salina apirogênica (controle). Grupos de animais foram pré-tratados com cetotifeno (5 mg/kg, i.p.), estabilizador da membrana de mastócito ou pirilamina (10 mg/kg, i.p.), antagonista H₁ de histamina ou ranitidina (10 mg/kg, i.v.), antagonista H₂ de histamina, 30, 20 e 10 min. antes da injeção do VBm, respectivamente, ou salina apirogênica por vias e tempos de latência correspondentes aos diferentes tratamentos (controle). **Resultados:** A injeção i.pl. de VBm causou edema podal significativo desde os 15 min até as 6 h, com resposta máxima aos 30 min., decaindo a níveis basais nas 24 h. O pré-tratamento dos animais com cetotifeno ou pirilamina ou ranitidina reduziu significativamente o perfil temporal do edema induzido pelo VBm, em taxas que variaram de 44% a 83%. A injeção i.p. do VBm induziu um aumento significativo do número de leucócitos para o peritônio entre 3 e 6 h, com pico na 6^a h ($27,6 \pm 3,8 \times 10^5$ leucócitos/mL), quando comparado ao controle ($3,5 \pm 0,9 \times 10^5$ leucócitos/mL). O pré-tratamento dos animais com cetotifeno ou pirilamina não alterou o número dos leucócitos recrutados pelo veneno. O VBm causou extravasamento significativo de hemoglobina ($1,23 \pm 0,1$ mg/mL) na pele dos animais se comparado ao grupo controle ($0,2 \pm 0,1$ mg/mL). O pré-tratamento dos animais com cetotifeno, mas não com pirilamina ou ranitidina, diminuiu este efeito do veneno em 24%. **Discussão:** Os mastócitos são células relevantes para o edema e hemorragia mas não para o influxo leucocitário induzido pelo VBm. A histamina, o principal mediador dessa célula, contribui, via receptores H₁ e H₂, para a formação do edema, mas não para os demais eventos. Esta é a primeira demonstração de que os mastócitos são elementos moduladores importantes de diferentes eventos locais induzidos por venenos botrópicos. **Apoio financeiro:** CNPq e FAPESP

06.039

DOES ACUTE PULMONARY EXPOSURE TO BOTH DIESEL EXHAUST PARTICLES (DEP) AND QUINONES CAUSE SYSTEMIC EFFECTS?

Oliveira, J. F. de¹; Teles, A. M.¹; Yshii, L. M.¹; Santos, K. T.¹; Tavares de Lima, W.¹; Teixeira, S. A.¹; Lima, C.²; Barreto, M. A. A.¹; Muscara, M. N.¹; Costa, S. K. P.¹ - ¹ICB - USP - Farmacologia; ²Butantan Institute - imunologia

OBJECTIVES : Previously, intra-tracheal (i.tr.) injection of DEP or 1,2-naphthoquinone (1,2-NQ) evoked plasma extravasation and cell influx in rat airways. We now investigated whether simultaneous injection of these pollutants had a synergistic inflammatory action. We also determined the ability of DEP and 1,2-NQ-induced airway inflammation to evoke changes in the rat isolated thoracic aorta (RTA) and corpus cavernosum (RCC) reactivity using organ bath assays. RESULTS: Capsaicin- or vehicle-treated male Wistar rats received i.tr. injection of DEP (1 mg/kg) and 1,2-NQ (35 nmol/kg). After 15 min, DEP and 1,2-NQ produced a potent (additive) plasma extravasation in the trachea and bronchi, but not lung, compared with each compound alone. In capsaicin-treated rats or treated with tachykinin antagonists, the response was inhibited, suggesting an important role for C-fibres, primarily tachykinins. Increased MPO and cytokine levels were detected in bronchi of capsaicin-treated rats following 3 h treatment with pollutants. This treatment contributes to augment the ACh (10^{-9} - 10^{-4} M)-induced relaxation in the RTA but not in the RCC. In capsaicin-treated rats, the RTA response to the pollutants was not affected but it was capable of evoking a marked relaxation in RCC in animals challenged with pollutants. CONCLUSIONS: 1,2-NQ exacerbates DEP-induced plasma extravasation and MPO activity in the airways, indicating a neurogenic mechanism through tachykinins. The exposure to DEP and 1,2-NQ affects the endothelium-dependent response in RTA without interfering with RCC. Neuropeptides are unlikely to affect the pollutants-induced changes in the RTA. We thank MA Alves for technical assistance. **Supported by:** CAPES, CNPq, Fapesp

06.040

EFEITOS INFLAMATÓRIO E HIPERALGÉSICO ARTICULARES CAUSADOS POR UMA METALOPROTEINASE ISOLADA DE VENENO DE SERPENTE

Fernandes, C. M.¹; Rocha, F. A.²; Leite, A. C. R. M.²; Gutiérrez, J. M.³; Teixeira, C. F. P.¹ - ¹Instituto Butantan - Farmacologia; ²UFC - Medicina Clínica; ³Universidade da Costa Rica - Instituto Clodomiro Picado

Introdução: As doenças inflamatórias articulares acometem grande parte da população mundial, com considerável morbidade e mortalidade para algumas delas. A limitação dos movimentos é uma consequência grave e o alívio da dor é o objetivo principal no tratamento dessas doenças. Porém, pouco se sabe sobre os mecanismos envolvidos no seu desencadeamento. As metaloproteinases (MPs) são encontradas em níveis elevados em processos patológicos como a artrite reumatóide e são associadas apenas à degradação da cartilagem. A partir do veneno da serpente *Bothrops asper* foi isolada a MP BaP1, com atividade inflamatória e de alta homologia com as MPs de mamíferos. Este estudo visou avaliar os efeitos da BaP1 quanto: i) a reação inflamatória na articulação de ratos, analisando o aumento da permeabilidade vascular (PV), o influxo leucocitário, a liberação de TNF- α e PGE₂ e as alterações histopatológicas; ii) a incapacitação articular; iii) a expressão da ciclooxigenase-2 (COX-2) por macrófagos isolados e iv) a participação do TNF- α e PGE₂ no influxo leucocitário e na incapacitação articular. **Métodos:** Ratos Wistar machos receberam injeção intra-articular (i.art.) de BaP1 ou BSA (controle) (2–8mM). Entre 30min e 48h, avaliou-se o aumento de PV pelo extravasamento de azul de Evans, o influxo leucocitário pela contagem total das células em câmara de Neubauer e diferencial em esfregaços corados com Hema3, a liberação de TNF- α pelo ensaio de citotoxicidade sobre células L929 e de PGE₂ por ensaio imunoenzimático. Alterações da membrana sinovial foram analisadas histopatologicamente em cortes corados com hematoxilina-eosina; a incapacitação articular foi determinada pelo método da roda giratória e a expressão de COX-2 por W. blotting. Grupos de animais foram pré-tratados com indometacina (4mg/Kg) ou soro anti-TNF- α (50ml) ou seus veículos (controles), para avaliação do influxo leucocitário, incapacitação articular e liberação de PGE₂ articulares. **Resultados:** A BaP1 causou aumento da PV entre 1-6h após injeção i.art., com pico aos 90min. Esta MP induziu acúmulo de leucócitos totais (1-48h), com predomínio de polimorfonucleares até 6h e mononucleares a partir de 12h de sua injeção. A liberação de TNF- α e PGE₂ foi observada a partir de 30min da injeção de BaP1, com pico de TNF- α na 6^ah. A análise histológica mostrou a presença de infiltrado leucocitário abundante e áreas edemaciadas, em todos os tempos estudados (3-24h). Ainda, a BaP1 induziu incapacitação articular entre 1 e 6h. O pré-tratamento com indometacina ou anti-TNF- α reduziu a incapacitação e o influxo leucocitário, induzidos pela BaP1, na 3^ah. No entanto, o pré-tratamento com anti-TNF- α não alterou a liberação de PGE₂ induzida pela toxina na 6^ah. Ainda, a BaP1 induziu expressão de COX-2 em macrófagos isolados (1-6h). **Discussão:** A BaP1 é capaz de induzir inflamação e hipernocicepção articulares em ratos. Estes fenômenos envolvem aumento de TNF- α e PGE₂ articulares e expressão de COX-2. Estes dados indicam que as MPs são agentes desencadeadores de eventos inflamatórios articulares e não apenas elementos da degradação da cartilagem articular. Portanto, estas enzimas devem constituir um alvo importante para o tratamento da sintomatologia de artropatias inflamatórias. **Apoio Financeiro:** FAPESP (03/08529-9; 06/50723-5)

06.041

PROTECTIVE EFFECT OF TRANSIENT RECEPTOR POTENTIAL VANILOID-1 (TRPV1-RECEPTORS) ON DIESEL EXHAUST PARTICLES AND 1,2-NAPHTHOQUINONE-INDUCED AIRWAY INFLAMMATION

Oliveira, J. F. de¹; Favaro, R.²; Tam, C.³; Zorn, T. M. T.²; Riffo-Vasquez, Y.⁴; Brain, S.⁵; Costa, S. K. P.¹ - ¹ICB - USP - Farmacologia; ²ICB - USP - Histologia; ³King's College London - Cardiovascular Division; ⁴King's College London - Pharmacology; ⁵King's College London - Center for Cardiovascular Biology and Medicine

We have previously shown that simultaneous intra-tracheal injection of diesel exhaust particles (DEP) and 1,2-napthoquinone (1,2-NQ) caused a potent inflammation in rat airways partially dependent on neurogenic-mediated mechanism. This study investigates the mechanism of action of these pollutants using inflammatory assays and histopathological approach in the lung and trachea of wild type (WT) and TRPV1 knockout (KO) mice exposed to DEP and 1,2-NQ. DEP (1 mg/kg) and 1,2-NQ (35 nmol/kg)-induced airway inflammation was assessed via ¹²⁵I-labelled albumin 1 h post pollutants injection. MPO assay and Histopathology were performed 3 h after treatment. Staining of lung and trachea specimens with H&E provided a profile of cell infiltration in both WT and KO animals. Results: Injection of DEP and 1,2-NQ evoked a potent plasma extravasation into the trachea and lung of WT, but no TRPV1 KO, suggesting these pollutants act via a TRPV1-mediated mechanism. In contrast, MPO activity in the airways of TRPV1 KO mice was exacerbated compared to WT mice data. Likewise, the histopathology revealed high numbers of leucocytes and macrophages infiltrated into the lungs and trachea of TRPV1 KO mice compared to WT. Conclusions: Inhibition of increased microvascular permeability in the airways of TRPV1 KO mice treated with pollutants suggests that these receptors are the predominant mechanism involved in the plasma extravasation but not in the leukocyte influx, thus providing evidence that these receptors in the peripheral endings of primary afferent neurons play a counter-regulatory mechanism in DEP and 1,2-NQ-induced airways inflammation. **Supported by:** CAPES, CNPq, Fapesp

06.042

JM 25-1, A NON ANESTHETIC LIDOCAINE DERIVATIVE, INHIBITS ALLERGEN-INDUCED LUNG INFLAMMATION AND AIRWAYS HYPERREACTIVITY IN SENSITIZED MICE

Serra, M. F.¹; Oliveira, J. S.¹; Santos, T. P. O.¹; Cardozo, S. V. S.¹; Ribeiro, C. O.¹; Olsen, P. C.¹; Nascimento, J. B.¹; Pires, A. L. de A.¹; Costa, J. C. S.²; Cordeiro, R. S. B.¹; Silva, P. M. R. e¹; Martins, M. A.¹ - ¹FIOCRUZ - IOC - Fisiologia e Farmacodinâmica; ²FIOCRUZ - IOC - Far-Manguinhos

Background and AIM: Local anesthetics, particularly lidocaine, have received interest as possible new class of pharmacological agents for the treatment of asthma. Recently, we have demonstrated that JM25-1, non-anesthetic lidocaine analogue, was more potent than lidocaine in inhibiting allergen-induced tracheal spam. We sought to study here the putative anti-asthma effect of JM25-1 on allergen-evoked lung inflammation and airways hyperreactivity (AHR). **METHODS:** Mice of strain A/J were subcutaneously sensitized on days 1 and 14 by a mixture of Al(OH)₃ + ovalbumin (OVA) and daily challenged from days 19 to 22 by 25 µg OVA (25 µL, intranasal instillations i.n.), to establish a murine model of acute asthma characterized by airways inflammation and hyperreactivity (AHR). JM25-1 treatment (2%, 30 min) was aerosolized subsequently post-provocation. Dexamethasone (Dex) (25 µg/ 25 µL, i.n.), used as referential anti-inflammatory agent, was administered 1 h before provocation. Airway responsiveness (AHR) was measured by recording the Penh values evoked by inhaled metacholine 24 h post-challenge, using whole-body plethysmography. Eosinophil numbers were evaluated in samples of bronchoalveolar lavage (BALF). EPO and eotaxin lung levels were also quantified. **Results:** We observed that allergen provocation increased eosinophil numbers from zero in the controls to $532 \pm 72.7 \times 10^3$ (Mean \pm SEM, n=7) in BALF. Following JM25-1 and Dex eosinophil numbers reduced to $106.5 \pm 33.3 \times 10^3$, $3.1 \pm 0.5 \times 10^3$, respectively. EPO and eotaxin lung levels were also clearly inhibited by both DEX and JM25-1 treatments. On the other hand, AHR (1.2 ± 0.1 to 3.7 ± 0.4 penh) was significantly inhibited by JM 25-1 (2.5 ± 0.3 penh) but not DEX (3.5 ± 0.4 penh) in this model. **CONCLUSION:** Our findings show that aerosolized JM25-1 inhibits allergen-induced lung eosinophilic inflammation and airways hyperresponsiveness in a murine model of asthma that has expressed a certain degree of refractoriness to glucocorticoid treatment. Its ability to inhibit AHR under conditions where systemic administration of dexamethasone failed reinforce the interpretation that this substance deserve further investigation concerning a putative clinical application in the control of asthma. **Supported by:** FAPERJ, CNPq and PDTIS.

06.043

AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIINFLAMATÓRIO E ESPASMOLÍTICO DE JMF2-1, ANÁLOGO NÃO-ANESTÉSICO DE LIDOCAÍNA.

Ribeiro, C. O.¹; Serra, M. F.¹; Oliveira, J. S.¹; Santos, T. P. O.¹; Pires, A. L. de A.¹; Costa, J. C. S.²; Cordeiro, R. S. B.¹; Silva, P. M. R. e¹; Martins, M. A.¹ - ¹FIOCRUZ - IOC - Fisiologia e Farmacodinâmica; ²FIOCRUZ - IOC - Far-Manguinhos

Introdução: Recentemente, demonstramos que o novo análogo da lidocaína (JMF2-1), que foi sintetizado em Far-Manguinhos e selecionado por sua baixa atividade anestésica local, tem a capacidade de prevenir o broncoespasmo das vias aéreas induzido por metacolina em ratos “naives” e o infiltrado de neutrófilos e eosinófilos no pulmão de ratos ativamente sensibilizados. Neste estudo tivemos como objetivo avaliar o efeito do tratamento com lidocaína e JMF2-1 sobre a obstrução pulmonar crônica, tendo a dexametasona como fármaco de referência. **Métodos:** Camundongos A/J foram sensibilizados com 3 injeções intraperitoneais (i.p.) de ovoalbumina (OVA 50 µg/ 0,1 mL de salina estéril (NaCl. 0.9%) nos dias 1, 4 e 7. A partir do 12^o dia, os animais foram submetidos ao desafio intranasal (i.n.) de OVA (50 µg/25 µL de salina), administrada uma vez por semana, durante 9 semanas. Nos grupos controles a OVA foi substituída por seu veículo (salina) estéril. Os animais foram tratados com lidocaína e JMF2-1 (1%, aerossol) ou dexametasona (DEX-3 mg/Kg, por via oral) imediatamente após ou 1 h antes do desafio antigênico, respectivamente. A resposta espasmódica pulmonar observada após a provocação antigênica foi avaliada pela alteração nos valores de penh monitorados nos tempos de 1 h antes, e 1 h, 3 h e 6 h após 7^a, 8^a e 9^a semanas de estimulações com OVA ou salina. **Resultados:** Ao longo das sucessivas provocações, nas 3 semanas analisadas, observou-se um pico de aumento nos valores de Penh nos animais sensibilizados e desafiados com OVA no tempo de 3 h e uma tendência de redução 6 h após as provocações. Houve clara exacerbação dos valores de penh e tendência de sustentação do platô 3 e 6 h após 9^a semana. Os tratamentos com JMF2.1 e DEX apresentaram inibição da ordem de 60 a 70% no aumento de Penh, nos tempos de 3 e 6 h após a 7^a semana. Além disso, os grupos tratados com lidocaína e JMF2-1 bloquearam a obstrução de vias aéreas observadas na 8^a semana, que foram da ordem de 70 a 90%. O perfil de inibição da lidocaína foi mantido na 9^a semana, enquanto que o tratamento com JMF2-1 mostrou-se eficaz no tempo de 6 h, mas foi inativo no tempo de 3 h após a provocação, enquanto a DEX manteve alta a eficácia de bloqueio dos valores de penh. **Conclusão:** Os resultados demonstram que a marcada obstrução das vias aéreas pulmonares induzida por sucessivas provocações antigênicas foi claramente sensível aos tratamentos semanais com dexametasona, lidocaína e JMF2-1, mesmo quando iniciados após a terceira semana de provocação. **Apoio Financeiro:** CNPq, FAPERJ e PDTIS.

06.044

THE INBRED A/J MOUSE STRAIN DEVELOPS AN ALLERGEN-INDUCED AIRWAYS HYPERRESPONSIVENESS THAT IS PROGRESSIVELY RESISTANT TO GLUCOCORTICOID TREATMENT

Oliveira, J. S.¹; Ribeiro, C. O.¹; Santos, T. P. O.¹; Cardozo, S. V. S.¹; Anjos-Valotta, E. A. dos¹; Ferreira, T. P. T.¹; Cordeiro, R. S. B.¹; Hogaboam, C.²; Silva, P. M. R. e¹; Serra, M. F.¹; Martins, M. A.¹ - ¹FIOCRUZ - IOC - Fisiologia e Farmacodinâmica; ²University of Michigan Medical School, USA - Pathology

Aim: Although glucocorticoids (GC) are highly effective anti-asthmatic agents, a small subset of asthma patients shows persistent tissue inflammation and AHR despite treatment with high doses of GC. The mechanism behind such refractoriness is not clearly understood. Developed by LC Strong in 1921, the A inbred mouse strain is widely used in cancer and immunology research, including asthma. Since previous studies have demonstrated that the A/J mouse strain is remarkably sensitive to allergen-evoked lung remodeling and inflammation, we have investigated here the effectiveness of the GC therapy in a long-term A/J mouse-based model of asthma.

Methods: A/J mice were sensitized with ovalbumin (OVA, 50 mg/100 ml of saline, i.p.) on days 1, 4 and 7. They were then weekly challenged with OVA (50 mg/25 mL of saline), or vehicle, via intranasal route, for 9 weeks starting from day 12. The animals were subjected to treatment with dexamethasone (DEX, 3 mg/kg, oral), or vehicle, 1 h before provocation, from the third to the ninth week in the scheme 1, and from the seventh to ninth week in the scheme 2. Barometric plethysmography was employed for measurement of AHR, subjecting unrestrained conscious mice to sequential aerosolization of PBS and increasing concentrations of methacholine (3-6 mg/ml). Bronchoconstriction tests were performed 24 h post-challenge on the fourth and ninth week of successive allergen provocations, being the response expressed in terms of Penh (Enhanced Pause). The chemokines eotaxin (CCL-11), MDC (CCL-22), MARC (CCL-7) and TARC (CCL-17) were measured in the lung tissue by ELISA as markers of the inflammatory status. **Results:** We found that A/J mice reacted to the long-term sequence of intranasal allergen provocation with marked AHR, first noted within 4 wks, remaining significantly hyperreactive to methacholine throughout the 9 wks of analysis. Following scheme 1 of administration, DEX clearly blocked allergen-evoked AHR noted within 4 wks, but failed to alter the phenomenon within 9 wks. In the scheme 2, Penh values from DEX-treated asthmatic animals at week 9 were significantly superior as compared with those from saline-challenged mice when saline was aerosolized. Again no changes in the AHR was observed concerning DEX-treated and untreated animals. Increased lung tissue levels of CCL-11, CCL-22, CCL-7 and CCL-17 were clearly sensitive to DEX following scheme 1 but only CCL-22 increased levels was sensitive to DEX in the scheme 2. **Conclusion:** These findings show that the inbred A/J mouse strain develops an allergen-induced AHR and lung inflammation that is progressively resistant to GC treatment. We postulate that the A/J strain may be a useful approach for studying glucocorticoid resistance and asthma in the mouse. **Supported by:** CNPq e FAPERJ.

06.045

ATP VIA RECEPTOR P2X3 MEDEIA A LIBERAÇÃO ENDÓGENA DE CITOCINAS INFLAMATÓRIAS NA PATA DE RATOS

Oliveira, M. C.¹; Clemente-Napimoga, J. T.¹; Pelegrini-Da-Silva, A.¹; Parada, C. A.²; Tambeli, C. H.¹ - ¹FOP - UNICAMP - Ciências Fisiológicas; ²IB - UNICAMP - Ciências Fisiológicas

Introdução: O ATP é uma molécula que liberada para o meio extracelular contribui para o desenvolvimento do processo inflamatório (Kennedy, C., Nature, 377, 385, 1995). Considerando-se que durante o processo inflamatório a produção e a liberação de mediadores inflamatórios é mediada pelas citocinas (Ferreira, S.H., Nature. 334, 698, 1988), o objetivo desse trabalho foi verificar se o ATP endógeno via receptores P2X3 participa da liberação das citocinas pertencentes à cascata inflamatória (Cunha, F., Br J Pharmacol, 107, 660, 1992; Ferreira, S.H., Agents Actions, 38, C7, 1993). Métodos: A dosagem das citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-6 e CINC-1 foi realizada através da técnica de ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) na pele da pata de ratos retirada 3 horas após a co-administração de carragenina com o antagonista de receptor P2X1,3,2/3 TNP-ATP ou 1 hora após a administração do agonista de receptor P2X1,3,2/3 α,β -meATP. Resultados: A administração subcutânea de TNP-ATP (240 μ g/pata, n=8) reduziu significativamente o aumento da concentração tecidual de TNF- α , IL-6 e CINC-1 induzido pela carragenina (300 μ g/pata, n=8) em 70%, 51% e 56% respectivamente (p<0.05, teste Tukey), mas não reduziu o aumento da concentração tecidual de IL-1 β (p>0.05, teste Tukey). A administração subcutânea de α,β -meATP (50 μ g/pata, n=8) induziu um aumento significativo na concentração local de IL-1 β , IL-6 e CINC-1 em relação a administração de NaCl 0,9% em 91%, 303% e 487% respectivamente (p<0.05, teste Tukey), mas não alterou a concentração tecidual de TNF- α (p>0.05, teste Tukey). A injeção subcutânea de NaCl 0,9% (n=8) não alterou significativamente a concentração endógena de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e CINC-1 (p>0.05, teste Tukey) em comparação ao grupo naive (n=8). Discussão: Os resultados indicam que o ATP endógeno via receptor P2X3 participa da liberação tecidual das citocinas inflamatórias TNF- α , IL-6 e CINC-1 induzidas pela carragenina e que na liberação de IL-1 β ocorre pequena ou nenhuma participação do receptor P2X3. Além disso, o agonista de receptor P2X1,3,2/3 α,β -meATP aumenta substancialmente a concentração local das citocinas IL-1 β , IL-6 e CINC-1, mas não participa de modo significativo da liberação endógena de TNF- α . Deste modo, nós sugerimos que o ATP endógeno via receptor P2X3 atua na cascata de mediadores inflamatórios favorecendo a liberação de citocinas no processo inflamatório na pata de ratos. **Apoio Financeiro:** FAPESP 04/10592-3; 05/60870-2

06.046

PARTICIPAÇÃO DA GLUTATIONA NA CITOPROTEÇÃO DA CARDIOTOXICIDADE INDUZIDA POR DOXORUBICINA

Freire, R. S.¹; Canoco, B. M.²; Ribeiro, R. A.¹ - ¹UFC - Fisiologia e Farmacologia; ²UFC - Medicina

Introdução: A glutathione é um antioxidante hidrossolúvel, reconhecido como o tiol não proteico mais importante nos sistemas vivos, sua dosagem indireta e é normalmente utilizada para estimar o estado redox dos sistemas biológicos. A Doxorubicina (DXR) é um antibiótico antracíclico largamente utilizado na quimioterapia contra inúmeras neoplasias malignas e seu mecanismo de cardiotoxicidade está associado a dano celular por stress oxidativo, embora este processo não esteja de todo esclarecido. Objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da glutathione na cardiotoxicidade induzida por doxorubicina. **Método:** Camundongos C57 black pesando entre 20-25g foram divididos em 6 grupos (n=6). Os animais foram tratados com glutathione (GLT) 125, 250 e 500 mg/Kg SC, dexrazoxano (CXZ) 500 mg/Kg IP e 0,1mL de solução salina (0,9%) 30 min antes da aplicação de 25 mg/Kg de doxorubicina (DXR). O grupo controle foi tratado apenas com 0,1mL de solução salina (0,9%). Após 72 horas do tratamento os animais foram anestesiados com tribromoetanol 25mg/Kg e submetidos a eletrocardiograma para avaliação de alterações dos segmentos QT e QRS, após a realização do ECG foi feita coleta de amostra sanguínea para dosagem de enzimas CK e CK-MB seguida de sacrifício para excisão dos corações para dosagem dos grupos sulfidrilas não proteicos (NPSH) por ELISA. **Resultados:** A glutathione nas doses de 250mg/Kg (QT, 86,3±4,4ms; QRS 44,4±3,5ms; CK, 144,0±105U/L; CK-MB, 72±5U/L) e 500mg/Kg (QT, 84,2±1,2ms e QRS, 46,6±2,1ms CK, 194,0±5U/L; CK-MB, 153±10U/L) foi capaz de reduzir o aumento dos intervalos QT e QRS do eletrocardiograma e o aumento das enzimas cardíacas CK e CK-MB causado pelo dano cardíaco da DXR 25mg/Kg (QT, 106,2±1,4ms; QRS, 56,5±2,0ms; CK, 2040±205U/L; CK-MB, 573±10U/L), redução estatisticamente significativa. Este resultado é equivalente ao do grupo salina (QT, 82,4±1,1ms e QRS, 45,0±2,4ms CK, 300±10U/L; CK-MB, 240±10U/L) e ao da droga de referência dexrazoxano (QT, 87,6±3,5ms e QRS, 44,8±2,3ms CK, 265±5U/L; CK-MB, 260±10U/L). O mesmo é mostrado pela dosagem dos GSNP cuja administração de glutathione 250mg/Kg (43,28±1,81 mgNPSH/g) e 500mg/Kg (48,19±4,66 mgNPSH/g) reverteu a diminuição dos GSNP no tecido cardíaco causada pela DXR (12,37±1,38 mgNPSH/g) a níveis equivalentes ao grupo salina (48,99±5,59 mgNPSH/g) e ao dexrazoxano (46,30±3,13 mgNPSH/g). p<0,05 ANOVA – Bonferroni. **Discussão:** A glutathione nas doses de 250mg/Kg e 500mg/Kg mostrou um efeito de proteção cardíaca no modelo utilizado. Os resultados sugerem um papel citoprotetor dos grupos sulfidrilas não proteicos no mecanismo de cardiotoxicidade induzida por doxorubicina. **Apoio Financeiro:** CNPq

06.047

VITAMINA C REDUZ A PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO E RESTAURA A PRESSÃO ARTERIAL DURANTE O CHOQUE ENDOTÓXICO

Ferreira, D. F.¹; Lopes, M. L.¹; Batista, M. B.¹; Soncini, R.¹; Giusti-Paiva, A.¹ - ¹UNIFAL - Ciências Biológicas

Introdução: O choque séptico é caracterizado por uma infecção sistêmica acompanhada por hipotensão, e experimentalmente pode ser induzido pela administração de lipopolissacarídeo (LPS). Esta queda da pressão arterial é decorrente da excessiva produção de óxido nítrico (NO) pela isoforma induzida da sintase de óxido nítrico (iNOS). Estudos têm demonstrado que *in vitro* a vitamina C reduz a expressão da iNOS induzida por LPS. O objetivo foi verificar os efeitos da administração de vitamina C durante o choque endotóxico. **Materiais e Métodos:** Ratos Wistar, pesando 250-300g, tiveram a veia jugular e a artéria femural canuladas para a administração de drogas, coleta de sangue e medida da pressão arterial média (PAM). Os animais foram pré-tratados com veículo (NaCl 0,9%, 1 ml/kg) ou vitamina C (100 mg/kg, ip). Os animais receberam lipopolissacarídeo (LPS, 2 mg/kg, ev) ou veículo (NaCl 0,9%, 1 ml/kg). A resposta pressora à fenilefrina (2ug/kg, *in bolus*, ev) foi avaliada imediatamente antes e 4 horas após a administração de LPS. Amostras de sangue foram colhidas através da cânula na veia jugular a cada hora, e o sangue foi centrifugado e o plasma separado para a dosagem de nitrato por quimioluminescência.

Resultados: Quatro horas após a injeção de LPS foi observado um aumento da concentração plasmática de nitrato ($107 \pm 13 \mu\text{M}$, $p < 0,001$) quando comparado com o grupo controle ($12,3 \pm 3 \mu\text{M}$). O pré-tratamento com vitamina C reduziu a concentração de nitrato após a injeção de LPS ($57,1 \pm 8 \mu\text{M}$ $p < 0,05$), que corresponde a uma redução de 47,3%. O LPS provocou uma ligeira queda da PAM de $-8,2 \pm 2,0 \text{ mmHg}$ ($p < 0,05$) quando comparada com o grupo controle ($\Delta\text{PAM} = 0,07 \pm 0,3 \text{ mmHg}$). Esta queda da PAM foi revertida pela administração de vitamina C ($\Delta\text{PAM} = -1,95 \pm 2,7 \text{ mmHg}$). Quatro horas após a administração de LPS foi observado uma redução da resposta pressora à fenilefrina ($60,0 \pm 9\%$ da resposta pressora inicial, $p < 0,01$) quando comparado com o grupo controle ($100,8 \pm 5\%$), e o pré-tratamento com vitamina C foi capaz de reverter esta hiporesponsividade ($99,6 \pm 5\%$ da resposta pressora inicial). **Discussão:** O pré-tratamento com vitamina C diminui a produção de NO e a conseqüente queda da PAM e hiporesponsividade vascular durante o choque endotóxico. **Apoio Financeiro:** PIBIC-CNPq

06.048

ROLE OF ANNEXIN 1 AND FTY720 AS IMMUNOSUPPRESSORS AGENTS IN THE SKIN ALLOGRAFT

Teixeira, R. A. P.¹; Castanheira, F. V. S.¹; Bueno, V.²; Damazo, A. S.¹; Oliani, S. M.¹ -
¹UNESP - IBILCE - Biologia; ²UNIFESP - EPM - Patologia

Immunosuppressants have important roles in organ transplantation, acting in the inhibition of tissue injury. Several studies have been describing the role of annexin 1 protein (AnxA1) in the inhibition of extravasation of the leucocytes and regulation¹ of the apoptosis², whereas, FTY720, is a new synthetic analog of a compound extracted from *Isaria sinclairii* with immunomodulators properties³. The aim of our study was to investigate the effect of AnxA1 and FTY720 in the survival of skin allograft between two lineages of mice incompatible with MHC. The recipient animals C57Bl/6 received the skin from Balb/c tails. The animals received 100 µg i.p. of Ac2-26 peptide, derived from the N-terminal region of AnxA1 protein, and 1 mg/Kg of FTY720, for gavage, for four consecutive days, beginning one day before the transplant. On the fifth day post-transplant, the mice were anesthetized to collect samples of blood obtained from the heart for quantification of the leucocytes in the camera of Neubauer. After the sacrifice, the samples of blood and the skin fragments were fixed (paraformaldehyde 4% e glutaraldehyde 0,5%), dehydrated in series of ethanol and included in LR Gold. The control group (TX) submitted to the skin transplant showed 100% rejection of the aloenxerto on the tenth day after the surgical procedure, evidenced by presenting 90% of epithelial necrosis. However, in the animals treated with AnxA1 or FTY720, the rejection of the allograft was retarded, occurring only on the tenth fifth day after transplant. To better understand the mechanisms of the tissue rejection, the leukocyte kinetics, tissue morphology and immunohistochemical for AnxA1 were analyzed on the fifth day post-transplant. There was a reduction in the lymphocyte and neutrophils numbers in the blood of the mice treated with the peptide Ac2-26 when compared to the group TX. In relation to the group treated with FTY720, we observed a significant reduction of the amount of circulating lymphocytes ($p < 0,001$), while the neutrophil and monocyte number increased significantly in relation to the group TX ($p < 0,01$ and $p < 0,001$ respectively). The morphologic analyses of the skin of the control animals indicated an increase in leukocyte transmigration in the allograft tissue, while in animals treated with the peptide Ac2-26 or FTY720 there was a reduction in these transmigration cells. Thus, we observe that the peptide Ac2-26 acts above all in mast cells and neutrophils, as well as acting in biodynamic of the angiogenesis, whereas the FTY720 acts in redirecting lymphocytes of the outlying circulation to the secondary lymph organs and in the inhibition of the neutrophils transmigration for the skin allograft. In conclusion, the data obtained in investigation of the post-transplant process suggests that the AnxA1 and FTY720 showed an important regulatory role in the inhibition of the rejection of the tissue in the skin aloenxerto, acting with different molecular mechanisms in the recruitment and activation of the inflammatory cells. References: (1) Oliani, S.M. **Med. Inflamm**, 2002; (2) Solito, E. **J. Pharmacol**, 2001; (3) Habicht, A. et al **The J. Immunology**, 2006. **Supported by:** Fapesp/CNPq

06.049

ENVOLVIMENTO DE COX-1 E COX-2 NA PATOGÊNESE DA DOENÇA PERIODONTAL EXPERIMENTAL EM RATOS

Queiroz Junior, C. M.¹; Pacheco, C. M. F.¹; Caliari, M. V.²; Francischi, J. N.¹ - ¹UFMG - Farmacologia; ²UFMG - Patologia

Introdução: A doença periodontal (DP) é uma condição inflamatória dos tecidos de suporte do dente desencadeada pelo acúmulo de bactérias na região subgengival. Esse estudo procurou avaliar o desenvolvimento da DP em ratos da linhagem Holtzman e o efeito local de inibidores seletivos das enzimas ciclooxigenase-1 e -2 (COX-1 e COX-2) em sua evolução. **Materiais e Métodos:** A DP foi induzida pela colocação de um fio de seda estéril na região cervical do 2º molar superior esquerdo. O dente do lado oposto não foi ligado e serviu como controle interno do experimento. Os animais foram tratados com SC560, celecoxibe ou SC236 por administração local (gengiva adjacente ao dente com DP) no 3º, 4º e 5º dias, e sacrificados 11 dias após a colocação do fio. Foram avaliados a perda da crista óssea alveolar, a perda de inserção periodontal e o acúmulo de células inflamatórias na região gengival utilizando-se morfometria digital, de acordo com Pacheco *et al*, 2007. **Resultados e Discussão:** A administração local dos inibidores de COX-2 limitou as perdas ósseas e de inserção, bem como a migração celular, ao passo que o inibidor seletivo de COX-1 inibiu apenas a perda de inserção e o acúmulo celular na região gengival, mas não a perda óssea. Conclui-se que as enzimas COX-1 e COX-2 estão diferencialmente envolvidas na patogênese da periodontite experimental em ratos e que os inibidores de COX-2 são eficazes em limitar o desenvolvimento dos sinais da DP quando administrados localmente. **Bibliografia:** Pacheco, C.M.F *et al. Arch Oral Biol*, 2007 (*in press*). **Apoio Financeiro:** CNPq, FAPEMIG.

06.050

ANTI-INFLAMMATORY EFFECTS OF ARTEPILLIN C: A RELEVANT COMPOUND BIOAVAILABLE FROM BRAZILIAN PROPOLIS

Paulino, N.¹; Uto, Y.²; Koyama, D.²; Dirsch, V. M.³; Vollmar, A. M.³; Scremin Paulino, A.⁴ - ¹UNIBAN - Programa de Mestrado em Farmácia, São Paulo; ²University of Tokushima - Biological Science & Technology, Faculty of Engineering, Japan; ³Ludwig Maximilian Universität München - Pharmacy, Germany; ⁴UFSC - Programa de Pós - Graduação em Farmácia, Laboratório de Controle de Qualidade

Introduction: Artepillin C is an antimicrobial 2,4,6-trisubstituted phenol isolated as a major constituent from Brazilian green propolis from *Baccharis dracunculifolia*. It has been reported as an antitumour, an apoptosis-inducing, an immunomodulating and an antioxidant agent. Our aim is to investigate the anti-inflammatory effect of Artepillin C (Art C). **Methods:** Artepillin C was supplied by Department of Biological Science & Technology, Faculty of Engineering, University of Tokushima, that shown the first total synthesis of Artepillin C established by *o,o'*-diprenylation of *p*-halophenols in water following (Uto, Y. et al. J. Org. Chem. 67, 2355, 2002). The animals used were male Swiss mice, submitted to: paw oedema produced by carrageenan (PO 300mg/paw), carrageenan-induced peritonitis (100 µg.mL⁻¹, i.p.), prostaglandin E₂ (PGE₂) determination by ELISA assay on peritoneal exudate, nitric oxide (NO) quantification in supernatant of Raw 264.7 culture cells, NF-κB activity in TNF-α-stimulated HEK 293 cells transfected with a NF-κB-driven luciferase reporter gene, and finally, the plasma of the animals treated with Artepillin C (10 mg.kg⁻¹) were analyzed using a chromatograph column DB-5ms (30m x 0.25 mm ID x 0.25 FT) from Agilent. Gas chromatography were a Focus GC model from Thermo-Finnigan. **Results:** In the paw oedema, Art C produced a maximal inhibition of 38% after 360min. In the peritonitis, Art C decrease the number of neutrophils with IC₅₀: 0.9 (0.5-1.4)mg/Kg). The level of PGE₂ decrease 29±3% or 58±5% after treatment with Art C (1 or 10 mg/Kg) with ID₅₀ 8.5 (8.0-8.7)mg/Kg). The incubation of Art C (3, 10 or 100µM) led to a decrease in NO in RAW 264.7 (IC₅₀: 8.5 (7.8-9.2)µM). In HEK 293 cells, Art C incubation reduced the NFκB activity with IC₅₀: 26 (22-30)µg/mL). Finally, we shown that Art C can be absorbed after oral administration with maximal pikes found between 30 min to 1 h. **Discussion:** Despite the existence of several pharmacological studies with Artepillin C, the present work demonstrates the anti-inflammatory effects in mouse models. These observations together with the *in vitro* results led us to reinforce the hypothesis of the anti-inflammatory effect of Art C may be due to inhibition of iNOS gene expression, through interference in NF-κB sites in the iNOS promoter, and by mean of inhibition of PGE₂ production during the inflammation-induction. Further experiments are now in progress aiming to investigate the influence of other Art C derivatives compounds with the same pharmacological properties and mechanisms. We have shown that Art C is a potent and bioavailable compound when administered by oral route and have an absorption with maximal pike after 30 min to 1 hour.

06.051

REDUÇÃO DA PERIODONTITE PROMOVIDA PELA ADMINISTRAÇÃO DE MANGIFERINA EM RATOS

Carvalho, R. R.¹; Pellizzon, C. H.²; Vilegas, W.³; Hiruma-Lima, C. A.⁴ - ¹UNESP - IB - Botucatu - Farmacologia; ²UNESP - IB - Botucatu - Morfologia; ³UNESP - IQ - Araraquara - Química Orgânica; ⁴UNESP - IB - Botucatu - Fisiologia

Introdução: A periodontite é um grande problema de saúde oral da população brasileira. Existe um consenso de que o fator etiológico primário das periodontites é o acúmulo de placa bacteriana, o qual induz a um processo inflamatório e resulta na perda do osso alveolar que suporta o dente. As drogas antiinflamatórias não-esteroidais, do tipo piroxicam, têm demonstrado um relevante efeito sobre a periodontite, porém, existem relatos de diversos efeitos colaterais associados ao seu uso. A mangiferina, uma xantona extraída das folhas e cascas de *Mangifera indica* L. (manga) possui uma propalada ação antiinflamatória, anti-reabsortiva óssea e antibacteriana. Com base em todos estes dados de literatura, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da administração da mangiferina sobre a perda óssea alveolar na periodontite induzida em ratos. **Métodos:** A periodontite foi induzida em ratos Wistar (~180g) aplicando-se uma ligadura com um fio de algodão (nº 24) ao redor do primeiro molar inferior direito. O lado oposto do mesmo animal foi utilizado como controle interno do experimento (sem ligadura). Os animais foram divididos em 3 grupos (n=7), os quais receberam diariamente por via oral: o veículo (salina-10 ml/kg), piroxicam (20 mg/kg) ou mangiferina (100 mg/kg). Nos dias 1, 4 ou 7 após a aplicação da ligadura, os animais foram mortos e a perda óssea alveolar (POA) foi determinada pela medida da distância (μm) entre a junção cimento-esmalte e a crista óssea alveolar na distal dos primeiros molares inferiores. A POA intragrupos foi determinada pela comparação das diferenças entre os lados com ligadura e sem ligadura dos animais tratados com salina, piroxicam ou mangiferina, respeitando-se a variabilidade individual. Os valores foram expressos em média \pm e.p. ANOVA, Tukey. **Resultados:** Os resultados mostraram que após 1 dia de indução da periodontite somente o grupo de animais tratados com mangiferina foi capaz de reduzir significativamente ($p<0,05$) a POA ($105,5\pm 33,1 \mu\text{m}$) quando comparado com o grupo tratado com o veículo ($217,6\pm 18,9 \mu\text{m}$). Após 4 dias de tratamento diário, tanto os animais tratados com piroxicam como aqueles tratados com mangiferina reduziram ($p<0,001$) a POA ($167,2\pm 13,4 \mu\text{m}$; $162,2\pm 11 \mu\text{m}$, respectivamente) quando comparados com os animais tratados com o veículo ($290,4\pm 20 \mu\text{m}$). Após 7 dias de tratamento, os animais tratados com piroxicam ou mangiferina mantêm reduzidas ($p<0,01$; $p<0,001$, respectivamente) a POA ($298,5\pm 30,9 \mu\text{m}$; $220,3\pm 15,7 \mu\text{m}$, respectivamente) quando comparados com o grupo tratado com o veículo ($620,9\pm 103,3 \mu\text{m}$). **Discussão:** Nossos resultados demonstraram que a mangiferina pode ter uma ação preventiva ao inibir significativamente a POA após 1 dia de indução da periodontite. Sendo também eficaz no tratamento da periodontite já instalada, ao demonstrar uma inibição significativa da POA após 4 e 7 dias (pico da POA) de indução da periodontite. A efetividade da mangiferina pode ser devido a sua propalada ação antiinflamatória, anti-reabsortiva óssea e antibacteriana. Os nossos resultados confirmam os dados da literatura e demonstram o potencial terapêutico da mangiferina na periodontite induzida em ratos. **Apoio financeiro:** CAPES, BIOTA-FAPESP

06.052

A MANGIFERINA DIMUI A CELULARIDADE DO PROCESSO INFLAMATÓRIO NA PERIODONTITE INDUZIDA EM RATOS

Carvalho, R. R.¹; Pellizzon, C. H.²; Vilegas, W.³; Hiruma-Lima, C. A.⁴ - ¹UNESP - IB - Botucatu - Farmacologia; ²UNESP - IB - Botucatu - Morfologia; ³UNESP - IQ - Araraquara - Química Orgânica; ⁴UNESP - IB - Botucatu - Fisiologia

Introdução: A periodontite é uma doença inflamatória crônica que leva à destruição dos tecidos periféricos ao dente. As drogas antiinflamatórias não-esteroidais, do tipo piroxicam, têm sido utilizadas para tentar reverter este processo inflamatório, porém com efeitos adversos nocivos ao organismo. A mangiferina, uma xantona extraída das folhas e cascas de *Mangifera indica* L. (manga) tem sido muito descrita na literatura por possuir ação antiinflamatória, anti-reabsortiva óssea, e antibacteriana, entre outras. Com base em todos estes dados de literatura, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da administração da mangiferina sobre a celularidade do processo inflamatório na periodontite induzida em ratos. **Métodos :** A periodontite foi induzida em ratos Wistar (~180g) aplicando-se uma ligadura com um fio de algodão (nº 24) ao redor do primeiro molar inferior direito. O lado oposto do mesmo animal foi utilizado como controle interno do experimento (sham). Os animais foram divididos em 3 grupos (n=7), os quais receberam diariamente por via oral: o veículo (salina-10 ml/kg), piroxicam (20 mg/kg) ou mangiferina (100 mg/kg). Nos dias 1, 4 ou 7 após a aplicação da ligadura, os animais foram mortos, a celularidade foi determinada pelo programa AVSoft BioView seeker 4, numa área de 5 cm² de amplitude 40x, obtida na distal dos primeiros molares inferiores. Os valores foram expressos em média±e.p. ANOVA, Tukey. **Resultados:** Os resultados mostraram que após 1 dia de indução da periodontite houve um aumento significativo (p<0,001) da celularidade dos animais tratados com salina (221,8±4,5) quando comparada com os animais sham (155,1±3,6). Os animais tratados com piroxicam ou mangiferina reduziram significativamente (p<0,01; p<0,001, respectivamente) a celularidade (196±5,1; 187,6±1,8, respectivamente) quando comparados com os animais tratados com salina. Após 4 dias de indução da periodontite a celularidade dos animais tratados com salina (221±8,2) continuou aumentada significativamente (p<0,001) quando comparada com os animais sham (155,6±6,3). Enquanto que os animais tratados com piroxicam ou mangiferina reduziram significativamente (p<0,05; p<0,001, respectivamente) a celularidade (191,6±4,6; 173,8±7,8, respectivamente) quando comparados com os animais tratados com salina. Após 7 dias de indução da periodontite a celularidade dos animais tratados com salina (249,4±9) se manteve significativamente aumentada (p<0,001) quando comparada com os animais sham (153±3,5). Tanto os animais tratados com piroxicam ou mangiferina reduziram significativamente (p<0,001) a celularidade (204,2±3; 181,5±2,7, respectivamente) quando comparadas com os animais tratados com salina. **Discussão:** A diminuição da celularidade presente no processo inflamatório da periodontite, promovida pela mangiferina em todo o experimento, confirma os nossos dados da literatura sobre sua ação antiinflamatória e antibacteriana, realçando ainda mais a sua possível utilização terapêutica na periodontite. **Apoio financeiro:** CAPES, BIOTA-FAPESP

06.053

CYTOTOXIC AND ANTITUMOR ACTIVITIES OF NEW RUTHENIUM AND GOLD COMPLEXES

Heinrich, T. A.¹; Poelhsitz, G.²; Cuin, A.³; Batista, A. A.²; Massabni, A. C.³; Costa-Neto, C. M.¹ - ¹FMRP - USP - Bioquímica e Imunologia; ²UFSCar - Química; ³UNESP - IQ - Araraquara - Química Geral e Inorgânica

Since Rosenberg's discovery of Cisplatin (1965) and its subsequent clinical use as an antitumor drug, studies on biological and pharmacological properties of new metal complexes have been emerging due to their relevance as possible new antineoplastic drugs. Researches are not restricted only to platinum-based agents like Cisplatin, but also to other metal-based compounds. Recent literature describes ruthenium and gold complexes as new potential antitumor drugs.

This work assessed the cytotoxic and antitumor activity of new ruthenium and gold complexes. The cytotoxic properties of a series of five ruthenium complexes and two gold complexes were analyzed using the human HeLa tumor cell line. Ruthenium complexes were synthesized at the Chemistry Department from the Federal University of São Carlos, SP. Gold complexes were synthesized at the Chemistry Institute from the State University of São Paulo (UNESP), Araraquara, SP. Cells were cultured in DMEM medium supplemented with 10% fetal calf serum and gentamicin as antibiotic at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. HeLa cells were plated (2x10⁴cells/well) in a 48-well tray and maintained in the same conditions 24h prior to the experiments. Stock solutions of the complexes were prepared in DMSO and final different concentrations were achieved by direct dilution into the medium in each well. Cells were analyzed 48h after addition of the complex or the vehicle. Inhibition of cell growth was assessed using a tetrazolium salt (MTT) colorimetric assay, which reflects cellular viability.

Our results show that all the analyzed complexes presented cytotoxic activities against HeLa cells, although to different degrees. Such assays demonstrated that three ruthenium complexes and one gold complex were able to cause 50% of cell death (IC₅₀) at concentrations below 5µM. As a comparison, Cisplatin, a classical metal-based antineoplastic drug, presents an IC₅₀ of 5µM determined under the same conditions. Based on those results, we decided to evaluate their *in vivo* antitumor properties in tumor transplanted C57/BL6 mice. The obtained results showed that one of the ruthenium complexes, when given at a single dose, was able to decrease tumor volume as compared with the control group (vehicle).

It is generally accepted that most metal-based complexes exert their cytotoxic activity by interacting to DNA. Our study indicates that the new metal complexes studied by us exhibit cytotoxic activities comparable to those observed for Cisplatin, a chemotherapeutic compound routinely used in clinical therapies. Also, our *in vivo* preliminary results indicate that among the tested compounds, a ruthenium complex acts as a potent antitumor agent. Such sound results prompt us to further investigate its properties and mechanism of action.

Supported by: FAPESP, CNPq, CAPES, FAEPA

06.054

RESPOSTA INFLAMATÓRIA INDUZIDA PELA LECTINA DE SEMENTES DE *Dioclea rostrata* BENTH INDUZ LIBERAÇÃO DE TNF- α , IL-1 E IL-10

Figueiredo, J. G.¹; Bitencourt, F. S.²; Mota, M. R. L.²; Aguiar, C. N.²; Silvestre, P. P.²; Benevides, R. G.¹; Moura, T. R.¹; Nascimento, K. S.¹; Dal Secco, D.³; Cunha, F. de Q.³; Alencar, N. M. N. de² - ¹UFC - Bioquímica e Biologia Molecular; ²UFC - Fisiologia e Farmacologia; ³FMRP - USP - Farmacologia

Introdução: Lectinas vegetais têm sido utilizadas como ferramentas no estudo da inflamação devido a sua capacidade de reconhecer resíduos de carboidratos presentes nas membranas das células inflamatórias através de seus domínios lectínicos. O objetivo deste trabalho foi investigar a capacidade da lectina de *Dioclea rostrata* (Dros) em estimular macrófagos (MØ) *in vitro* a liberar citocinas. **Métodos:** cultura de MØ peritoneais, obtidos de ratos fêmeas normais tratados i.p. com tioglicolato a 3%, foi incubada (37°C à 5% CO₂) com Dros (62,5; 125; 250 e 500 µg/mL) por 1h. Os sobrenadantes da cultura foram utilizados como a seguir: 1) injetados i.p. em ratos, sendo a migração de neutrófilos (MN) avaliada 4h após, através da contagem destas células no fluido peritoneal; 2) dosagem de citocinas (TNF- α , IL-1 e IL-10) por ELISA. Grupos controle receberam somente o sobrenadante dos MØ incubados com RPMI. Foram considerados significantes *p<0,05, comparados ao grupo controle (ANOVA-Bonferroni). **Resultados:** O sobrenadante da cultura de MØ estimulada por Dros, injetado i.p., induziu MN com efeito máximo na concentração de 500µg/mL (*2749±181 neutrófilos x10³/mL) em relação ao RPMI (1016±325 neutrófilosx10³/mL). A dosagem de citocinas no sobrenadante dos MØs demonstrou a Dros induziu a síntese/liberação de TNF- α (*105 pg/mL±21,4), IL-1(*160±13,7 pg/mL) e IL-10 (*210±19,2 pg/mL) quando comparados aos grupos controle RPMI, respectivamente (6,7±1,8 pg/mL, 38,4±2,1 pg/mL e 48,5±1,6 pg/mL). **Discussão:** A migração de neutrófilos para cavidade peritoneal, induzida pela Dros, ocorre com envolvimento de MØs, que após estimulados pela lectina liberam citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1) e antiinflamatória (IL-10). Estudos são necessários no sentido de se utilizar a lectina como um marcador/regulador no estudo das citocinas. **Palavras-Chave:** Lectina; *Dioclea rostrata*; citocinas **Apoio Financeiro:** Funcap/CNPq/Capes e UFC.

06.055

PARTICIPATION OF KININ RECEPTORS IN DENTAL PULP INFLAMMATION

Dias, N. S.¹; Souza, P. P. C.¹; Fukada, S. Y.²; Costa, C. A. S.³; Costa-Neto, C. M.¹ -
¹FMRP - USP - Bioquímica e Imunologia; ²FMRP - USP - Farmacologia; ³UNESP - FO
- Araraquara - Fisiologia e Patologia

Kinins play a pivotal role in the modulation of vascular tonus and pathophysiology of inflammation. The actions of these peptides are triggered by the activation of B1 and B2 receptors. Information concerning presence and modulation of kinin receptors in the normal and inflamed dental pulp are still lacking. **OBJECTIVE:** In this study we aimed to evaluate the possible modulation of B1 and B2 kinin receptors during dental pulp inflammation in rats. **METHODS:** Cavities were drilled on first molars of Wistar rats, exposing the pulps. After 3-, 6-, 9-, 12- and 24-hour periods, the teeth were extracted and histopathologically analyzed. Cytokine expression levels were measured by real-time PCR and B1 and B2 receptors levels by semiquantitative RT-PCR. **RESULTS:** The histopathological analysis in all periods until 12-hour after pulp exposure revealed a notable increase in the amount of dilated blood vessels associated with inflammatory infiltrate. Expression levels of IL1-b increased at 6-hour period and were sustained until 24-hour period. Expression levels of IL-10 presented a consistent increase until 24-hour period. Our data showed that the B2 receptor levels were not altered in all the experimental groups. On the other hand, the B1 receptor expression levels were significantly up-regulated at 6-hour, with the higher signal detect at the 9-hour period, and sustained in the other groups. **CONCLUSION:** We can confirm the expression of both B1 and B2 kinin receptors in dental pulp. More importantly, we can infer about a significant participation of the B1 receptor during pulpitis based on the observed up-regulation of its expression, which paralleled the time-course of pulp inflammation. **Supported by:** FAPESP, CNPq, FAEPA, CAPES

06.056

THE ROLE OF IL-1 β AND TNF α IN NOCICEPTIVE AND INFLAMMATORY RESPONSES INDUCED BY TRYPSIN IN MOUSE

Paszczuk, A. F.¹; Passos, G. F.¹; Campos, M. M.²; Calixto, J. B.¹ - ¹UFSC - Farmacologia; ²PUC - RS - Cirurgia - Odontologia

Introdução: A tripsina é uma protease capaz de induzir respostas nociceptivas e inflamatórias através da ativação dos receptores ativados por proteinases do tipo 2 (PAR-2). A ativação deste receptor causa a liberação de prostanoídes e citocinas pró-inflamatórias (Uehara et al. J Immunol, 170:5690, 2003), as quais por sua vez são capazes de aumentar a expressão do receptor PAR-2 em humanos. Desta forma, o presente estudo tem por objetivo avaliar a participação das citocinas pró-inflamatórias, TNF α e IL-1 β , na inflamação e na nocicepção espontânea induzidas pela tripsina na pata de camundongos. **Métodos:** Foram utilizados camundongos Swiss machos (20 - 30 g, N = 4 - 6). A resposta nociceptiva foi caracterizada como o tempo (s) em que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a pata após a injeção intraplantar de tripsina (300 μ g/sítio) durante 10 min. O edema de pata foi medido em pletismômetro em vários intervalos de tempo (15 - 240 min) após a injeção intraplantar de tripsina (30 μ g/sítio). Os níveis teciduais de TNF α e IL-1 β após a injeção de tripsina foram avaliados através de Kits de ELISA. **Resultados:** A resposta edematogênica induzida pela tripsina foi significativamente reduzida pela co-administração dos anticorpos anti-TNF α e anti-IL-1 β , com inibições de 51 \pm 7 e 64 \pm 3 %, respectivamente. O edema de pata causado pela tripsina também foi significativamente menor em animais com deleção gênica para o receptor TNFR1 do TNF α , com inibição igual a 39 \pm 5 %. Tanto a co-administração do anticorpo anti-IL-1 β , como a deleção gênica para o receptor TNFR1 do TNF α , foram capazes de reduzir de maneira significativa a nocicepção espontânea induzida pela tripsina, com percentagens de inibição de 31 \pm 7 e 38 \pm 6 %, respectivamente. Finalmente, a injeção de tripsina induziu um aumento significativo dos níveis de TNF α e IL-1 β no tecido subcutâneo da pata de camundongos (2 e 2,5 vezes, quando comparado ao grupo controle) em 6 e 3 h após a injeção de tripsina, respectivamente. **Discussão:** Os resultados demonstram que as respostas nociceptivas e inflamatórias induzidas pela injeção i.pl. de tripsina parecem envolver a produção das citocinas pró-inflamatórias TNF α e IL-1 β . Os resultados deste trabalho permitem um maior entendimento sobre os mecanismos pelos quais as proteases estão implicadas na dor e inflamação. **Apoio financeiro:** CNPq, CAPES, PRONEX, FAPESC.

06.057

HYDROGEN SULFIDE DONOR IMPROVES SURVIVAL IN EXPERIMENTAL SEVERE SEPSIS

Orrico, M. I. L.¹; Spiller, F.¹; Suavinha, M. M.¹; Alves-Filho, J. C.¹; Freitas, A.¹; Neto, A. F.²; Cunha, F. de Q.¹ - ¹FMRP - USP - Farmacologia; ²FCFRP - USP - Ciências Farmacêuticas

Introduction: In experimental models and in human sepsis a profound failure of neutrophil migration to the infection focus is observed. It seems that the failure of neutrophil migration is mediated by cytokines and chemokines, which induce the production of gaseous mediator such as nitric oxide and carbon monoxide. Those mediators inhibit neutrophil adhesion to venular endothelium and also the neutrophil chemotactic ability. Hydrogen sulfide (H₂S) is another inorganic gaseous mediator, which exhibits vasodilator activity and influences leukocyte chemotaxis. Therefore, H₂S plays an important role in inflammatory process. Objective: Identify the role of H₂S in neutrophil migration toward infectious foci in male swiss mice subjected to severe sepsis by cecal ligation and puncture (CLP). Methods: Mice were pre-treated (30 min) with vehicle (saline, i.p.); DL-propargylglycine (PAG, 10-100 mg/kg i.p.), an inhibitor of the H₂S-synthesizing enzyme cystathionine-gamma-lyase (CSE); or exogenous H₂S donor (NaHS, 10-100 μmol/kg s.c.) and then subjected to sham-operation or to CLP. Results: NaHS increase mice survival rates (60%), decrease bacterial spreading, inhibited the failure of neutrophil migration to the peritoneal cavity as well as the failure of leukocyte rolling/adhesion to venular endothelium. However, PAG demonstrated an opposite effect. Conclusion: These findings suggest that H₂S donors may be used as a new approach for sepsis treatment. **Supported by:** FAPESP, CAPES, CNPq

06.058

EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE AGONISTA DE RECEPTORES KAPPA OPIÓIDES NA DOENÇA PERIODONTAL EM RATOS

Pacheco, C. M. F.¹; Queiroz Junior, C. M.¹; Caliari, M. V.²; Francischi, J. N.¹ - ¹UFMG - Farmacologia; ²UFMG - Patologia

Introdução: A doença periodontal (DP) é uma condição inflamatória dos tecidos de suporte do dente causada pelo acúmulo de bactérias anaeróbias Gram-negativo na região subgingival. Os opióides endógenos e exógenos têm sido descritos como agentes importantes nas interações com o sistema imune e o controle de respostas inflamatórias. Trabalhos anteriores mostraram a diminuição dos parâmetros da doença periodontal em animais tratados com morfina. O presente trabalho avaliou o efeito da administração local de diferentes concentrações do agonista kappa opióide U50, 488 na DP experimental em ratos. **Materiais e Métodos:** A DP foi induzida pela colocação de um fio de seda estéril na região cervical do 2^o molar superior esquerdo. O dente do lado oposto não foi ligado e serviu como controle interno do experimento. Ratos Holtzman machos foram administrados com o agonista de receptores kappa opióide U-50,488 (100, 250 ou 500 mg/sítio/dia) do 3^o ao 5^o dias após a colocação do fio, e sacrificados no 11^o. Um grupo de animais recebeu uma administração prévia, também local, do antagonista específico de receptores kappa opióide, nor-binaltorfimina (200 mg/sítio/dia), antes da administração de 250 mg/sítio/dia do agonista. Os parâmetros de DP avaliados foram a perda da crista óssea alveolar, perda de inserção periodontal (em mm) e o acúmulo de células inflamatórias na região gengival, utilizando-se morfometria digital. **Resultados:** A administração local de U-50,488 diminuiu significativamente ($p < 0.05$) a perda dos tecidos periodontais, sendo que as doses de 100 e 250 mg/sítio/dia foram efetivas na diminuição da perda da crista óssea alveolar e apenas a dose de 250 mg/sítio/dia afetou a perda de inserção de fibras. O número total de células presentes na gengiva adjacente ao dente ligado não foi afetado pelas doses de U-50,488 utilizadas. O efeito foi específico, visto ter sido completamente revertido pelo antagonista kappa específico. Além disso, o efeito desempenhado pelo U-50,488 foi, predominantemente, local visto que sua administração no lado contralateral (lado não ligado) não diminuiu a perda dos tecidos periodontais do lado com a ligadura, quando comparados a animais controles, injetados com salina, também no lado contralateral. **Conclusão:** A ativação de receptores kappa opióides nos tecidos periodontais é importante para a diminuição da perda dos tecidos periodontais. **Bibliografia:** Pacheco, et al. (2007), *Arch Oral Biol* 52 (7): 677-683. **Apoio Financeiro:** CNPq, FAPEMIG

06.059

INFLUÊNCIA DO STRESS POR ISOLAMENTO NA DOENÇA PERIODONTAL EXPERIMENTAL EM RATOS

Fonseca, A. H. A.¹; Queiroz Junior, C. M.²; Pacheco, C. M. F.²; Caliari, M. V.³; Vigaró, M. G.⁴; Francischi, J. N.² - ¹Unicentro Newton Paiva - FACIBS; ²UFMG - Farmacologia; ³UFMG - Patologia; ⁴Celta Brasil - Celta Brasil

Introdução: As doenças periodontais (DP) fazem parte de um grupo de doenças que afetam os tecidos de suporte dos dentes e são desencadeadas por um processo inflamatório induzido pela microbiota presente no biofilme dental. O papel de fatores modificadores da DP, como o estresse, tem se mostrado relevante para se entender o estabelecimento, manutenção, progressão e tratamento desta doença. Considerando a possibilidade de surgimento de estresse a partir do isolamento de animais, este estudo propôs avaliar a influência do estresse por isolamento no desenvolvimento da DP experimental em ratos machos da linhagem Holtzman, com peso entre 250-300g.

Materiais e Métodos: A DP foi induzida pela colocação de um fio de seda estéril na região cervical do segundo molar superior esquerdo. O dente do lado oposto não foi ligado e serviu como controle interno do experimento. Os animais foram divididos em 4 grupos de 5 animais: no primeiro, os animais foram mantidos juntos em caixa plástica contendo forração Zoocel Biotério (1 kg zeolita/caixa/5 ratos; Celta Brasil) e, no segundo, os ratos ficaram em gaiolas suspensas individuais. O terceiro e quarto grupos foram formados por animais que não receberam a ligadura e que permaneceram, respectivamente, em caixa plástica com forração Zoocel Biotério ou isolados em gaiolas suspensas. Todos os animais foram sacrificados 11 dias após a colocação do fio. Foram avaliados a perda da crista óssea alveolar, a perda da inserção periodontal (em mm) e o acúmulo de células inflamatórias na região gengival, utilizando-se morfometria digital. **Resultados:** O isolamento dos animais não proporcionou diferenças estatísticas significativas ($P > 0,05$) em relação aos animais não-isolados em todos os parâmetros avaliados. **Conclusão:** Conclui-se que o isolamento em gaiolas suspensas não gera estresse suficiente nos animais para provocar modificação na progressão da DP experimental em ratos. **Bibliografia:** Pacheco, et al. (2007), *Arch Oral Biol* 52 (7): 677-683. **Apoio Financeiro:** CNPq, FAPEMIG.

06.060

MAST CELL INVOLVEMENT IN A MURINE MODEL OF SILICOSIS: ACTIVATION AND SIGNALING PATHWAY.

Farias-Filho, F. A.¹; Lucena, S. L.¹; Martins, M. A.¹; Cordeiro, R. S. B.¹; Silva, P. M. R. e¹ - ¹FIOCRUZ - IOC - Fisiologia e Farmacodinâmica

Introduction: Silicosis is an occupational disease characterized by the presence of chronic fibrosis in the lungs. Mast cells have been implicated in several fibrotic diseases as evidenced by an increase in their numbers in local processes. In this study, we investigated quantitative and qualitative alterations in the lung mast cell population along the course of silicosis. Mast cell activation by silica particles *in vitro* was also assessed. **Methods:** Silica (10 mg) was administered intranasally into Swiss-Webster mice and the analyses were performed 28 days later. Lung morphological alterations, mast cell number and expression of proteic factors were performed by means of staining and immunohistochemical techniques. For *in vitro* analyses, bone marrow-derived mast cells (BMMCs) were used and their activation was evaluated as the percentage of β -hexosaminidase (B-hex) release. **Results:** Lung examination revealed an extensive fibrotic response and numerous granulomas, mostly of peribronchiolar distribution in silicotic mice. In parallel, there was a marked increase in the number of MCs, exhibiting a clear connective-tissue phenotype. We detected that mast cell survival factors such as interleukin (IL)-3 and stem cell factor (SCF) were highly expressed in silicotic lungs. Similar response was detected in the case of transforming growth factor (TGF)- β . Cultured BMMC when exposed to silica particles showed a clear evidence of activation as attested by the increase in the amount of β -Hex release. Values increased from $6.6 \pm 0.2\%$ to $19.63 \pm 0.23\%$ ($n=4$; $P < 0.05\%$) in medium- and silica-stimulated mast cells, respectively. Incubation of BMMCs with pertussis toxin, 1 h before silica exposure, abolished the degranulation response, indicating that Gi coupled receptors are involved in this system. BMMCs also showed themselves sensitive to treatment with wortmannin (inhibitor of PI3K) and calphostin C (inhibitor PKC), implicating both enzymes in the silica-activated signaling pathway. In a separate set of experiments, we demonstrated that the supernatant of silica-stimulated BMMCs increased the survival of lung isolated fibroblasts from naive mice, reinforcing the idea that mast cells can generate factors active in the control of fibroblast function. **Discussion:** Our findings show that there is a rise in the mast cell numbers along the course of silicosis, in a clear association with an over-expression of mast cell related factors including SCF, IL-3 and TGF- β . They also demonstrated that mast cells exposed to silica respond by degranulation involving PI3K and PKC enzymes and by the production of fibroblast active factors, reinforcing the idea that these cells do contribute to fibrotic responses in several pathological processes including silicosis. **Supported by:** PAPES4/FIOCRUZ, CNPq, FAPERJ, UNESCO.

06.061

PHOSPHOLIPASES A₂-INDUCED AMYLASE SECRETION OF ISOLATED PANCREATIC ACINI

Camargo, E.¹; Ferreira, T.¹; Landucci, E. C. T.¹; Antunes, E.¹ - ¹UNICAMP - Farmacologia

Introduction: Phospholipases A₂ (PLA₂s) from snake venoms induce acute pancreatitis when injected into the common bile duct of rats, a process that is characterized by pancreatic and pulmonary inflammation and hiperamilasemia (Camargo et al., 2005). As the initial stimulus for acute pancreatitis is thought to be the premature activation of pancreatic enzymes, such as trypsin or amylase, in the pancreatic tissue, we have investigated the ability of PLA₂ to cause amylase secretion in isolated pancreatic acini, in order to clarify its role in acute pancreatitis. **Methods:** The pancreatic tissue of male Wistar rats (150-180 g) was digested with collagenase and the resulting isolated pancreatic acini were incubated (1 h, 37°C) with different PLA₂s. The amylase secretion was assayed by commercial kit and the acini viability was determined by MTT reduction assay. **Results:** PLA₂ from *Naja mocambique* venom (high catalytic activity) induced a significant amylase secretion (7.1±0.3; 8.2±0.3; 15.2±1.7; 16.8±2.5%, for 0.01; 0.03; 0.1 and 1 µg/mL respectively) when compared with vehicle-treated group (4.9±0.4%). Piratoxin-I (Lys-49 PLA₂-homologue from *B. pirajai* venom, devoid of catalytic activity) also increased amylase secretion, (8.2±1.6 %; for 1 µg/mL). Similarly, Bothropstoxin-II (Asp-49 PLA₂-homologue from *B. jararacussu* venom, with moderate catalytic activity) enhanced amylase secretion (10.5±0.9%; for 1 µg/mL). At the concentration used above, none of PLA₂s assayed induced cell death, as evaluated by the MTT assay. **Conclusion:** PLA₂s induce amylase secretion from pancreatic acini a process that may depend on the catalytic activity of these enzymes. **Reference:** Camargo EA et al., *Toxicon*, 2005, 46;921-6. **Supported by:** FAPESP

06.062

ENDOTOXIN-INDUCED UVEITIS IN THE RAT: ANALYSIS OF THE INFLAMMATORY CELLS AND ANNEXIN 1 EXPRESSION

Silva, P. S.¹; Smith, R. L.¹; Oliani, S. M.² - ¹UNIFESP - EPM - Morfologia; ²UNESP - IBILCE - Biologia

Purpose: Uveitis is a common inflammatory ocular disease characterized by protein accumulation and leukocyte infiltration¹. Studies of animals models have characterized the leukocyte infiltrate and inflammatory mediators, such as cytokines and annexin 1 (AnxA1), with play an important role during inflammation². The aim of this study was to investigate the role of mast cells, leukocyte transmigration, inflammatory protein extravasation in the aqueous humor (AqH) and the expression of AnxA1 in the endotoxin-induced uveitis (EIU). **Materials and Methods:** Rats received a footpad injection of 0,1 ml of saline containing 150 mg of lipopolyssacharide (LPS) during 24 and 48 hours to induce uveitis. Control animals received the same volume of saline. In order to determine the function of mast cells in this ocular disease, groups of animals were pretreated with compound 48/80 (c48/80) before the injection of LPS. The control group was only pretreated with this segretagogue. For histological evaluation, the right eyes were collected and fixed in a PBS solution containing 4% paraformaldehyde and 0,5% glutaraldehyde, for 24h at room temperature, dehydrated by graded ethanol, and embedded in LRGold resin. AnxA1 expression was analyzed by immunogold labeling³. AqH was collected from the left eyes by an anterior chamber puncture for quantification of transmigrated cells and inflammatory protein. Mean optical density was measured with the software AXIOVISION. Data were analyzed by ANOVA and results were expressed as the mean±SEM taking a P value less than 0,05 as significant. **Results:** Mast cells were intact and no transmigrated cells were detected in ocular tissues and AqH in control animals. In contrast, mast cells were observed degranulated after 24h LPS injection. At the same time, the number of transmigrated cells in the anterior segment of the eye (650 ± 20 cells/mm²) and in AqH ($50 \pm 8 \times 10^3$ cells/ml) was significantly higher compared to control animals ($P < 0,001$). After 48h LPS treatment, mast cells were observed intact, whereas the number of leucocytes in the ocular tissues (150 ± 10) and in AqH ($11 \pm 2 \times 10^3$) reduced significantly ($P < 0,01$). There was a significant reduction of leukocytes transmigration into the eyes of the animals pretreated with c48/80 (17 ± 2) when compared to the animals treated with LPS for 24h. We observed a significant increase in inflammatory protein concentration in AqH at 24h (25 ± 2 mg/ml) in comparison with control animals ($P < 0,01$). Thus, the release of mast cells mediators by LPS injection led to blood-ocular barrier disruption, leukocyte transmigration and plasmatic protein extravasation. The expression of AnxA1 was reduced in mast cells at 24h compared with control animals (200 ± 5 a.u.; 150 ± 11 , respectively), and it increased in neutrophils (178 ± 4 ; 190 ± 2) and eosinophils (75 ± 5 ; 95 ± 3). The immunohistochemical analysis of AnxA1 indicated a possible anti-inflammatory role for this protein as well as an antimigratory property, contributing to the resolution of the uveitis. **Conclusion:** The results suggest that mast cells are a potential source of pharmacological mediators, strongly correlated with the pathophysiology of EIU. Further studies about mast cells and the anti-inflammatory effects of AnxA1 could help in developing new therapeutics for uveitis. References: (1) Hogan, AC et al. **Ophthalmol**, v. 114, p. 1000, 2007. (2) Oliani, SM et al. **Am J Pathol**, v. 158, p. 603, 2001. (3) Damazo, AS et al. **Am J Pathol**, v. 166, p. 1607, 2005. **Supported by:** FAPESP

06.063

EFFECT OF C-JUN NH₂-TERMINAL KINASE (JNK) INHIBITOR, SP600125, ON SILICOSIS IN MICE

Arantes, A. C. S. de¹; Ferreira, T. P. T.¹; Garcia, C. S. N. B.²; Rocco, P. R. M.³; Lagente, V.⁴; Cordeiro, R. S. B.¹; Martins, M. A.¹; Silva, P. M. R. e¹ - ¹FIOCRUZ - IOC - Fisiologia e Farmacodinâmica; ²UFRJ - IBCCF - Investigação Pulmonar; ³UFRJ - Investigação Pulmonar; ⁴Université des Rennes - Pharmacie

Introduction: Silicosis is a chronic pulmonary disease caused by prolonged inhalation of silica particles. JNK is a member of the MAPK group of signaling proteins whose role in inflammatory responses is widely accepted. However, the precise role of JNK in fibrosis is still controversial. In this study we investigated the potential effect of SP600125, an inhibitor of JNK, in the experimental model of silicosis in mice.

Methods: Swiss-Webster mice were intranasally injected with silica particles (10 mg) and the analyses made 28 days post-silica. Inflammatory parameters included lung morphology by means of classical histology (haematoxylin/eosin and Gomori trichrome) and collagen quantification by Sircoll method. Pulmonary mechanics were measured by the end-inflation occlusion method at the same time-point. Mice were treated with SP600125 (5 mg/kg, p.o.) daily, for 7 days, starting on day 21 after silica stimulation.

Results: We showed that 28 day silicotic mice exhibited a marked inflammatory response in the lung tissue, characterized by leukocyte infiltration, intense collagen deposition and granuloma formation. Airway resistance (central and peripheral) and static elastance were increased in the silicotic mice as compared to controls. The curative treatment with JNK inhibitor SP600125 significantly reduced the number and size of granulomas in silicotic mice, in a close-relationship with lower levels of collagen formation/deposition. These phenomena paralleled with a marked improvement of lung function as attested by reduction in both central e peripheral resistance. **Discussion:** Our findings indicate that JNK inhibitor SP600125 effectively suppressed the fibrotic phase of silicosis in mice, strongly supporting the therapeutic potential of orally available JNK inhibitor for the treatment of pulmonary fibrosis. **Supported by:** PAPES4/FIOCRUZ, CNPq, FAPERJ, UNESCO

06.064

THE ROLE OF REGULATORY T CELLS IN THE RESISTENCE OF CCR4 KNOCKOUT MICE DURING SEVERE SEPSIS

Coelho, R. M.¹; França, A. M.¹; Alves-Filho, J. C.²; Cunha, F. de Q.²; Bozza, M.³; Kunkel, S.⁴; Benjamim, C. F.⁵ - ¹UFRJ - Farmacologia; ²FMRP - USP - Farmacologia; ³UFRJ - Imunologia; ⁴Michigan University - Pathology; ⁵UFRJ - Farmacologia Básica e Clínica - ICB

Introduction and Objectives: Studies reveal that regulatory T (Treg) cells control immune responses; therefore these responses must be controlled to enable the effective protection against infections and cancer. CCR4 knockout mice (CCR4 ^{-/-}) are more resistant to LPS shock. So, our aim is to study the mechanisms involved in the resistance of CCR4^{-/-} subjected to severe sepsis by cecal ligation and puncture (CLP) and how Tregs modulate this effect. **Methods and Results:** C57/BL6 mice were subjected to CLP model, whereby the cecum was partially ligated and punctured nine times with a 21G needle. Sham-operated mice were used as control. Mice subjected to CLP and SHAM surgery were treated with antibiotic since 6h after and until 3 days. CCR4 ^{-/-} mice subjected to CLP presented an increase in survival rate (78%) compared with wild-type mice (17%), and a marked improvement in the innate response concerning neutrophil migration to peritoneum and lung, bacteria load and cytokine levels compared to wild-type mice. Besides, Tregs from CCR4^{-/-} CLP mice did not inhibit proliferation of T effector cells as observed for Treg from wild CLP mice, at a proportional ratio of T effector:Treg. Interesting, Treg from CCR4^{-/-} CLP mice inhibit 30% of neutrophil migration to BAL when co-injected with fungal challenge as secondary infection in sham recipient mice, while the Treg from wild CLP mice inhibit 80%, much more as expected. **Conclusion:** These results suggest that Treg cells from CCR4^{-/-} mice did not present suppressive response and it could be an important factor in their survival. These results are a strong evidence for Tregs role in immunosuppression following severe sepsis. **Supported by:** CNPq / PIBIC, FAPERJ.

06.065

INVOLVEMENT OF PROTEIN KINASE C (PKC) AND PHOSPHOINOSITIDE 3-KINASE (PI3K) PATHWAY IN THE UP-REGULATION OF BRADYKININ B₁ RECEPTOR IN THE RAT PORTAL VEIN

Basei, F. L.¹; Cabrini, D. A.²; Bader, M.³; Medeiros, R.¹; Calixto, J. B.¹ - ¹UFSC - Farmacologia; ²UFPR - Farmacologia; ³Max - Delbrück - Center for Molecular Medicine, Berlin, Germany. - Hipertension

Introduction: The bradykinin B₁ receptor (B₁R) is an important agent in inflammatory process. This receptor is normally absent under physiological conditions, but is highly inducible during inflammatory conditions or following tissue damage. Recently, we have shown that prolonged *in vitro* incubation of rat portal vein activates MAPKs - including ERK, JNK, and p38 MAPK - as well as the NF-κB. Moreover, the activation of these pathways appears to be linked to the functional and molecular up-regulation of B₁R in the rat portal vein (Medeiros *et al.*, *Circ Res* 94:1375-1382, 2004). Herein, we attempt to further characterize the involvement of intracellular pathways, namely protein kinase C (PKC) and phosphoinositide 3-kinase (PI3K), on B₁R expression in the rat portal vein following tissue injury. **Methods:** The rat portal vein was isolated and set up in organ chambers containing Krebs-Henseleit solution under basal tension of 0.5 g. The single concentration of the B₁R agonist, des-Arg⁹-BK (1 μM) was added to the preparations at 2, 4, and 6 h following the set-up of the tissues. Repeated stimulation with des-Arg⁹-BK was performed to evaluate the time-dependent up-regulation of the contractile response of the rat portal vein. To analyze the role of PI3K and PKC pathways in the time-dependent increase in the responsiveness to des-Arg⁹-BK, preparations were continuously exposed to one of the following inhibitors: PI3K inhibitor Ly294002 (10 μM), PI3K inhibitor wortamannin (10 nM), PKC inhibitor GF109203x (1 mM) or PKC inhibitor Ro318220 (10 μM). In another set of experiments, the receptor was induced and the contractile response to des-Arg⁹-BK was confirmed at 5.5 h after establishment of the preparations. Then, preparations were incubated with one of the inhibitors (for 30 min, acute incubation) and again exposed to the B₁R agonist des-Arg⁹-BK. The effect of PI3K and PKC inhibitors on B₁R receptor mRNA up-regulation was assessed by means of quantitative RT-PCR 6 h after *in vitro* incubation. **Results:** Continuous exposure of tissue preparations (for 6 h) to the PI3K inhibitors Ly294002 or Wortamannin, as well as PKC inhibitors GF109203x or Ro318220, largely prevented the functional B₁R up-regulation in the rat portal vein, as indicated by a significant decrease in the des-Arg⁹-BK-induced contractile response (63.5±7; 72.2±6; 38.0±6 and 66.0±7 % inhibition, respectively). Furthermore, the same inhibitors failed to reduce des-Arg⁹-BK-induced contraction of the rat portal vein, when applied for 30 min, 5.5 h after the beginning of tissue incubation. Finally, the incubation of Ly294002, Wortamannin, GF109203x or Ro318220 markedly reduced the increase in B₁R mRNA expression in the rat portal vein after 6 h of their incubation (23.0±4; 18.0±4; 18.0±2 and 11.2±2 % inhibition, respectively). **Conclusions:** The current results provide clear functional and molecular evidence indicating that the activation of PI3K and PKC pathways has a critical role in modulating functional and molecular up-regulation of B₁R in rat portal vein, a process that could be of great relevance to the pathophysiology of B₁R in the cardiovascular system. **Supported by:** CNPq, CAPES, FAPESC

06.066

EFEITO PROTETOR DA VIA HEMEOXIGENASE-1 (HO-1) NA LESÃO GÁSTRICA INDUZIDA POR ÁLCOOL EM CAMUNDONGOS

Gomes, A. S.¹; Lima, S. J.¹; Gadelha, G. G.¹; Fonseca, J. A.¹; Cunha, F. de Q.²; Souza, M. H. L. P.¹ - ¹UFC - Fisiologia e Farmacologia; ²FMRP - USP - Farmacologia

O álcool é a causa mais comum de ulceração gástrica em homens. Essa substância é conhecida como uma toxina entérica, afetando a estrutura e função de vários elementos do trato gastrintestinal além de causar efeitos no sistema nervoso central (Bode C. & Bode JC, Alc. Health Res World. 1997; 21(1): 76-83). No estômago, o álcool aumenta a secreção de ácido gástrico, um efeito possivelmente mediado pela histamina e gastrina, leva a um stress oxidativo com a depleção dos grupos sulfidrilas, que são necessários para estabilização das membranas celulares. Ainda no estômago, o etanol influencia a atividade da musculatura e reduz o fluxo sanguíneo, aumentando os riscos de hemorragias e ulcerações, associados às injúrias macroscópicas e histológicas na mucosa (Santos FA & Rao VSN, Dig Dis Sci. 2001 Feb; 46(2): 331-37). Nos últimos anos, vários estudos vêm demonstrando que a HO-1, e seu substrato, heme e seus produtos CO e biliverdina, são capazes de modular o processo inflamatório. O objetivo do trabalho é avaliar o papel de um estimulador (hemina) e de um antagonista (ZnPP IX) da via da HO-1 na lesão gástrica (LG) por álcool (25 e 50%) em camundongos. Camundongos (20-30g) foram pré-tratados com hemina (3mg/kg) ou ZnPP IX (3mg/Kg) uma hora antes da administração de álcool. Uma hora após administração de álcool, os animais foram sacrificados para avaliar o grau da LG, os níveis de glutathiona (GSH), malonaldeído (MDA) e hemoglobina na mucosa gástrica. O álcool 50% causou LG (91,4±3,7mm, N=5), diminuiu o nível de GSH (15,7±6,2mg NPSH/g de tecido, N=5) e aumentou o nível de MDA (158,1±10,7nmol/g de tecido, N=5) e de hemoglobina (43±10mg/100 mg de tecido, N=5) na mucosa gástrica dos camundongos quando comparado com o grupo controle (2,0±2,0mm, N=11; 186,2±7,72mg NPSH/g de tecido, N=5; 88,1±5,3nmol/g de tecido, N=5; 15±1,6g/100 mg de tecido, N=5). Hemina reduziu (p<0,001) a LG (15,6±0,9mm, N=10), a concentração de MDA (87,3±4,9nmol/g de tecido, N=5), o nível de hemoglobina (17±1,2g/100 mg de tecido, N=5) e aumentou (p<0,001) o nível de GSH (140,8±8,2mg NPSH/g de tecido, N=5) induzida por álcool 50%. ZnPPIX aumentou (p<0,001) a LG (71,5±4,7mm, N=5), a concentração de MDA (118,6±9,7nmol/g de tecido, N=5), o nível de hemoglobina (19,5±1,3g/100 mg de tecido, N=5) e diminuiu (p<0,001) o nível de GSH (34,2±6,9mg NPSH/g de tecido, N=5) quando comparado com animais tratados com álcool 25% (32,5±3,7mm, N=11; 164,9,±10,7mg NPSH/g de tecido, N=5; 80,2±4,4nmol/g de tecido, N=5; 25,6±1,2g/100 mg de tecido, N=5). Dessa forma, é possível concluir que a via da hemoxygenase 1 participa do processo de defesa da mucosa gástrica contra lesões gástricas induzidas por álcool. **Apoio Financeiro:** CAPES, CNPq.

06.067

EFEITO PROTETOR DA VIA HEMEOXIGENASE-1 (HO-1) NA LESÃO GÁSTRICA INDUZIDA POR INDOMETACINA EM CAMUNDONGOS

Gomes, A. S.¹; Lima, S. J.¹; Fonseca, J. A.¹; Gadelha, G. G.¹; Cunha, F. de Q.²; Souza, M. H. L. P.¹ - ¹UFC - Fisiologia e Farmacologia; ²FMRP - USP - Farmacologia

Os antiinflamatórios não-esteroidais (AINEs) constituem uma das classes de fármacos mais prescritas no mundo. A toxicidade gastrointestinal constitui a maior limitação para o uso dos AINEs. Tem sido sugerido ainda que a maioria dos pacientes usuários de AINEs não desenvolve lesão gastrointestinal, pois a sua mucosa gástrica seria capaz de se adaptar criando resistência a agressões pelos AINEs (Olivero & Graham, 1992). Nos últimos anos, vários estudos vêm demonstrando que a HO-1, e seu substrato, heme e seus produtos CO e biliverdina, são capazes de modular o processo inflamatório. A HO-1 é uma enzima que catalisa a degradação da heme em monóxido de carbono (CO), biliverdina (BVD) e ferro. A HO-1 e seus produtos são capazes de modular o processo inflamatório. No trato gastrointestinal foi demonstrado que a via da HO1/biliverdina/CO é capaz de proteger a mucosa colônica em modelos de doença inflamatória intestinal (Vicente AM J Pharmacol Exp Ther 2003. 307: 1030-1037). O objetivo desse trabalho é avaliar o papel de um estimulador (hemina) e de um antagonista (ZnPP IX) da via da HO-1 na lesão gástrica (LG) e na atividade de Mieloperoxidase (MPO) induzida por indometacina (INDO) em camundongos. Camundongos (20-30g) foram pré-tratados com hemina (3mg/kg) ou ZnPP IX (3mg/kg) uma hora antes da administração de INDO (10 ou 30mg/kg) para a indução da LG. Três horas após administração da INDO, os animais foram sacrificados para avaliar o grau da lesão gástrica. A INDO foi capaz de causar lesões significativas ($p < 0,001$) nos estômagos dos camundongos tanto na dose de 10mg/Kg ($10,4 \pm 2,7$ mm, N=5) como na dose de 30mg/Kg ($24,6 \pm 2,1$ mm, N=5) quando comparado ao grupo controle ($0,4 \pm 0,4$ mm, N=5). A atividade de MPO aumentou tanto na dose de 10mg/Kg ($7,8 \pm 4,1$ UMPO/mg, N=5) como na dose 30mg/Kg ($14,8 \pm 4,1$ UMPO/mg, N=5) quando comparado com o controle ($2,9 \pm 1,5$ UMPO/mg, N=5) O pré-tratamento com hemina (3 mg/Kg) foi capaz de reduzir de forma significativa tanto as lesões gástricas ($3,3 \pm 1,3$ mm, N=5) como também a atividade de MPO ($7,9 \pm 2,5$ UMPO/mg) induzidas por INDO (30mg/Kg). Por outro lado, o pré-tratamento com ZnPP IX (3mg/Kg) aumentou significativamente ($p < 0,001$) a LG ($19,1 \pm 2,5$ mm, N=6) e a atividade de MPO ($12,7 \pm 2,1$ UMPO/mg) induzida por INDO (10mg/Kg) na mucosa gástrica de camundongos. Dessa forma, é possível concluir que a via da hemeoxigenase 1 participa do processo de defesa da mucosa gástrica contra lesões gástricas induzidas por indometacina. **Apoio Financeiro:** CAPES, CNPq.

06.068

NITRIC OXIDE PRODUCTION FOLLOWING LYPOPOLYSSACHARIDE (LPS) CHALLENGE IN RAT PINEALOCYTES

Armelin, M. A.¹; Tamura, E. K.¹; Markus, R. P.¹; Ferreira, Z. S.² - ¹IB - USP - Fisiologia; ²USP - Fisiologia

In recent years accumulating evidences put the pineal gland and the immune system reciprocally linked by bidirectional communication. As the pineal lacks the blood–brain barrier, circulating immune factors have easy access to the gland. Lipopolysaccharides (LPS) are major components of the outer membrane of Gram-negative bacteria, which makes them prime targets for recognition by the immune system. Several evidences suggest that Toll-like receptor 4 (TLR4) is critical for host defense against gram-negative bacteria. Upon recognition of LPS, TLR4 can initiate intracellular signaling pathways which activate transcriptional factors as nuclear factor kappa B (NFkB). This factor ultimately leads to the synthesis and release of a number of proinflammatory mediators. Recently we described the presence of NFkB in the rat pineal gland which is constitutively activated and modulates melatonin synthesis, being a target for cytokines and glucocorticoids (Ferreira, ZS, J Pineal Res. 38: 182, 2005; Fernandes, PACMF, J Pineal Res. 41: 344, 2006). TNFalpha inhibits, while corticosterone potentiates noradrenaline-induced *Aa-nat* gene transcription, a key enzyme in melatonin synthesis, by a mechanism mediated by NFkB. Among the inflammatory mediators triggered by NFkB it is included the inducible nitric oxide synthase (iNOS). This transcriptionally regulated enzyme, which synthesizes nitric oxide (NO) from L-arginine, has a key role in the pathophysiology of inflammation. AIM: An attempt has been made to characterize the effects of LPS on NO production via iNOS in rat pinealocytes. METHODS: Pinealocytes were obtained from Wistar rats (females, 1 month) by trypsinization followed by mechanical dispersion. The production of NO was measured by confocal microscopy in cells loaded with the fluorescent dye DAR-4M AM (5µM, 30 min, 37°C, 5% CO₂). RESULTS: Firstly we determined the time course of LPS-induced NO production in pinealocytes. In LPS-treated pinealocytes (LPS 1mg/ml; 1h30 - 6 h) we observed a marked increase in NO production with a time-course that peaks at 2h-stimulation (225.2±53.5 % over basal, n=70-92 cells from 3 experiments) followed by a decline to near basal levels at 4~6 h. This induction within 2 h LPS-stimulation was concentration-dependent. LPS (0.1–10 mg/ml) increased NO production from 65.3±12.3 to 167.0±26.4 % over basal, n=56-84 cells from 6 experiments). DISCUSSION: We characterized the effects of LPS on NO production via iNOS in rat pinealocytes. After pinealocytes receive a signal that was initiated by LPS, there is an induction of iNOS which leads to an increase in NO production by the pinealocytes. Our results pointed to a direct action of LPS in pinealocytes through activation of its specific receptors in the gland. The marked increase in NO production following LPS challenge have potential pathophysiologic implications adding an important role for NO in the immune-system – pineal axis. **Supported by:** FAPESP, CAPES, CNPq.

06.069

EFFECTS OF ANNEXIN 1 TREATMENT AS A THERAPY IN RHEUMATOID ARTHRITIS

Pimentel, T. A.¹; Damazo, A. S.²; Oliani, S. M.² - ¹UNIFESP - EPM - Morfologia; ²UNESP - IBILCE - Biologia

Rheumatoid arthritis is a systemic autoimmune inflammatory disease that predominantly affects multiple peripheral joints and occurs in 0,5-1,0% of the adult population worldwide¹. Since annexin 1 (AnxA1) has an important role in the inflammatory process², we have analyzed the expression of this protein on mast cells and leukocytes using a collagen induced arthritis (CIA) model. Male DBA/1J mice were given an intra-dermal injection of 100µl of 4mg/ml bovine type II collagen (CII) emulsified in complete Freund's adjuvant on day 0. Prednisolone glucocorticoid (GC) and human recombinant AnxA1 (hrANXA1) were administered by subcutaneous injection (100µg/ml, 1µg/dia, respectively) daily from day 22 after the first immunization. Control animals were immunized with CII only (nontreated). Arthritis was analyzed on day 28 and 42 after the first immunization. The knee and toe joints were fixed (4% paraformaldehyde, 0.5% glutaraldehyde) and embedded in LRWhite for light microscopy analysis. AnxA1 protein expression was analyzed by immunogold labeling³. Mean optical density was measured with the software AXIOVISION. Data were analyzed by ANOVA and results were expressed as the mean±SEM taking a P value less than 0.05 as significant. Administration of GC and hrAnxA1 did not reduce the severity of disease. Analysis of individual aspects of CIA revealed that treated mice exhibited a significant inflammation in the joints mainly after 20 days of treatment. However, GC and hrAnxA1 significantly reduced the number of neutrophils in the knee (283,4±47,7 cells/mm²; 529,3±76,6, respectively) and toe (206,2±54,1; 1186±107,8) synovial tissues after treatment during 6 days. In addition, a significant reduction in the neutrophils infiltration was observed in the joint space after administration of hrAnxA1 or GC for 6 (140,7±3,1; 366,3±74,9) or 20 days (201,7±66,1; 201,7±66,1). Mast cells degranulation was also reduced and the major cells were intact after 6 (GC, 56%, hrAnxA1, 42%) or 20 days of treatment (GC, 60%, hrAnxA1, 43%). The AnxA1 endogenous expression was assessed by an increase in the neutrophils, mast cells and endothelial cells immunoreactivity on mice submitted to GC or hrAnxA1 administration. Our studies indicated that the hrAnxA1 and GC treatment induced the expression of endogenous AnxA1 in leukocytes, mast cells and endothelial cells, exerting inhibition of mast cells degranulation and leukocytes transmigration. Besides the antiinflammatory effects no significant reduction was observed in the individual features of arthritis. This might indicate that other cell types are participating in the pathogenesis of arthritis. Further studies will provide better understanding on the pathways that operate in the host which may help us in the quest for new drugs to treat inflammatory diseases. References: (1) Firestein, GS. **Nat**, v. 423, p. 356, 2003. (2) Oliani, SM et al. **Am J Pathol**, v. 158, p. 603, 2001. 3. Damazo, AS et al. **Am J Pathol**, v. 166, p. 1607, 2005. **Supported by:** FAPESP.

06.070

IL-33 TREATMENT REDUCES THE SYSTEMIC INFLAMMATORY RESPONSE AND IMPROVES SURVIVAL IN POLYMICROBIAL SEPSIS

Sonego, F.¹; Alves-Filho, J. C.¹; Verri Jr., W. A.¹; Liew, F. Y.²; Cunha, F. de Q.¹ -
¹FMRP - USP - Farmacologia; ²University of Glasgow - Immunology

INTRODUCTION: There is a marked defect in neutrophil migration into the infectious focus during severe sepsis, which is associated with the severity of disease. We have demonstrated that the signaling of Toll-like receptor 4 (TLR4), receptor for LPS from Gram-negative bacteria, drives the activation of the systemic inflammatory cascade, resulting in neutrophil migration impairment and mortality during polymicrobial sepsis. It has been reported the orphan receptor ST2 negatively regulates LPS-induced TLR4 signaling, indicating ST2 as a key regulator of endotoxin tolerance. Recently, a novel cytokine, IL-33, has been identified as a functional ligand of ST2. Thus the aim of this work was to evaluate the possible effect of IL-33 treatment on the inflammatory response induced by polymicrobial sepsis. **METHODS:** C57BL/6 mice were treated i.v. with murine recombinant IL-33 (1 μ g/mouse) or vehicle (saline) daily for two days. Three hours after the last injection the animals were subjected to CLP (cecal ligation and puncture) sepsis model or sham surgery. Sub-lethal CLP (SL-CLP) was induced in control and lethal CLP (L-CLP) in control and treated mice. Mice were killed 6h after sepsis induction and peritoneal neutrophil migration, lung neutrophil sequestration and local and systemic TNF- α , IL-6, MIP-2 levels were evaluated. Survival was observed during five days ($n=12$). **RESULTS:** The control mice had expected survival (SL-CLP=100% and L-CLP=0% survival), however, the IL-33 treatment delayed and reduced lethality of L-CLP (33%). Interestingly, IL-33 treatment prevented the impairment of neutrophil migration into infectious focus observed in control L-CLP mice (SL-CLP: 6.2×10^6 ; L-CLP: 1.2×10^6 and L-CLP+IL-33: 7.8×10^6 cells/cavity). Moreover, IL-33 did not change local TNF- α , IL-6 and MIP-2, but significantly reduced these cytokines/chemokine levels (TNF- α : 75% and IL-6: 15%) in serum and (IL-6: 50% and MIP-2: 30%) in lung homogenate compared to control L-CLP group. Finally, we observed that IL-33 reduced (45%) lung neutrophil sequestration induced by L-CLP. **DISCUSSION:** IL-33 treatment prevented the impairment on neutrophil migration and delayed and reduced lethality induced by lethal CLP. Moreover, systemic cytokines and chemokines production and lung neutrophil sequestration were decreased in IL-33-treated animals, leading a reduction on exceeding inflammatory response. However, IL-33 did not change local cytokines and chemokines production, suggesting that its beneficial effect is through systemic signaling. Thus, we demonstrated here a novel regulatory effect of IL-33, reducing the systemic inflammatory response and improving survival during polymicrobial sepsis. This may be of considerable therapeutic potential adjuvant for reducing the severity of inflammatory response in sepsis. **Supported by:** CNPq and FAPESP

06.071

THE ENVIRONMENTAL CONTAMINANT 1,2-NAPHTHOQUINONE CAUSES POLYMORPHONUCLEAR LEUKOCYTES INFLUX IN MURINE AIR POUCH

Florenzano, J.¹; Yshii, L. M.¹; Muscara, M. N.¹; Costa, S. K. P.¹ - ¹ICB - USP - Farmacologia

Introduction: Previously, we demonstrated that the intradermal (i.d.) injection of the environmental contaminant 1,2-naphthoquinone (1,2-NQ; Cho et al, 2004; Aerosol Sci Technol 38:68-81) evoked a potent plasma extravasation in the mouse skin that is highly modulated by a neurogenic-mediated mechanism (Florenzano et al., SIICUSP 2005). In this study, the concomitant involvement of polymorphonuclear leukocytes (PMNs) in 1,2-NQ-induced cutaneous inflammation was investigated in the mouse normal and six-day air pouch skin. **Methods:** Mice (C57BL/6, 25-30 g) were anaesthetized with urethane (25% m/v, 100 ml/10g body weight; i.p.) or isoflurane. Intradermal (i.d.) injection of 1,2-NQ (10 µg/site) was made in naïve and six-day air pouch skin. Following 24 h i.d. injection, both the plasma extravasation and cell influx assay were evaluated in the mouse normal and six-day air pouch skin. **Results:** 1,2-NQ (10 µg/site) evoked a potent plasma extravasation after 24 h in naïve skin ($P < 0,01$). This effect was not statistically significant when compared to the effect seen in the six-day air pouch skin. The blockade of the tachykinin NK₁ receptor by SR140333 (1 nmol/site) significantly inhibited the 1,2-NQ-induced plasma extravasation (1,2-NQ; 218 ± 77.5 ml/g, n=5) and 1,2-NQ + SR (71 ± 25.5 ml/g; n=5) but had not marked effect on the leukocyte influx (not shown). **Conclusions:** The reactive compound 1,2-NQ caused a similar plasma extravasation in both the mouse normal and six-day air pouch skin by a neurogenic-mediated mechanism. This mechanism however is unlikely to affect the 1,2-NQ-induced leukocyte migration into the mouse air pouch. **Acknowledgements:** We thank M.A.A.G. Barreto, S.A. Teixeira for technical assistance.

Supported by: CNPq and Fapesp

06.072

INHIBITION OF NEUTROPHILIC MIGRATION OF NEW N-PHTHALIMIDE CARBOXYLIC DERIVATIVE N-(3-METHYL-PENTANOIC ACID)-1,3-ISOINDOLINADIONE

Moreira, D. R. M.¹; Barbosa, F. F.¹; Castro, M. C. A. B.²; Magalhaes, L. R.²; Silva, T. G.²; Brondani, D. J.¹; Leite, A. C.¹ - ¹UFPE - Ciências Farmacêuticas; ²UFPE - Antibióticos

INTRODUCTION: The findings of the Structural Activity Relationship (SAR) on Thalidomide and its analogues reveal the pharmacophoric potential of the phthalidic ring, and, at the same time, indicate the toxicophoric profile of the glutarimide group (Antunes et al. 1998). As a result, the phthalimide nucleus has been investigated in search of anti-inflammatory and anti-tumor agents that are more potent and less toxic. As part of a preliminary SAR study, this paper describes the synthesis and evaluation of the anti-inflammatory, cytotoxic and immunomodulatory properties of derivatives of the *N*-aminoacid-1,3-isoindolinadione type. **METHOD:** The in vivo anti-inflammatory evaluation was done by the mice air pouch model (KHANUM et al., 2004), using carragenan as inflammatory inducer with one hour pre-administration of *N*-(3-methyl-pentanoic acid)-1,3- isoindolinadione with a dose of 100 mg.kg⁻¹ administered orally, and taking Thalidomide as the standard drug (p.o.). A positive control group (without any treatment). Air pouches were induced in swiss mice (*n* = 5) by subcutaneous injection 3 and 6 (2.5 cc) days prior to the experiment. 6h after carragenan (1mL, 1% sol.) injection, exudates were retrieved and leukocyte concentration quantified using a Neubauer chamber. **RESULTS AND DISCUSSION:** The results point to the derivative *N*-(3-methyl-pentanoic acid)-1,3- isoindolinadione (**5**) as being the most potent anti-inflammatory of this series, with a percentage of inhibition comparable to that of Thalidomide. The evaluation of derivative at a dose of 10 mg.Kg⁻¹ in the anti-inflammatory assay showed potency similar to that of the standard drug. **Supported by:** CNPq, CAPES , PIBIC and Instituto do Milênio em Fármacos

06.073

PEROXISSOME PROLIFERATOR ACTIVATOR RECEPTOR- γ LIGAND, 15-DEOXI- $\Delta^{12,14}$ -PROSTAGLANDIN J_2 , REDUCES NEUTROPHIL MIGRATION VIA NITRIC OXIDE PATHWAY

Napimoga, M. H.¹; Vieira, S. M.²; Souto, F. O.³; Mestriner, F. L. A. C.⁴; Alves-Filho, J. C.³; Grespan, R.⁵; Freitas, A.³; Dal Secco, D.³; Ferreira, S. H.³; Cunha, F. de Q.³ - ¹UNIUBE - Biologia Celular e Molecular; ²INPA - Coordenação Geral de Pesquisas e Projetos - COPE; ³FMRP - USP - Farmacologia; ⁴USP - Clínica Médica; ⁵UEM - Farmácia e Farmacologia

INTRODUCTION: Ligands for peroxissome proliferator-activated receptor γ (PPAR- γ), such as 15-deoxi- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J_2 (15d-PG J_2) have been implicated as a new class of anti-inflammatory compounds with possible clinical applications. Based on this notion, we designed studies to (1) determine the effects of 15d-PG J_2 -mediated activation of PPAR- γ ligand on neutrophil migration after an inflammatory stimulus and (2) clarify the molecular mechanisms by which the 15d-PG J_2 activity modulates neutrophil migration to inflammation, using a mouse model of peritonitis induced by carrageenan injection. **METHODS/RESULTS:** The results from mouse *in vivo* experiments using a intravital microscopy demonstrated that 15d-PG J_2 administration does decrease leukocyte rolling and adhesion to the inflammatory mesenteric tissues by a mechanism dependent on NO. Specifically, pharmacological inhibitors for nitric oxide synthase (NOS; aminoguanidine and N^G-nitro-L-arginine methyl ester) remarkably abrogated the 15d-PG J_2 -mediated suppression of neutrophil migration to the inflammatory site. Moreover, gene knockout mice deficient of iNOS, compared with their wild type mice, lacked a susceptibility to 15d-PG J_2 -mediated suppression of neutrophil migration to the inflammatory sites. The 15d-PG J_2 -mediated suppression of neutrophil migration appeared to be independent of the production of cytokines and chemokines, because 15d-PG J_2 did not cause any significant differences in the level of their productions in the carrageenan-injected peritoneal cavities. However, up-regulation of carrageenan triggered ICAM-1 expression in mesenteric microcirculation vessels was abrogated by pretreatment of wild-type mice with 15d-PG J_2 . Furthermore, 15d-PG J_2 inhibited F-actin rearrangement process in neutrophils, but did not alter the neutrophil selectin expression, evaluated by FACS. **DISCUSSION:** Theses findings, taken together, demonstrated that 15d-PG J_2 suppress inflammation-initiated neutrophil migration. The 15d-PG J_2 -mediated inhibition of neutrophils migration was dependent on NO expression in the mesenteric tissues in accordance to the diminished ICAM-1 expression in postcapillary endothelium and the suppression of F-actin rearrangement in the neutrophils. **Supported by:** FAPESP # 05-60295-8

06.074

O ESTRESSE CRÔNICO IMPREVISÍVEL NÃO ALTERA A PERDA ÓSSEA SECUNDÁRIA À PERIODONTITE EM RATOS

Campi, P.¹; Varriano, A. A.¹; Maia-Dantas, A.¹; Martins Porto, R.¹; Coelho, C. F.¹; Teixeira, S. A.¹; Costa, S. K. P.¹; Spolidório, L. C.²; Scavone, C.¹; Muscara, M. N.¹ - ¹ICB - USP - Farmacologia; ²UNESP - FO - Araraquara - Patologia

Introdução: A influência de fatores emocionais sobre a doença periodontal vem sendo estudados desde 1965, e duas linhas de pensamento se formaram. Uma leva em conta os hábitos parafuncionais causados pelo estresse e a depressão (tais como fumo, higienização deficiente), os quais são danosos ao periodonto. A outra mostra a participação do sistema nervoso autônomo, cuja ativação constante (dentre outros fatores) é característico nos quadros de depressão e participa da osteopenia. Neste trabalho, estudamos a influência do estresse crônico imprevisível (ECI) sobre a perda óssea alveolar resultante da doença periodontal induzida em ratos. **Métodos:** Ratos Wistar machos (~200 g) foram divididos em três grupos: o grupo P (que teve a periodontite experimental induzida mediante colocação de uma ligadura de algodão ao redor do primeiro molar inferior direito), grupo P+ECI (animais que após a periodontite experimental foram submetidos ao protocolo do ECI; adaptado de Munhoz et al., J. Neurosci. 26:3813, 2006) e o grupo SH (ou Sham, no qual a ligadura foi colocada mas removida imediatamente). O peso corporal dos animais foram registrados aos 7 e 14 dias após a indução da periodontite, e no 15º dia, os ratos foram sacrificados por decapitação para retirada de baço, timo e mandíbulas. Os valores de peso úmido de baço e o timo foram imediatamente registrados. As mandíbulas foram cuidadosamente dissecadas, tratadas com hipoclorito de sódio (2,5%), coradas com azul de metileno a 10% e fotografadas para posterior digitalização e quantificação da área da raiz exposta. **Resultados:** O grupo P+ECI apresentou menor ganho ponderal em comparação aos grupos P e SH, tanto no sétimo dia (12,4±1,4 vs. 21,8±3,3 e 21,8±1,4 g respectivamente) quanto no décimo quarto (35,8±2,9 vs. 45,4±2,7 e 44±3,2 g, respectivamente). O peso do baço foi maior no grupo P+ECI, em relação ao grupo P (P< 0,01) e SH (P<0,01), enquanto que não houve diferença significativa no peso do timo entre os grupos. A perda óssea alveolar apresentou-se aumentada nos animais submetidos à periodontite experimental em comparação aos do grupo SH; porém o ECI não teve efeitos significativos sobre a perda óssea alveolar causada pela periodontite (SH = 2,9±0,1 mm²; P = 4,4±0,5 mm²; P+ECI = 4,5±0,2 mm²). **Discussão:** Os dados da literatura são bastante conflitantes com respeito aos efeitos do estresse sobre a doença periodontal induzida experimentalmente; porém, deve considerar-se que os resultados são fortemente dependentes de vários fatores, tais como tipo e tempo de exposição ao agente estressor, espécie e linhagem de animal utilizado, etc. Nossos resultados sobre evolução ponderal e esplenomegalia confirmam a efetividade do protocolo de ECI utilizado, sem que o mesmo tenha afetado a perda óssea alveolar característica da periodontite. **Apoio Financeiro:** CNPq, CAPES, FAPESP

06.075

PAPEL DE TNF-ALFA E EFEITO PROTETOR DA PENTOXIFILINA NA MUCOSITE ORAL INDUZIDA POR RADIOTERAPIA DE MEGAVOLTAGEM EM HAMSTERS

Bezerra, N. P.¹; Alexandre, A. A. T. V. A.²; Silva, L. R.¹; Medeiros, R. P.¹; Marques Neto, R. D.¹; Almeida, P. R. C.³; Vale, M. L.¹; Brito, G. A. C.¹; Lima, V.¹; Moura, J. F. B.¹; Ribeiro, R. A.¹ - ¹UFC - Fisiologia e Farmacologia; ²UFC - Medicina; ³UFC - Patologia

Introdução: A mucosite oral (MO) é uma resposta inflamatória da mucosa à ação de radioterapia ou fármacos antineoplásicos e constitui-se num efeito colateral debilitante. Tem sido descrito, em modelo de MO induzido por radiação de ortovoltagem, a participação de mediadores inflamatórios, particularmente citocinas e radicais livres de oxigênio. Recentemente, desenvolvemos um modelo de MO induzido por radiação de megavoltagem. No presente estudo foi avaliado o papel de TNF- α e o efeito protetor da pentoxifilina (PTX), um inibidor de TNF- α e outras citocinas pró-inflamatórias, no modelo recém-estabelecido em nosso laboratório de MO induzida por radioterapia (RXT) com aparelho de megavoltagem-Cobalto-60 (MV-Co⁶⁰). **Métodos:** Foram utilizados, respeitando as diretrizes aprovadas pelo comitê de ética em pesquisa (CEP), 150 hâmsers Golden Siriam machos, com massa corporal média de 139 \pm 38 gramas, provenientes do Biotério Setorial do Depto. Fisiologia e Farmacologia-UFC. Os animais foram submetidos à RXT da mucosa jugal utilizando dose única de 3500 cGy em aparelho de MV-Co⁶⁰ com campo direto e bolus sobre a mucosa. No 4ºd pós-RXT foram feitas irritações mecânicas (IM) na mucosa jugal como fator potencializador da MO. Grupos de animais (n=10 cada) receberam por via s.c. PTX (5, 15 ou 45 mg/kg) ou Salina (0,5 ml) diariamente, durante 13 d, quando então, foram mortos e avaliados os seguintes parâmetros da MO: análise macroscópica (hiperemia, áreas hemorrágicas, úlceras e abscessos), histologia (infiltrado celular, dilatação e ingurgitamento vascular, hemorragia, edema, úlceras e abscessos) e detecção de TNF- α por imunohistoquímica. Ainda, foram analisados leucograma e variação de massa corpórea dos animais. Os dados foram expressos como mediana e valores extremos ou média \pm epm. **Resultados e Discussão:** A PTX (15 mg/kg) foi capaz de reduzir ($p < 0,05$) hiperemia, hemorragia úlceras e abscessos (Md=0; 0-2), quando comparada a animais com MO e que receberam apenas Salina (Md=3; 2-3). Estes dados foram confirmados pela análise histopatológica das mucosas, onde PTX 15 mg/kg (Md=1; 1-3) reduziu ($p < 0,05$) o infiltrado inflamatório, dilatação e ingurgitamento vasculares, edema, úlceras e abscessos, quando comparada aos animais que receberam apenas Salina (Md=3; 1-3). Ainda, PTX 15 mg/kg reduziu, a marcação do TNF- α nas mucosas com MO, quando comparada aos animais não tratados. A PTX não alterou o hemograma, nem a variação de massa corpórea observada na MO. Em resumo, a pentoxifilina, na dose de 15 mg/kg, apresentou um efeito antiinflamatório protetor importante, confirmado pela avaliação do mediador inflamatório TNF- α no modelo de MO induzido por RXT de megavoltagem associado à irritação mecânica em hamster, podendo, portanto, prestar-se para seu estudo em futuros protocolos clínicos. **Apoio Financeiro:** CNPq

06.076

INCREASE IN CEREBROSPINAL FLUID (CSF) PROSTAGLANDIN (PG) LEVELS INDUCED BY CECAL LIGATION AND PUNCTURE (CLP) IN RATS AND THE EFFECT OF ACETAMINOPHEN IN THIS RESPONSE

Figueiredo, M. J.¹; Soares, D. de M.¹; Machado, R. R.²; Pessini, A. C.²; Martins, J. M.¹; Torres, D.¹; Cunha, F. de Q.¹; Souza, G. E. P.² - ¹FMRP - USP - Farmacologia; ²FCFRP - USP - Física e Química

Introduction: Sepsis is the systemic response to severe infection in which fever is the most frequent manifestation. In this study we analyzed the changes in the PGE₂ levels in the CSF after CLP-sepsis induction and the effect of acetaminophen in this response. The relationship between fever and the levels of PGE₂ in the CSF were also investigated. **Methods:** Body temperature (bT) was measured by biotelemetry in male Wistar rats (200-250 g b.w.), every 30 min, during 48 h, after CLP (four punctures, 16-gauge needle) or sham (control animals). Animals were anesthetized with 2,2,2-tribromoethanol 2,5% (250 mg/kg ip) before surgery (CLP or sham). The survival was monitored by 7 days. CSF was collected from each animal (0, 3, 6, 12, 24 e 48h, after CLP) according to the method described by Consiglio and Lucion¹. PGE₂ was measured using ELISA kits. **Results:** Besides to induce a long lasting fever² CLP increased PGE₂ concentration in the CSF at 6, 12, 24 and 48h. However, only at 6h there was a significant correlation between fever and CSF PGE₂ level (r=0.9; p<0.05). The CSF PGE₂ level remained higher than the controls at 12, 24 and 48 h although the fever declined at the level of sham animals. Acetaminophen (75; 150 and 300 mg/kg, per os, 1h after CLP) did not alter the fever. In spite of that, at 300 mg/kg acetaminophen reduced the PGE₂ level 6 h after CLP. At this dose acetaminophen did not alter bT of control animals. At doses of 150 and 300mg/kg acetaminophen increased (from 50 to 80%) the survival of animals. **Conclusion.** Although CLP induces fever and increases the CSF PGE₂ level (6h) it seems that PGE₂ does not mediate this febrile response since the concentrations of the eicosanoid remained elevated the fever declined. Moreover, acetaminophen decreased CSF PGE₂ level without alters the fever. Once only the highest dose of acetaminophen inhibited the increase of PGE₂ in the CSF and both doses of acetaminophen (150 and 300 mg/kg) increased the survival it is possible that this protective effect of acetaminophen is not related to PGE₂ synthesis inhibition and needs to be investigated. ¹ Consiglio & Lucion, Brain Res Protoc, v.5, p.109-114, 2000 ² Figueiredo et al., SBFTE, 2005 **Supported by:** CAPES, CNPq, FAPESP.

06.077

EFEITO DA ROSIGLITAZONA SOBRE A PERDA ÓSSEA ALVEOLAR SECUNDÁRIA À PERIODONTITE INDUZIDA EM RATOS

Martins Porto, R.¹; Teixeira, S. A.¹; Varriano, A. A.¹; Campi, P.¹; Maia-Dantas, A.¹; Herrera, B. S.¹; Zanet, T. G.²; Fenyó-Pereira, M.²; Spolidório, L. C.³; Costa, S. K. P.¹; Muscara, M. N.¹ - ¹ICB - USP - Farmacologia; ²FO - USP - Radiologia; ³UNESP - FO - Araraquara - Patologia

Introdução: Os antihiperlipidêmicos da família das glitazonas ativam os receptores do PPAR (Receptor Ativado por proliferadores de peroxissomo) gama. Considerando que esta ativação está relacionada não somente à inibição da produção de alguns mediadores inflamatórios (tais como o NO, TNF- α e IL-1) que estimulam a reabsorção óssea promovida pelos osteoclastos, como também à inibição da diferenciação de células precursoras em osteoblastos (o que prejudicaria o processo de reparação do tecido ósseo), no presente trabalho decidimos estudar os efeitos do tratamento com doses terapêuticas (antihiperlipidêmicas) de rosiglitazona sobre o processo de perda óssea alveolar decorrente da periodontite induzida em ratos, assim como possíveis alterações de alguns marcadores bioquímicos clínicos. **Métodos:** Ratos Wistar machos (180 – 220 g) foram tratados durante duas semanas prévias a realização protocolo experimental com diferentes doses de maleato de rosiglitazona (1, 2 e 5 mg/kg/dia; p.o.) ou veículo (1 mL/kg/dia de CMC 0,5%; p.o.) e o tratamento continuou até o dia sacrifício. Os animais foram anestesiados com pentobarbital (42 mg/kg, i.p.) e uma ligadura de algodão foi colocada em torno da cervical do primeiro molar inferior direito para fins de indução de periodontite (no grupo de animais Sham, a ligadura foi retirada imediatamente após o procedimento). Desta forma, ficaram determinados os grupos Sham (S), Perio (P) tratados com veículo, Perio1 (P1), Perio2 (P2) e Perio5 (P5) tratados com 1, 2 e 5 mg/kg/dia de rosiglitazona, respectivamente, que foram sacrificados 3, 7 ou 14 dias após a indução para avaliar a perda óssea alveolar (distâncias em mm entre a junção cimento-esmalte e a crista óssea alveolar, medidas a partir dos registros radiográficos das mandíbulas). Amostras de soro ou plasma foram também coletadas nestes tempos para análises bioquímicas (ALT, AST, gama-GT e bilirrubina para avaliação de função hepática, creatinina e uréia para avaliação de função renal, glicose e triglicérides). **Resultados:** Independentemente do tratamento, a presença de periodontite causou significativa perda óssea quando avaliada tanto no sétimo dia (S: 0,24 \pm 0,06, P: 0,52 \pm 0,04, P1: 0,53 \pm 0,03, P5: 0,62 \pm 0,03; p<0,01 vs. Sham) quanto no décimo quarto dia (S: 0,27 \pm 0,11, P: 1,14 \pm 0,17, P1: 0,74 \pm 0,16, P5: 0,95 \pm 0,07; p<0,05 para P1 vs. S, e p<0,01 para os restantes grupos vs. S). No décimo quarto dia após a colocação da ligadura, aumento significativo na atividade de AST foi observado nos grupos P2 e P5 quando comparados ao grupo P1 (125,8 \pm 6,9%, p<0,01; 122,1 \pm 9,5%, p<0,05 vs 90,33 \pm 5, respectivamente) e na de gama-GT entre os grupos P2 e P1 (85,37 \pm 8,68 vs. 180,51 \pm 23%, p<0,01, respectivamente). Não foram observadas diferenças entre os diversos grupos experimentais quanto aos restantes parâmetros bioquímicos. **Discussão:** Podemos concluir que doses terapêuticas do antihiperlipidemiante rosiglitazona não interferem significativamente com o processo de perda óssea alveolar causada pela periodontite. O tratamento provocou aumento na atividade de gama GT e AST, porém esses aumentos estão dentro dos valores de referência considerados normais para ratos wistar.

Apoio financeiro: CNPq, CAPES, FAPESP.

06.078

THE ESSENTIAL ROLE OF 5-LIPOXYGENASE PATHWAY FOR NEUTROPHIL INFLUX IN A NOVEL EXPERIMENTAL MODEL OF GOUT

Amaral, F. A.¹; Costa, V. V.¹; Coelho, F. M.¹; Fagundes, C. T.¹; Teixeira, M. M.¹; Souza, D. da G. de² - ¹UFMG - Bioquímica e Imunologia; ²UFMG - Microbiologia

INTRODUCTION: Arthritic gout is characterized by precipitation of uric acid crystals (UAC) on several tissues and especially in articular cavities. Crystal deposition causes local inflammation that can compromise the quality of life of patients. Few studies have evaluated the role of mediators of inflammation in models of articular gout. Indeed, most studies use injection of UAC in cavities, such as the peritoneum. This study aimed to develop a model of articular gout and investigate the role of 5-lipoxygenase in mediating joint inflammation. **METHODS:** Wild type male C57/BL6 (WT) and 5-lipoxygenase knock-out (5-LO^{-/-}) mice were used. UAC were prepared by precipitation of the crystals after addition of uric acid to a borate buffer solution (pH 8.5). For the experiments, a dose of 100µg of UAC diluted in 10 µl of borate buffer plus uric acid (pH 8.5) and injected in the tibio-femoral joint. Hypernociception was measured by a digital analgesimeter (Insight mod. EFF-301). Samples of periarticular tissue were removed for cytokine and chemokine (ELISA) analysis and neutrophil quantification (MPO). A joint lavage (BSA 3%; 10µL) was used to evaluate the cell infiltration on the articular space. **RESULTS:** UAC induced a time-dependent influx of neutrophils in the joint (3, 6, 9, 12, and 24 hours). Maximal neutrophil recruitment occurred at 6 h. At this time point, there was also hypernociception. Using 5-LO^{-/-} mice, we observed a reduction in the number of infiltrating neutrophils after UAC injection. There was also a reduction of MPO values and inhibition of the local production of IL-1β and MIP-2. **DISCUSSION:** We describe an animal model of acute gout in which UAC are injected directly in the articular joint. This leads to local inflammation and hypernociception. Moreover, our studies show that a 5-LO-derived molecule plays a major role in driving leukocyte influx to the joint and surrounding tissues. **Supported by:** CNPq and FAPEMIG

06.079

EFEITO DO LASER DE BAIXA POTÊNCIA OPERANDO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO (904 NM) NO EDEMA DE PATA INDUZIDO POR CARRAGENINA EM RATOS

Labat, R.¹; Pallotta, R. C.¹; Ramos, L.¹; Penna, S. C.¹; Lopes-Martins, R. A. B.¹ - ¹ICB - USP - Farmacologia

Introdução: A reação inflamatória é representada por um grupo de reações gerais e locais do organismo contra uma agressão, podendo ir do grau leve à perda de função do tecido ou órgão afetado. Existem poucos estudos relatando a eficácia do laser de baixa potência sobre o processo inflamatório, especialmente na faixa do infravermelho. O propósito do presente estudo é investigar o efeito da terapia com laser infravermelho operando com comprimento de onda de 904 nm e potência de 15 mW, sobre o processo inflamatório agudo de edema de pata em ratos, induzido pela carragenina.

Métodos: O edema foi provocado pela injeção sub-plantar de carragenina, (100 mg/pata). O volume da pata foi medido antes e após a administração do agente flogístico nos tempos de 1, 2, 3, 4, 6, 12 e 24 horas, utilizando-se para isso um hidropletismógrafo (Ugo Basile, Varese-Italy). A irradiação com laser foi realizada utilizando-se as energias de 1,5 Joules – grupo II e 3,0 Joules – grupo III, uma hora após a administração de carragenina. O controle recebeu apenas carragenina na dose mencionada anteriormente (Grupo I). O aumento do volume das patas inflamadas é apresentado como percentual de aumento, comparando com a medida inicial (tempo zero). **Resultados.** Na primeira hora após injeção de carragenina o edema apresentado nos grupos I, II e III foi da ordem de 31%, 31% e 24%, respectivamente. Na segunda hora o grupo controle apresentou aumento do volume da pata de 44%, o grupo II apresentou os mesmos 31%* da primeira hora, já no terceiro grupo o edema foi reduzido para 18%**.

Na terceira hora o grupo controle apresentou aumento de 49% do volume da pata, enquanto os grupos irradiados (II e III) registraram um aumento de 38%* e 29%* respectivamente. Na quarta hora o grupo controle apresentou aumento do volume da pata, atingindo 55%, com 36%* para o grupo II, e 32%* para o grupo III. Já, na sexta hora, os grupos (I, II e III) apresentaram um edema de 46%, 33%* e 40% respectivamente. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos tratados e controle nos intervalos de 12 e 24 horas. **Discussão:** O Laser de baixa potência operando com comprimento de onda de 904 nm foi efetivo para redução do edema induzido por carragenina já na primeira hora após a indução até a sexta hora. Os animais do grupo II que receberam energia de 1,5 J apresentaram inibição máxima (área sob a curva) de 67%, enquanto o grupo III, irradiados com 3,0 J apresentou uma inibição de 60%. O perfil da redução do edema foi diferente para cada energia utilizada. No grupo III, tratado com 3J foi observado uma maior redução do edema nos primeiros intervalos após o tratamento, diferente no grupo II, tratado com 1,5J, onde esta redução foi menos acentuada e com duração maior.

Apoio Financeiro: FAPESP Grants 05/02117-6

06.080

ROLE OF ENDOTHELINS ON NEUTROPHIL RECRUITMENT AND EDEMA FORMATION IN ZYMOBAN-INDUCED ARTHRITIS

Conte, F. P.¹; Penido, C.¹; Henriques, M. G.¹ - ¹FIOCRUZ - IOC - Farmacologia Aplicada

Introduction Endothelins (ETs) are peptides produced by a wide variety of cells that exert their functions through ET_A and ET_B receptors. Raised ET-1 levels were found in plasma [Kuryliszyn-Moskal *et al Clin Rheumatol* 25:314, 2006] and synovial fluids [Nahir *et al J Rheumatol* 18:678 1991] of patients with rheumatoid arthritis, an autoimmune disease characterized by cell influx, edema formation and joint destruction. The aim of this study was to evaluate the role of ETs in knee joint inflammation. **Methods and Results** We evaluated in C57BL6 mice the effect of intraarticular (i.a.) injection of ET_A and ET_B receptor antagonists (BQ-123 and BQ-788, 15pmol/cav, respectively) on zymosan(zy)-induced arthritis. Pre-treatment with BQ-123 and BQ-788 reduced 6h zy-induced accumulation of neutrophil (35 and 25 % respectively, n=10), edema formation (8 and 10% respectively, n=10) and TNF- α levels (30 and 35% respectively); as well as 24h zy-induced neutrophil (70 and 70% respectively, n=10), edema formation (16 and 12% respectively, n=10) and CXCL1 levels (45 and 29% respectively). Moreover, 6h after zy stimulation we observed an increase in CD14⁺/ET-1⁺ and CD3⁺/ET-1⁺ cells (25 and 25 fold; respectively) when compared to control group. Next, we observed that i.a. administration of exogenous ET-1 (10pmol/cav) in C57BL6 mice induced at 6h an increase on cellular migration, mainly due to neutrophil accumulation (sal $0.25 \pm 0.005 \times ET$ $0.93 \pm 0.007 \times 10^4$ cells/knee, n=10) and on edema formation (sal $0.12 \pm 0.04 \times ET$ $0.47 \pm 0.09 \Delta mm/knee$, n=10), that peaked within 6h and returned to basal levels at 36h. A selective ET_B receptor agonist, sarafotoxin S6c (S6c; 30pmol/cav; i.a.), induced at 6h a significant increase on cellular recruitment, mainly by neutrophil accumulation (sal $1.3 \pm 0.018 \times S6c$ $6.61 \pm 0.134 \times 10^4$ cells/knee, n=10) and on edema formation (sal $0.14 \pm 0.04 \times S6c$ $0.37 \pm 0.05 \Delta mm/knee$, n=10). **Discussion** Taken together, this results point to a participation of ETs on knee joint inflammation. ETs seem to play an important pro-inflammatory activity during ZIA, inducing secretion of cytokines, edema formation and neutrophil influx into the inflamed knee joints acting through both receptors. **Supported by:** CNPq/FIOCRUZ

06.081

EFEITO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE O ÓXIDO NÍTRICO (NO) INALATÓRIO E O SULFETO DE HIDROGÊNIO NO EDEMA DE PATA EM CAMUNDONGOS.

Coelho, C. F.¹; Teixeira, S. A.¹; Bolonheis, S. M.¹; Varriano, A. A.¹; Gouvea, I. M.¹; Lopes-Martins, R. A. B.¹; Costa, S. K. P.¹; Muscara, M. N.¹ - ¹USP - Farmacologia

Introdução: Com base nas similaridades apresentadas entre o NO e o sulfeto de hidrogênio (H₂S), alguns estudos *in vitro* mostram que a incubação de sulfeto de sódio (Na₂S; gerador de H₂S em meio ácido) com diversos doadores de NO ou com o próprio NO gasoso, resulta na formação de um nitrosotiol, e é proposto que esta formação também possa ocorrer *in vivo*, podendo assim regular funções fisiológicas importantes do organismo, tanto no sítio da sua formação quanto periféricamente. Nosso trabalho propõe investigar o efeito da administração concomitante de NO por via inalatória e Na₂S sobre a resposta edematogênica induzida na pata de camundongos pela injeção intramuscular de carragenina. **Métodos:** O edema de pata foi induzido em camundongos Swiss machos (15-20 g) pela injeção intramuscular de carragenina nas patas traseiras. Os animais receberam Na₂S (3 mmol/Kg) por via i.p 15 min antes da indução do edema, e a administração do NO inalatório (13,6 ppm em ar ambiente durante 10 min) ou da indometacina (5 mg/Kg, i.p.) ocorreu 30 min após a indução do edema. O volume das patas (mL) foi medido durante 24 horas por hidropletismometria. **Resultados:** O Na₂S administrado via i.p. nas doses de 3 - 100 mmol/kg ou o NO inalatório sozinho, não tiveram efeitos significantes no edema de pata (4 h após, carragenina: 0.118±0.007 mL, carragenina + Na₂S 3 mmol/kg: 0.108±0.009 mL, carragenina + NO: 0.108±0.004 mL). No entanto, quando a menor dose de Na₂S (3 mmol/kg) foi administrada em combinação com NO inalatório, observou-se inibição significativa da resposta inflamatória, assim como a indometacina (carragenina + Na₂S + NO: 0.084±0.008 mL, indometacina: 0,065±0,006 mL, p>0.01). **Conclusão:** O NO administrado por via inalatória e o H₂S podem atuar de forma sinérgica promovendo uma resposta anti-edematogênica; se este efeito é devido à formação de nitrosotiol (ou outro composto resultante da reação entre ambas espécies gasosas) ainda deve ser determinado. **Apoio financeiro:** CAPES, FAPESP, CNPq.

06.082

ALPHA-1 ACID GLYCOPROTEIN INHIBITED NEUTROPHIL CHEMOTAXIS BY A NITRIC OXIDE/GUANYLATE CYCLASE-DEPEDENT PROCESS

Souto, F. O.¹; Spiller, F.²; Alves-Filho, J. C.²; Freitas, A.²; Basile-Filho, A.¹; Cunha, F. de Q.² - ¹FMRP - USP - Cirurgia e Anatomia; ²FMRP - USP - Farmacologia

INTRODUCTION: Recently, we isolated the acute phase protein alpha-1-acid glycoprotein (AGP) from serum of patients with severe sepsis. The purified protein, as well as the commercial sample of AGP, inhibited carrageenan-induced neutrophil migration and rolling/adhesion to the peritoneal cavity by a nitric oxide (NO)-dependent mechanism. Furthermore, AGP induced the NO production in human neutrophils and SNAP, NO donor, inhibited CXCL8-induced human neutrophil chemotaxis.

OBJECTIVES: The aim of this study was to evaluate the effect of AGP on human neutrophil chemotaxis *in vitro* and the possible involvement of NO/guanylate cyclase (GC)-pathway in this process.

METHODS: Neutrophils were isolated from peripheral blood of healthy donors by percoll gradients and incubated with different concentrations of AGP (5, 50 or 500 µg/mL) or antibody anti-L-selectin (0.1, 1 or 10 µg/mL) for 1 h. The neutrophils also were treated with aminoguanidine (AG, an inhibitor of NO synthase, 30µM) or 1H-(1,2,4) oxadiazolo (4,3-α) quinoxalin-1-one (ODQ, an inhibitor of GC, 30 mM) for 30 min before AGP or anti-L-selectin treatment. After treatments, neutrophil chemotaxis was induced by CXCL8 (IL-8) in the chamber Boyden.

RESULTS: AGP pretreatment resulted in a marked inhibition of CXCL8-induced chemotaxis. Incubation with AG or ODQ before pretreatment with AGP partially prevented this inhibitory effect of AGP. Interestingly, the pretreatment of cells with an antibody anti-L-selectin resulted in a marked inhibition of CXCL8-induced chemotaxis which was also partially prevented with AG or ODQ treatment.

CONCLUSION: These data suggest that AGP might interact with L-selectin inhibiting human neutrophil chemotaxis by an NO/GC-dependent process. **Supported by:** FAPESP, CAPES, CNPq and FAEPA

06.083

HYDROGEN SULFIDE MODULATES NEUTROPHIL MIGRATION AND NOCICEPTION: ROLE OF ATP-SENSITIVE POTASSIUM CHANNELS

Dal Secco, D.¹; Cunha, T. M.¹; Freitas, A.¹; Alves-Filho, J. C.¹; Fukada, S. Y.¹; Grespan, R.¹; Souto, F. O.²; Alencar, N. M. N. de³; Neto, A. F.⁴; Ferreira, S. H.¹; Cunha, F. de Q.¹ - ¹FMRP - USP - Farmacologia; ²FMRP - USP - Cirurgia e Anatomia; ³UFC - Fisiologia e Farmacologia; ⁴FCFRP - USP - Ciências Farmacêuticas

Introduction: Neutrophils are critical cells involved in tissue damage observed in inflammatory diseases, such as arthritis and glomerulonephritis. Hydrogen sulfide (H₂S) is an endogenous gaseous mediator synthesized from L-cysteine by two enzymes: cystathionine-γ-lyase (CSE) and cystathionine-β-synthetase (CBS). Recent studies have shown that H₂S might be involved in the genesis of inflammatory events. In the present study, we addressed the role of H₂S in modulating neutrophil migration in either innate (LPS-challenge in naïve mice) or adaptive (mBSA-challenge in immunized mice) immune response and inflammatory nociception. The involvement of ATP-sensitive potassium (K_{ATP}) channels for such effects was also evaluated. **Methods and Results:** It was observed that the treatment of BALB/C mice (male-20g) with CSE inhibitor, DL-Propargylglycine (PAG; 0.1-1.0 nmol/kg) reduced leukocyte rolling and adhesion on venular endothelial cells, neutrophil migration and peritoneal exudate induced by endotoxin (LPS; 100 ng/cavity). Moreover, PAG (300 mM) reduced the LPS (1.0 µg/mL)-induced adhesion molecule (CD18) expression on blood neutrophils, evaluated by flow cytometry. On the other hand, the treatment of the animals with H₂S donor, Sodium hydrosulfide (NaHS; 3.0-30 µmol/kg) increased these parameters. Furthermore, the neutrophil migration induced by administration of mBSA into peritoneal cavity (30 µg/cavity) or femour/tibial joint (10 µg/joint) in immunized mice was also inhibited or enhanced by PAG (1.0 nmol/kg) or NaHS (30 µmol/kg) treatments, respectively. The PAG or NaHS treatment did not change the peritoneal or joint release of chemotractant inflammatory mediators, such as TNF-α, KC and LTB₄. However, *in vitro* neutrophil chemotaxis induced by IL-8 (10 ng/mL) or fMLP (10⁻⁷ M) was inhibited by PAG (30-300 µM) and enhanced by NaHS (30-300 µM) pretreatment. The NaHS, but not PAG, effects on neutrophil recruitment *in vivo* or *in vitro* was prevented by treatment with glibenclamide (40 µmol/kg), a K_{ATP} channel blocker. Similarly to NaHS, diazoxide (100 µmol/kg), a well known K_{ATP} channel opener, also enhanced (via a glibenclamide-sensitive mechanism) the LPS-induced neutrophil recruitment. Regarding the nociceptive process, PAG (1.0 nmol/kg) treatment reduced LPS (100 ng/paw)-induced inflammatory hypernociception. However, mice treated with NaHS (30 µmol/kg) also presented decreasing of hypernociception induced by LPS or PGE₂ (100 ng/paw) by a mechanism dependent on K_{ATP} channels. **Conclusion:** Together, our data suggest that CSE-CBS/H₂S pathway up-modulates the neutrophil rolling, adhesion and locomotion, by a mechanism dependent on K_{ATP} channels, during innate or adaptive immune response. Furthermore, H₂S has dual effect on inflammatory nociceptive response: a pro-hypernociceptive effect due its ability to up-regulates the neutrophil migration, and an antinociceptive effect by directly activating the K_{ATP} channels in nociceptive neurons. Therefore, these results identify H₂S synthesis and K_{ATP} channels inhibitors as potential targets for development of novel anti-inflammatory therapies. **Supported by:** CAPES, FAPESP and FAEPA

06.084

ESTUDO DO INFLUXO LEUCOCITÁRIO INDUZIDO PELO VENENO DA SERPENTE *Bothrops insularis* EM CAMUNDONGOS

Souto, P.¹; Moreira, V.¹; Nascimento, N. G.¹; Teixeira, C. F. P.¹ - ¹Instituto Butantan - Farmacologia

INTRODUÇÃO. A serpente *Bothrops insularis*, conhecida popularmente como jararaca-ilhoa, é uma espécie endêmica encontrada na Ilha da Queimada Grande, São Paulo, Brasil. Diferente de outras espécies botrópicas do continente, essa serpente se alimenta, principalmente, de aves, devido à inexistência de roedores na ilha. Em comparação a outras espécies do gênero *Bothrops*, a toxinologia do veneno de *B. insularis* (VBi) e seus efeitos biológicos são pouco conhecidos, tais como os processos inflamatórios. Este estudo visa avaliar a capacidade do VBi induzir o influxo leucocitário e o decurso temporal deste efeito. **MÉTODOS.** Camundongos Swiss machos (18-20 g) receberam a administração intraperitoneal (i.p.) de VBi em doses crescentes (0,01; 0,05; 0,25 g/kg) ou salina apirogênica (controle). Após 3, 6, 24 e 48 h dessa administração, efetuou-se a coleta do exsudato peritoneal, com 2,0 ml de salina apirogênica, para a determinação do número total de células e contagem diferencial dos leucócitos presentes, ao microscópio de luz. A contagem total de leucócitos foi realizada em câmara de Neubauer, a partir de alíquotas diluídas em solução de Turk (1:20; v/v). A contagem diferencial de células foi realizada por em lâminas coradas com o corante de Rosenfeld, com base em critérios de morfologia convencional. Foram contadas pelo menos 100 células, classificadas como polimorfonucleares (PMN) ou mononucleares (MN). **RESULTADOS.** A injeção i.p. de VBi, nas doses de 0,01 e 0,05 g/kg, causou influxo de leucócitos para a cavidade peritoneal dos animais entre 3 e 6 h da injeção. A dose de 0,25 g/kg causou influxo leucocitário significativo entre a 6^a e 48^a h, com efeito máximo na 24^a h (VBi= $41,5 \pm 8,7 \times 10^5$ leuc./mL; controle= $12,3 \pm 1,8 \times 10^5$ leuc./mL). A contagem diferencial, nas doses de 0,01 e 0,05 g/kg, evidenciou predominância de células PMN, em relação ao grupo controle. Por outro lado, a dose 0,25 g/kg não induziu influxo de células PMN, mas de MN na 6^a, 24^a e a 48^a h, se comparado ao controle (VBi= $12,6 \pm 2,5$; $29,8 \pm 4,5$; $20 \pm 2,6 \times 10^5$ leuc./mL, respectivamente, e controles= $5,3 \pm 0,7$; $12,3 \pm 1,8$; $12,1 \pm 1,3 \times 10^5$ leuc./mL, respectivamente). **DISCUSSÃO.** Os dados obtidos indicam que o VBi é capaz de induzir o influxo leucocitário em camundongos, em doses baixas, com predominância de PMN nos períodos iniciais e de MN em períodos mais tardios, ao passo que na maior dose, este veneno tem uma ação específica para migração de leucócitos MN. Estes resultados corroboram a literatura que mostra uma intensa infiltração de leucócitos no local da injeção do veneno de serpentes do gênero *Bothrops* e revelam a potência do veneno de *B. insularis* para induzir este efeito. Este fato pode refletir diferenças de componentes inflamatórios ou quimiotáticos presentes nos venenos de serpentes continentais e insulares. **Apoio Financeiro:** FAPESP, CNPq

06.085

ESTUDO DA MODULAÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO NO MODELO EXPERIMENTAL DE FLEBITE INDUZIDA POR VINOURELBINE

Tavora, A. C. V. C. F.¹; Melo, A. C. L.¹; Monteiro, T. C.¹; Ribeiro, R. A.¹; Brito, G. A. C.¹; Souza, M. H. L. P.¹ - ¹UFC - Fisiologia e Farmacologia

Introdução: Vinorelbine (VNB), um alcalóide semi-sintético da vinca, é um quimioterápico antineoplásico com propriedades irritantes e vesicantes. O mecanismo fisiopatológico destes efeitos adversos permanece obscuro. Este trabalho objetiva avaliar o papel do óxido nítrico (NO) no modelo experimental de flebite induzida pelo VNB. **Métodos:** Camundongos Swiss machos (20-30g) foram divididos em grupos (n=5), contidos em equipamento apropriado, e salina (ev) ou VNB (12mg/Kg, ev) foram administrados pela veia lateral da cauda. Outros animais foram tratados com L-NAME (50 mg/Kg ou 100mg/Kg, ip) ou L-NAME (50mg/kg) + L-arginina (300mg/kg ou 600mg/kg, ip) 1 hora antes do VNB e depois de 6 em 6 horas. Em outro grupo, aminoguanidina (50 mg/Kg, ip) foi administrada 1 hora antes da infusão de VNB e depois de 6 em 6 horas. Outros camundongos foram tratados com 1400W (1mg/kg ou 3mg/kg, sc) ou sildenafil (5mg/kg, 10 mg/kg ou 20 mg/kg, vo) 30 minutos antes da administração de VNB. Creme tópico de dinitrato de isossorbida (1% ou 5%) foi aplicado em toda a extensão da cauda 1 hora antes e após 12 horas da infusão de VNB em outro grupo de camundongos. Dezoito horas após administração de VNB e 30 minutos após receberem Azul de Evans 25mg/kg (AE, ev, plexo orbitário) os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e um segmento da cauda foi retirado e submetido ao protocolo de avaliação do aumento da permeabilidade vascular. **Resultados:** A administração de VNB induziu aumento estatisticamente significativo do extravasamento de AE, quando comparado à administração de solução salina (<0,01). O tratamento L-NAME (50mg/kg) aumentou significativamente o extravasamento de AE em relação ao grupo tratado apenas com VNB (p<0,01). No entanto, não houve diferença estatisticamente significativa no extravasamento de AE entre animais que receberam VNB e aqueles tratados com VNB + L-NAME + L-Arginina (p>0,05), VNB + aminoguanidina (p>0,05), VNB + 1400W (p>0,05), VNB + sildenafil (p>0,05) ou VNB + dinitrato de isossorbida (p>0,05). **Discussão:** VNB é um irritante venoso capaz de induzir aumento da permeabilidade vascular quando injetado na veia da cauda de camundongos, avaliada neste trabalho pelo extravasamento de AE. A inibição da síntese de NO por L-NAME (50mg/Kg) aumentou significativamente o extravasamento de AE induzido por VNB, sugerindo um papel protetor do NO. No entanto, o tratamento com inibidores mais seletivos para NO sintase induzida, como AG e 1400W, bem como com moduladores positivos para NO, sildenafil e dinitrato de isossorbida, não alterou de forma estatisticamente significativa o extravasamento de AE. Estes resultados sugerem que NO não desempenha papel patológico consistente na flebite induzida por VNB.

Apoio Financeiro: CNPq

06.086

DOENÇA PERIODONTAL INDUZIDA EM RATOS: EFEITOS OXIDATIVOS DIFERENCIAIS EM GLÂNDULAS SALIVARES MAIORES

Maia-Dantas, A.¹; Campi, P.¹; Martins Porto, R.²; Teixeira, S. A.²; Herrera, B. S.²; Gouvea, I. M.²; Costa, S. K. P.²; Spolidório, L. C.³; Muscara, M. N.² - ¹Instituto de Ciências Biomédicas - Farmacologia; ²USP - Farmacologia; ³UNESP - FO - Araraquara - Patologia

Introdução : A boca através do contato direto com o meio ambiente, poderia ser a porta de entrada para muitas doenças. Essas infecções não ocorrem principalmente pelo papel protetor que as mucosas e a saliva desempenham. A periodontite é uma doença infecciosa, causada por bactérias presentes na cavidade bucal, que acomete os tecidos de suporte do dente. Uma possível relação entre essa enfermidade e problemas sistêmicos (tais como doenças cardíacas e problemas na gravidez) vem sendo relatada; porém, pouco se sabe sobre seus possíveis efeitos nas glândulas salivares e na saliva. O presente trabalho visa analisar as possíveis alterações nas glândulas salivares maiores decorrentes da indução da doença periodontal em ratos, em termos de acúmulo de neutrófilos (como atividade tecidual de mieloperoxidase) e peroxidação lipídica nesses tecidos. **Métodos**: Ratos Wistar machos (~250 g) anestesiados com ketamina/xilazina (i.p.) foram submetidos à indução de periodontite através da colocação de ligadura de algodão ao redor dos primeiros molares inferiores direitos (nos animais Sham, a ligadura foi imediatamente retirada). Após 3, 7 ou 14 dias após o procedimento, os animais foram sacrificados e as glândulas salivares foram retiradas e congeladas a -80°C para posterior análise das espécies reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARs, indicador de peroxidação lipídica) e da atividade de mieloperoxidase (MPO). **Resultados**: O conteúdo de TBARS na porção direita da glândula submandibular (ipsilateral ao procedimento de colocação da ligadura) de animais com periodontite 14 dias após ligadura apresentou-se mais elevado do que no respectivo grupo Sham (63,2±8,0 vs 43,0±8,0 nmol aldeído/mg tecido; p<0,05) e do que na porção contralateral (45,7±2,0 nmol aldeído/mg tecido; p<0,05). No entanto, na glândula parótida ocorreu um conteúdo maior de TBARs em sua porção contralateral do que na porção ipsilateral (41,3±0,2 vs 37,4±1,1 nmol aldeído/mg tecido; p<0,05). Quanto à atividade de MPO na glândula submandibular, os nossos resultados preliminares sugerem uma elevação no grupo com periodontite. Não foram observadas diferenças no conteúdo de TBARs ou na atividade de MPO entre os grupos de animais ou entre as porções das glândulas que foram coletadas 3 ou 7 dias após o procedimento de indução de periodontite. **Discussão**: Com base nos resultados acima pode-se afirmar que como consequência da presença de doença periodontal severa há ocorrência de alterações bioquímicas indicativas de estresse oxidativo nas glândulas salivares maiores estudadas no rato. Contudo o sentido oposto dos sinais observados nas glândulas submandibulares e parótidas, pode ser indicativo da ocorrência de respectivos efeitos deletérios e compensatórios em cada uma delas como resultado da presença de doença periodontal em estágio avançado. **Apoio financeiro**: CNPq, FAPESP, CAPES.

06.087

ESTRÓGENO (E) E PROGESTERONA (P) MODULANDO A EXPRESSÃO DE MOLÉCULAS DE ADESÃO EM MODELO DE INFLAMAÇÃO ALÉRGICA PULMONAR (IAP).

Ligeiro de Oliveira, A. P.¹; Golega, B.¹; Vanni Domingos, H.¹; Oliveira-Filho, R. M.¹; Tavares de Lima, W.¹ - ¹USP - Farmacologia

Introdução: A terapia de reposição hormonal em mulheres na pós-menopausa associa-se ao aumento na incidência de asma (Cohen & Holbrook, 2004), fenômeno que pode também relacionar-se com aumento da expressão de moléculas de adesão por efeito dos HSF. Neste estudo, avaliamos o efeito do tratamento com estrógeno e progesterona sobre a modulação da expressão ICAM-1 e Mac-1 em ratas ovariectomizadas (OVx) e submetidas a IAP. **Métodos:** Ratas foram sensibilizadas (OA/alúmen) após 1 (OVx-1) ou 7 dias de OVx (OVx-7) ou falsa operação (Sh). Após 14 dias, foram desafiadas (OA, 1%), sacrificadas 24 h após, realizado lavado broncoalveolar (LBA) e as células utilizadas para análise da expressão de ICAM-1 e Mac-1 por intensidade de fluorescência em citometria de fluxo. O tratamento com estrógeno (E; 280 mg) e progesterona (P; 200 mg) foi realizado 24 h antes do desafio.

Resultados:

	Basal	Sham-1	OVx-1	OVx-1+E	OVx-1+P
ICAM-1	18±0,3	22,5±2,1	29,6±1,5**	17±1,4***	26,1±1,6
Mac-1	17,6±0,6	15,4±0,1	26,2±4**	19,5±0,5***	18,6±0,5***
	Basal	Sham-7	OVx-7	OVx-7 +E	OVx-7+P
ICAM-1	18±0,3	29,2±1,6*	15,7±1,1**	27,4±1,3***	13,1±1,2
Mac-1	17,6±0,6	23,7±1,7*	14,7±1,6 **	21,7±1,6 ***	11,1±2

* p<0,05 em relação ao respectivo grupo Basal; **P<0,05 em relação ao grupo Sham; *** p<0,05 em relação ao respectivo grupo OVx. **Discussão:** O tratamento com estrógeno e progesterona reverte o aumento da expressão de ICAM-1 e Mac-1 no grupo OVx-1. Por outro lado, apenas o tratamento com estradiol foi efetivo em reverter a reduzida expressão de ICAM-1 e Mac-1 no grupo OVx-7. Verificamos, assim, a participação dos HSF na magnitude da IAP através de seu efeito sobre a modulação das moléculas de adesão. **Apoio Financeiro:** FAPESP (01/13384-4; 04/14128-0) e CNPq

06.088

MIGRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS INDUZIDA POR HEME DEPENDE DA VIA DA 5-LIPOXIGENASE

Monteiro, A. P. T.¹; Diaz, B. L.²; Bozza, M. T.³; Barja Fidalgo, T. C.⁴; Canetti, C.⁵ -
¹UERJ - Farmacologia e Psicobiologia; ²INCA - Biologia Celular / CPQ; ³FIOCRUZ - IOC - Farmacologia; ⁴UERJ - Farmacologia; ⁵UFRJ - IBCCF

Introdução: Em doenças que promovem hemólise, como malária e esquiemia-reperusão, sabe-se que são encontrados altos níveis de heme livre, evento este associado ao desenvolvimento de inflamação. Neutrófilos são os primeiros a serem recrutados para o local da infecção e, uma vez ativados, são capazes de fagocitar, liberar seus conteúdos granulares e gerar grande quantidade de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Já está descrito que heme é capaz de induzir migração de neutrófilos *in vitro* (neutrófilos humanos) e *in vivo* (pleurisia em ratos). É sabido também que o heme induz a expressão de interleucina 8, liberação de espécies reativas de oxigênio e inibe a apoptose de neutrófilos. Aqui, buscamos analisar os mecanismos pelos quais o heme é capaz de induzir a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal em camundongos. **Materiais e Métodos :** Camundongos C57Bl6, SV129, e 5-LO^{-/-} foram injetados intraperitonealmente com salina ou heme (50nmoles) e após 4 hs sacrificados. A cavidade foi lavada (5 mL de PBS heparinizado) e o número de neutrófilos presentes avaliado por meio de contagem total (câmara de Neubauer) e diferencial das células. Para avaliar o envolvimento dos produtos da via do ácido araquidônico/5-lipoxigenase (5-LO) também tratamos os animais com inibidores da 5-LO, zileuton (3 mg/Kg; i.v.) e AA861 (1mg/kg; s.c.). Com o objetivo de avaliar a participação do leucotrieno B₄ (LTB₄), foram usados 2 antagonistas do receptor BLT1, CP105696 (3mg/kg; s.c.) e LY292476 (2mg/kg; s.c.). Para analisar se o heme é capaz de induzir degranulação de mastócitos provenientes da medula óssea de camundongos, as células foram expostas a diferentes doses de heme e a atividade da b-hexozaminidase determinada por reação colorimétrica. **Resultados:** Heme induz migração de neutrófilos para cavidade peritoneal de camundongos. Quando aplicado em camundongos 5-LO^{-/-}, essa migração é significativamente reduzida. O mesmo ocorre quando o heme é administrado em animais pré-tratados com zileuton, AA861, CP105696 e LY292476, confirmando o envolvimento de produtos da 5-LO e, ainda sugerindo a participação do LTB₄. O heme não foi capaz de induzir degranulação de mastócitos de medula óssea de camundongos. **Conclusão:** Heme induz migração de neutrófilos para cavidade peritoneal de camundongos, e essa migração parece ser, em parte, dependente de produtos da via da 5-LO, uma vez que a migração apresentou-se menor em camundongos 5-LO^{-/-}, assim como em animais que tiveram a enzima 5-LO inibida farmacologicamente com zileuton ou com AA861. O envolvimento do LTB₄ nesse processo é verificado, pois a migração foi reduzida quando foram usados antagonistas do receptor BLT1. **Apoio financeiro:** SR2-UERJ, CNPq, CAPES e FAPERJ.

06.089

LECTIN FROM *Hypnea cervicornis* REDUCES ROLLING AND ADHESION OF NEUTROPHILS BY DIRECT AND/OR INDIRECT MECHANISMS

Bitencourt, F. S.¹; Figueiredo, J. G.²; Mota, M. R. L.¹; Silvestre, P. P.¹; Bezerra, C. C. R.¹; Dal Secco, D.³; Cavada, B. S.²; Sampaio, A. H.²; Vale, M. R.¹; Cunha, F. de Q.³; Alencar, N. M. N. de¹ - ¹UFC - Fisiologia e Farmacologia; ²UFC - Bioquímica e Biologia Molecular; ³FMRP - USP - Farmacologia

Introduction: Lectins are (glyco)proteins that can recognize and reversibly bind to carbohydrates or other substances derived from sugars and are encountered throughout animal and plant kingdoms. Several biological activities of plant lectins have been described, including pro-inflammatory and anti-inflammatory effects. *Hypnea cervicornis* is a species of red algae found in the coast of Northeast of Brazil. The isolated lectin (*H. cervicornis* agglutinin – HCA) is a polypeptide containing a mixture of 90 amino acids residues (9193±3 Da) which binds specifically to glycoproteins of mucin type. The aim of the present work was to study the anti-inflammatory activity, not exploited yet, of a lectin isolated from the red marine alga HCA in peritonitis model, investigating its role on leucocyte-endothelium interaction and production/involvement of nitric oxide (NO) *in vivo*. **Methods:** Mice (n=6) were treated by saline (i.v.) or HCA (1 and 10 mg/Kg; i.v.) or non-selective, N-nitro-L-arginine (nitro; 50 mg/Kg; s.c.), or selective inducible NO synthase (iNOS), aminoguanidine (amino; 50 mg/Kg; s.c.) inhibitors and after 30 minutes peritonitis was induced by injection of carrageenan (Cg; 500µg). Four hours after the peritonitis induction, cells in peritoneal cavity were counted and expressed as mean±S.E.M cellsx10³/mL. The leukocyte rolling (2nd hour) and adhesion (4th hour) were examined by intravital microscopy and NO production (in the serum- 4th hour) was based on the Griess reaction. The data are presented as means±S.E.M. and compared using ANOVA and Bonferroni test. *p* < 0.05 was considered to be statistically significant. **Results:** HCA reduced the number of neutrophils to 158±84 and 54±11 at doses 1 and 10 mg/Kg, respectively (control group=1775±107) and only amino, but not nitro, inhibited (3360±101) the anti-inflammatory activity of HCA (1 mg/Kg) when compared with HCA alone group (1058±92) in Cg model. HCA (10 mg/Kg) decreased rolling and adhesion (6.0 leukocytes rolling/10µm/min, 0.38 adherent cells/100 µ², respectively) - control group=34.0 and 1.36, respectively. The lectin (47±11 µM de NO₂⁻) was able to induce NO production when compared to control group (14±3 µM de NO₂⁻). **Discussion:** HCA presents anti-inflammatory activity which could be explained by: 1- a direct competitive blockage with a common selectin carbohydrate ligand and/or 2- an indirect, via NO production, which also decrease rolling and adhesion of the leukocytes on endothelium. **Keywords:** lectin, *Hypnea cervicornis*, nitric oxide, anti-inflammatory. **Acknowledgements:** CNPq e FUNCAP

06.090

FIBROBLASTOS GENGIVAIS DE CAMUNDONGOS DIABÉTICOS ESTIMULADOS POR LPS EXPRESSAM COLÁGENO TIPO 1

Machado, M. A.¹; Oliveira, S. H. P.¹ - ¹UNESP - FO - Araçatuba - Ciências Básicas

Introdução: Fibroblastos são células capazes de fagocitar partículas estranhas ao organismo e produzir colágeno apresentando papel crítico no processo de reparo tecidual. Dentre as alterações periodontais relacionadas aos fibroblastos durante o diabetes destaca-se a modificação da atividade e expressão de fatores de crescimento e mecanismos responsáveis pela cicatrização. A hiperglicemia pode alterar a síntese, maturação e homeostasia do colágeno. O objetivo do presente estudo foi avaliar a expressão de colágeno tipo I (Col I) em fibroblastos gengivais de camundongos diabéticos estimulados por lipopolissacarídeo (LPS). Métodos: Camundongos balb/c foram tratados com estreptozotocina (STZ), (80mg/g) durante 5 dias, recebendo uma dose a cada dia, para indução do diabetes. No 6° dia foi retirada uma alíquota de sangue para determinação da glicemia. Esta alíquota de sangue foi depositada em uma fita sensível e colocada para leitura em um aparelho denominado Accu-Chek advantage. Animais com valor igual ou superior a 250 mg/dl foram considerados diabéticos e separados para coleta da gengiva. As gengivas dos animais foram retiradas e seus fragmentos mantidos em cultura com DMEM completo com 10% SFB rico em glicose (20 mM) para o crescimento dos fibroblastos gengivais diabéticos (FgD). A partir da 4° passagem os FgD foram plaqueados em placas de 24 poços até atingirem confluência para os ensaios. As células foram estimuladas por LPS nas doses de 0,1, 1, 10 e 100 µg /ml e após 1, 6 e 24 horas foi avaliada a expressão de Col I pela técnica de RT-PCR. Resultados: Observamos que FgD estimulados por LPS na dose de 0,1 mg/ml foram capazes de expressar Col I já na primeira hora, no entanto, a medida que a concentração de LPS foi aumentando (1, 10 e 100 µg/ml), essa expressão foi sendo inibida. Seis e 24 horas após, observamos a expressão de Col I em todos os grupos avaliados (grupo controle e estimulados por LPS). Discussão: Em conclusão, esses resultados preliminares sugerem que FgD estimulados por LPS na dose de 0,1 µg/ml são capazes de expressar Col I, no entanto, doses maiores de LPS inibem essa expressão na primeira hora, possivelmente devido a produção de algum fator inibitório durante o processo.

Apoio Financeiro: FAPESP e CNPq

06.091

ATRASENTAN, A SELECTIVE ENDOTHELIN ET_A RECEPTOR ANTAGONIST, ATTENUATES COLITIS INDUCED BY 2,4,6-TRINITROBENZENE SULFONIC ACID (TNBS) IN MICE.

Claudino, R. F.¹; Bento, A. F.¹; Calixto, J. B.¹; Rae, G. A.¹ - ¹UFSC - Farmacologia

Introduction: Endothelins (ETs: ET-1, ET-2 and ET-3) are peptides produced by many cell types, which exert potent and widespread effects via activation of two specific G protein-coupled receptors named endothelin ET_A and ET_B receptors. ETs can act as proinflammatory agents through several mechanisms, including the release of proinflammatory cytokines, induction of local ischemia, or by enhancing permeability of the intestinal mucosa to luminal pathogens and antigens. These peptides can also promote adhesion of circulating leucocytes to venular endothelium, an initial step in the process of cellular migration into the inflamed tissue. Recent evidence suggests that inflammatory bowel disease (IBD) is associated with elevated intestinal concentrations of ETs and an up-regulation in ET receptor expression on intestinal vascular endothelium. Thus, the ET system may constitute a relevant therapeutic target in IBD.

Objectives: The aim of this study was to determine the susceptibility of colonic inflammation in a mouse model of TNBS-induced IBD to reversal by treatment with the selective ET_A receptor antagonist atrasentan. **Methods and Results:** Male Balb/c mice, weighing 20-25 g, were fasted for 24 h and anesthetized with a mixture of xylazine and ketamine. Colitis was induced by injection of 0.1 ml of 1.5 mg TNBS in 50% ethanol into the lumen of the colon via a catheter. Twenty four hours later, mice were treated with atrasentan (1-10 mg/kg once daily, i.v.) or dexamethasone (1 mg/kg twice daily, s.c.). Control mice received 0.1 ml of 0.9% NaCl solution using the same protocol. Seventy two hours after colitis induction, mice were sacrificed and their colons were removed for evaluation of the following parameters: macroscopic damage, MPO activity and tissue levels of KC (the murine cytokine equivalent of human IL-8). Spleen weight was also determined. **Results:** Both macroscopic damage and MPO activity were increased 20-fold in colon tissue of TNBS-treated mice as compared those seen in the control group. Treatment with dexamethasone (1 mg/kg) or Atrasentan (3 and 10 mg/kg) reduced macroscopic damage by 92.1±2.8, 49.7±14.3 and 75.0±8.3%, respectively. MPO activity was also reduced by dexamethasone (1 mg/kg) or atrasentan (10 mg/kg) by 91.8±3.9 and 78.6±8.1%, respectively, but the ET_A receptor antagonist was ineffective at 1 or 3 mg/kg. While dexamethasone reduced spleen weight significantly by 55.7±3.2% relative to control values, atrasentan did not affect the weight of this organ. TNBS-induced colitis caused a marked 40-fold increase in colonic KC levels. Treatment with dexamethasone (1 mg/kg) or atrasentan (10 mg/kg) fully reversed the amount of this cytokine in colon tissues to basal levels. **Conclusion:** Altogether, these results show for the first time that the curative treatment with the highly selective ET_A receptor antagonist atrasentan significantly attenuated colonic injury and inflammation parameters induced by TNBS in mice. The anti-inflammatory effects of atrasentan are associated with a down-regulation of colonic levels of the proinflammatory cytokine KC and an attenuation of neutrophil recruitment. Experiments aiming to further elucidate the mechanisms underlying this effect are now in progress.

Supported by: CAPES, CNPq, PRONEX, FAPESC.

06.092

EFFECT OF ANTIPYRETICS DRUGS ON BOTH FEVER AND THE LEVEL OF PROSTAGLANDIN E₂ AFTER CENTRAL INJECTION OF RANTES IN RATS

Machado, R. R.¹; Soares, D. de M.²; Proudfoot, A. E. I.³; Souza, G. E. P.¹ - ¹FCFRP - USP - Física e Química; ²FMRP - USP - Farmacologia; ³Serono Pharmaceutical Research Institute - Biology

Introduction- RANTES (Regulated on activation, normal T cells expressed and secreted), a CC chemokine acts on CCR1, CCR3, and CCR5 receptors and promotes a febrile response sensitive to some steroidal and non steroidal antipyretic drugs. This study investigated the effects of selective and non-selective cyclooxygenase blockers on both fever and the level of prostaglandin (PG) E₂ in the cerebrospinal fluid (CSF) after injection of RANTES into the anterior hypothalamus preoptic area (AH/POA).

Methods- RANTES (25 pg/rat) was injected into the AH/POA in male Wistar rats (200 g b.w.). Control animals received vehicle only. Body temperature (bT, °C) was measured for up to 6 h by telethermometry. Ibuprofen (IBU, 10 mg/kg, i.p.), Indomethacin (2 mg/kg, i.p.) and CELEC (5 mg/kg, p.o.) were administered 30 min before RANTES. The CSF of the animals was collected 2.5 and 5 h after injection of RANTES by puncture of *cisterna magna*. PGE₂ was measured using Prostaglandin E₂ Parameter Assay Kit (R & D Systems). **Results-** IBU abolished the fever between 60 min and 2.5 h after administration, in addition it reduced the temperature until the end of observation period. INDO only significantly reduced the fever response to RANTES during the last 60 min; CELEC abolished the fever response to the chemokine during the entire 6 h period of observation. RANTES induced 11- and 4.5-fold increase in PGE₂ level in the CSF at 2.5 and 5 h, respectively, compared to control animals. IBU, INDO and CELEC given before RANTES administration brought the CSF PGE₂ level near to control values at both time points studied. **Discussion-** The inhibitory effects of celecoxib and ibuprofen suggest that PGE₂ was generated via COX-2. As indomethacin dissociates fever and the decrease of PGE₂ level during the RANTES-induced fever, an alternative COX-2 independent pathway or other mechanisms of action of celecoxib and ibuprofen might be considered. **Supported by:** FAPESP (Proc. Nr. 03/04838-7 and 05/55717-0)

06.093

ENDOGENOUS CANNABINOIDS INDUCE FEVER DEPENDENT ON PROSTAGLANDINS AND ENDOGENOUS OPIOIDS

Fraga, D.¹; Zanoni, C. I. S.¹; Parada, C. A.²; Souza, G. E. P.³ - ¹FMRP - USP - Farmacologia; ²UNICAMP - Farmacologia; ³FCFRP - USP - Física e Química

AIM: The involvement of endocannabinoids in the control of body temperature and in the fever response has not yet been studied. For this reason, the present study aimed to investigate the contribution of the endogenous cannabinoids in the febrile response.

METHODS: Changes in rectal temperature were measured in a 30 min interval up to 6 h by inserting a thermistor probe in the rectum of male Wistar rats. All data are reported as mean±standard error mean in the peak of temperature response. All pre-treatments were made 30 min before the stimulus. **RESULTS:** The i.c.v. administration of the endocannabinoid anandamide (ANA) induced a dose dependent increase in body temperature (4.0h: Vehicle= -0.0 ± 0.1 ; ANA $0.01\mu\text{g}$ = 0.4 ± 0.1 ; ANA $0.1\mu\text{g}$ = 0.9 ± 0.1 ; ANA $1.0\mu\text{g}$ = 1.5 ± 0.0 ; ANA $10.0\mu\text{g}$ = $1.5\pm 0.1^\circ\text{C}$). The increase in body temperature induced by the i.c.v administration of anandamide $1.0\mu\text{g}$ was followed by a decrease in the tail skin temperature (4.0h Rectal: Vehicle= -0.1 ± 0.1 ; ANA= 1.2 ± 0.1 ; Tail: Vehicle= 0.0 ± 0.1 ; ANA= $-0.7\pm 0.1^\circ\text{C}$). The selective CB₁ agonist ACEA (arachidonyl-2-chloroethylamide) induced a bell shaped increase on body temperature (5.0h: Saline= 0.1 ± 0.0 ; ACEA $0.001\mu\text{g}$ = 0.6 ± 0.2 ; ACEA $0.01\mu\text{g}$ = 1.4 ± 0.1 ; ACEA $0.1\mu\text{g}$ = 0.8 ± 0.2 ; ACEA $1.0\mu\text{g}$ = $0.6\pm 0.1^\circ\text{C}$). The i.c.v injection of the selective CB₂ agonist AM1241 ((*R,S*)-(+)-(2-Iodo-5-nitrobenzoyl)-[1-(1-methyl-piperidin-2-ylmethyl)-1*H*-indole-3-yl]methanone) did not induce change on body temperature. The i.c.v. pre-treatment with the selective CB₁ antagonist AM251 (N-(piperidin-1-yl)-5-(4-iodophenyl)-1-(2,4-dichlorophenyl)-4-methyl-1*H*-pyrazole-3-carboxamide) reduced in a dose dependent fashion the fever induced by the i.c.v injection of anandamide $1.0\mu\text{g}$ (5.0h: Vehicle/Saline= 0.0 ± 0.1 ; AM251 $10.0\mu\text{g}$ /Vehicle= 0.2 ± 0.1 ; Vehicle/ANA $1.0\mu\text{g}$ = 1.8 ± 0.1 ; AM251 $10.0\mu\text{g}$ /ANA $1.0\mu\text{g}$ = 0.6 ± 0.2 ; AM251 $5.0\mu\text{g}$ /ANA $1.0\mu\text{g}$ = 0.4 ± 0.1 ; AM251 $1.0\mu\text{g}$ /ANA $1.0\mu\text{g}$ = $1.6\pm 0.2^\circ\text{C}$). The pre-treatment of the animals with AM251 $5.0\mu\text{g}$ reduced the fever induced by ACEA $0.01\mu\text{g}$ (5.0h: AM251/Saline= 0.1 ± 0.1 ; Saline/ACEA= 1.5 ± 0.1 ; AM251/ACEA= $0.5\pm 0.1^\circ\text{C}$). The pre-treatment of the animals with AM251 $5.0\mu\text{g}$, i.c.v. reduced the fever induced by LPS 50.0 mg/kg , i.p. (48%). The pre-treatment of the animals with the non-selective cyclooxygenase (COX) inhibitor, ibuprofen 10.0mg/kg , i.p. reduced the fever of anandamide $1.0\mu\text{g}$, i.c.v. (53%). The selective COX-2 inhibitor celecoxib 5.0mg , p.o., also reduced the fever to anandamide $1.0\mu\text{g}$, i.c.v (40%). The pre-treatment of the animals with the non-selective opioid antagonist naloxone 1.0mg/kg , s.c. abolished the fever induced by anandamide $1.0\mu\text{g}$, i.c.v. (100%). **CONCLUSIONS:** Altogether these results suggest that endogenous cannabinoids, through the activation of the CB₁ receptor, seem to be involved in the development of febrile response via the synthesis of prostaglandin and endogenous opioids.

Supported by: CNPq

06.094

SB225002, A CXCR2 ANTAGONIST, SUPPRESSES COLONIC INFLAMMATION INDUCED BY TRINITROBENZENE SULFONIC (TNBS) ACID IN MICE

Bento, A. F.¹; Hara, D. B.¹; Claudino, R. F.¹; Leal, P. C.²; Calixto, J. B.¹ - ¹UFSC - Farmacologia; ²UFSC - QMC / CFM

Introduction: The recruitment of inflammatory cells into damaged tissue is a normal physiological response. However, the excessive recruitment of such cells often exacerbates tissue damage. Inhibition of inflammatory cell recruitment may be an appropriate therapeutic strategy in a number of inflammatory diseases (White, J Biol Chem., 273, 10095, 1998). In the present study we have further examined some of the mechanisms through which the SB225002 (SB) prevents TNBS-induced colitis in mice.

Methods: Briefly, 24 hours-fasted male Balb/c mice (20-25g) were anesthetized with xylazine and ketamine. Colitis was induced by intracolonic administration of 0.1 mL containing 1.5 mg TNBS in 50% ethanol. After 24 h, mice were treated with SB (0.1, 0.3 and 1 mg/kg, i.p.) or with dexamethasone (DE) (1 mg/kg, s.c.) twice a day. Control mice received 0.1 mL of the saline using the same protocol. Mice were sacrificed 72 h after colitis induction and the following parameters were evaluated: the macroscopic damage, body weight, spleen weight, MPO activity and tissue cytokine levels (IL-1beta, IL-4, IL-10 and KC). **Results:** Macroscopic score and MPO activity were about 22- and 23-folds increased in colon tissue of mice with colitis compared to those of control group, respectively. Either DE (1 mg/kg) or SB (0.1, 0.3 and 1 mg/kg) treatment significantly reduced TNBS-induced macroscopic damage in 88.1±2.1, 17.8±6.1, 86.2±3.1 and 76.9±5.8%, respectively. MPO activity was also reduced by the same treatments with inhibitions of 91.8±3.9, 46.4±13.8, 78.8±1.5 and 60.9±7.6%, respectively. The administration of TNBS caused a significant decrease in body weight (12.8±1.8%). However, the body weight was gradually recovered following the treatment with both DE and SB. Of note, SB treatment did not significantly affect the spleen weight, while DE treatment significantly reduced it in 48.7±3.2% comparing to those in the control group. Animals with TNBS-induced colitis exhibited an increase of about 16-folds in the IL-1beta and about 40-folds in KC levels. The treatment with SB (0.3 mg/kg) significantly reduced the levels of both IL-1beta and KC by 80.5±7.8% and 99.2±0.4% in colon tissues, respectively. Likewise, the treatment with DE (1 mg/kg) reduced to the basal levels the amount of these cytokines. The production of both IL-10 and IL-4 were about 2-folds reduced in colon tissue of TNBS-induced colitis mice. Animals treated with either SB (0.3 mg/kg) or DE (1 mg/kg), increased the levels of IL-10 by 57.2±20.5 and 37.8±17.6% over the basal levels, respectively. The levels of KC were also significantly increased by 71.4±12.6% and 60.6±15.2% over the basal levels by the treatment with SB (0.3 mg/kg) or DE (1 mg/kg), respectively. **Conclusion:** Collectively, these results shown that the systemic treatment with a CXCR2 selective antagonist SB significantly attenuated the colonic injury and inflammation parameters induced by TNBS in mice. The anti-inflammatory effects of SB are likely associated with a down regulation of pro-inflammatory cytokines (IL-1beta and KC), following by up regulation of anti-inflammatory cytokines (IL-10 and IL-4) and attenuation of the recruitment of neutrophil which suggests that SB could be a potential alternative for the treatment of colitis. **Supported by:** CAPES, CNPq, FAPESC

06.095

ANTIINFLAMMATORY AND ANTINOCICEPTIVE EFFECT OF THE SELECTIVE NON PEPTIDE KININ B₂ RECEPTOR ANTAGONIST FR173657 IN A TNBS-INDUCED MODEL OF ACUTE PANCREATITIS IN RATS

Fernandes, E. S.¹; Bento, A. F.¹; Paszcuk, A. F.¹; Venancio, A. M.¹; Gomez, J. R.²; Calixto, J. B.¹ - ¹UFSC - Farmacologia; ²Universidad Agraria de la Habana - Medicina Veterinária

Introduction: Acute pancreatitis is an inflammatory process that can be lethal (Cuzzocrea S., Cytokine, 18: 274, 2002). It has been widely suggested that bradykinin (BK) is involved in the pancreatitis pathology (Griesbacher T., Kinin System. 197, 1997). However, the exact cellular and molecular mechanisms by which BK can contribute to this disease are not completely understood. Herein, we sought to analyse some mechanisms underlying the BK involvement in a model of acute pancreatitis induced by the trinitrobenzene sulfonic (TNBS) acid. We also investigated the correlation of the kinin B₂ receptor activation to distinct events that are characteristics of acute pancreatitis. **Methods:** Acute pancreatitis was induced by a single 500 µl intrapancreatic injection of TNBS 2% in male Wistar rats (120-140 g). After pancreatitis induction animals were sacrificed (1-28 days) and the blood and pancreas were collected for analysis. Visceral hypernociception was evaluated by means of stimulation with Von Frey hairs (2.0 g). B₂ receptor contribution was evaluated in selective B₂ receptor antagonist FR173657-treated animals (30 nmol/kg,s.c., twice a day, 3-7 days). **Results:** TNBS injection is capable of causing important histological alterations characterizing a substantial pancreatic inflammation which peaked at 3 days after pancreatitis induction when compared with vehicle-treated animals. These alterations included a massive neutrophil influx, bacterial colonization, thrombosis and necrosis of the peripancreatic and interlobular pancreatic tissue. Repeated FR173657 treatment for 3 days caused a significant reduction of the pancreatic inflammatory process. Besides, this antagonist was capable of diminishing the serum amylase and the serum and pancreatic IL-1β levels in TNBS-treated animals 3 days after pancreatitis induction (39.3±11.5, 89.5±7.7 and 39.0±11.0 %, respectively). In addition, TNBS caused a sustained abdominal hypernociception which was largely reduced by the 7 day treatment with FR173657 (61.1±14.9 %). **Discussion:** Herein, we demonstrated that TNBS-induced pancreatitis causes an acute inflammatory process in the pancreas accompanied by significant systemic alterations. Also, TNBS injection leads to a visceral hypernociceptive response. Moreover, we showed important additional mechanisms concerning the role of bradykinin and its receptor in this disease, as the selective kinin B₂ receptor antagonist FR173657 had an important effect in reducing both inflammatory and hypernociceptive alterations induced by TNBS. These results contribute to the perspective that kinins can be an attractive target to the treatment of acute pancreatitis, not only to treat the pancreatitis severity but also one of the major complaints observed in this pathology, the abdominal pain. **Supported by:** CNPq/CAPES/ FAPESC/FINEP/PRONEX

06.096

AMINO Guanidine RESTORED MAST CELL NUMBERS AND REACTIVITY IN ALLOXAN-DIABETIC RATS.

Torres Florim, L.¹; Carvalho, V.¹; Barreto, E.²; Martins, M. A.¹; Silva, P. M. R. e¹ -
¹FIOCRUZ - IOC - Fisiologia e Farmacodinâmica; ²UFAL - Genética e Biologia Molecular

Introduction: Diabetes mellitus is a group of metabolic disorders characterized by chronic hyperglycemia, which is considered as the primary cause of several microvascular complications. Some major mechanisms have been proposed for hyperglycemia-induced tissue damage including increased polyol pathway flux and advanced glycation end products (AGE) formation. In animal models, both AGE formation and multiple diabetic complications were suppressed by aminoguanidine, an inhibitor of AGE formation. We previously described that alloxan-diabetic rats were refractory to antigen challenge by a mechanism dependent on the down-regulation of mast cell population associated with increased levels of apoptosis. This study was carried out to investigate the potential involvement of AGEs in the mast cell alterations noted in diabetic rats. **Methods:** Male Wistar rats were rendered diabetic by an intravenous injection of alloxan (40 mg/kg) and the analyses were performed 21 days later. Mast cell numbers and reactivity were evaluated by means of toluidine blue dye and histamine quantification by fluorimetric assay, respectively. Rats were treated with the inhibitor of AGE formation, aminoguanidine (250 mg/kg, p.o.), once a day starting on day 3 after alloxan injection. **Results:** We showed that treatment with aminoguanidine completely inhibited the reduction in the number of mast cells present in the pleural cavity of diabetic rats. Restoration of the basal number of mast cells enumerated in the mesentery was also noted after aminoguanidine. By means of histamine quantification, we observed that the refractoriness of mast cells from diabetic rats to bradykinin activation *in vitro* was clearly inhibited by the compound. Coherently, the up-regulation of Bax, a pro-apoptotic member of Bcl-2 family, in mast cells from diabetics was abrogated after treatment with aminoguanidine. **Discussion:** Our findings show that aminoguanidine restored the alloxan-induced mast cell depletion and hyporeactivity, in a clear association with apoptosis suppression, indicating that AGE formation seems to play a critical role in these phenomena. They also reinforce the idea that AGEs do importantly contribute to diabetic pathology. **Supported by:** FIOCRUZ, CNPq.

06.097

CHARACTERIZATION OF INFLAMMATORY OEDEMA INDUCED BY CRUDE VENOM AND FRACTIONS OF *Lachesis muta muta* VENOM

Ferreira, T.¹; Camargo, E.¹; Antunes, E.¹; Damico, D. C.²; Marangoni, S.²; Nucci, G. de¹; Landucci, E. C. T.¹ - ¹UNICAMP - Farmacologia; ²UNICAMP - Bioquímica

Introduction: Human envenoming by *Lachesis muta muta* snake venom is severe, being characterized by pain, oedema, swelling, hemorrhage and coagulopathy. These effects are similar to those caused by *Bothrops* genus venoms, but no studies attempted to characterized the inflammatory effects induced by *Lachesis muta muta* venom. Therefore, we have investigated the ability of crude venom and fractions of *Lachesis muta muta* to induce skin and paw oedema in rats. **Methods:** Crude venom of *Lachesis muta muta* was fractioned using HPLC column (250x10 mm i.d.). The crude venom or five fractions obtained were used. Experiments were performed in male Wistar rats (180–250 g). Local plasma protein extravasation in response to intradermally injected test agents (100 µL/site in Tyrode solution) was measured in the dorsal skin, as the accumulation of intravenously injected (i.v.) ¹²⁵I-human serum albumin (2.5 µCi rat⁻¹). Plasma extravasation evaluated at 30 min after the injection of test agents. The plasma extravasation was expressed as the volume (µL) of plasma accumulated at each skin site compared to the total counts in 1 mL of plasma. Rat paw oedema was induced by a single subplantar injection (0.1- 10/paw) of the crude venom or fractions. The paw volume was measured using a hydroplethysmometer before (basal) and at selected times after injection. **Results:** The crude venom (0.3-3 µg/paw, n=5) induced a concentration- dependent rat paw oedema, which peaked between 15-30 min after the injection. All venom fractions (1µg/paw), except of fraction 5, increased significantly the rat paw oedema, which was more evident for fractions 2 and 3 (0.78±0.04 and 0.65±0.07 mL.h respectively) compared with saline (0.26±0.05 mL.h). In the rat skin, the crude venom (0.1-10 µg/site) also induced plasma extravasation in a concentration-dependent manner. All venom fractions (1 µg/site) induced skin plasma extravasation (87±10.6, 145±12, 127.9±12, 91.9±4.5 and 100±7.1 µL respectively for fractions 1 to 5), compared with Tyrode (4.4±2.6 µL). **Conclusion:** We have shown that crude *Lachesis muta muta* venom is able to induced inflammatory oedema in rat paw and skin. The fractions 2 and 3 were the more oedematogenic, and will be used for further studies. **Supported by:** FAPESP

06.098

RAT LEUKOCYTE MIGRATION INDUCED BY A KUNITZ-TYPE INHIBITOR ISOLATED FROM *Dimorphandra mollis* SEEDS

Mello, G. C.¹; Desouza, I.²; Macedo, M. L. R.³; Antunes, E.² - ¹FCM - UNICAMP - Farmacologia; ²UNICAMP - Farmacologia; ³UNICAMP - Bioquímica

INTRODUCTION: Plant proteinase inhibitors have been described as useful tools in biochemical and physiological studies to understand the proteinase functions in human pathologies, such as hemorrhage, inflammation and cancer. In a recent study, we have reported the oedematogenic activity of DMTI-II (23 kDa), a serine proteinase inhibitor Kunitz-type isolated from *D. mollis* (Leguminosae-Mimosoideae) seeds. We have now investigated the leukocyte migration induced by DMTI-II and the inflammatory mediators involved in this phenomenon. **METHODS:** Male Wistar rats (250-280g) were intraperitoneally injected with DMTI-II (1-100 µg/cavity), and at 4 – 24h thereafter the leukocyte counts in peritoneal lavage fluid were evaluated. The inflammatory mechanisms involved in DMTI-II-induced cellular migration were investigated using the following drugs: (1) Dexamethasone (0.5 mg/kg); (2) Celecoxib (3 mg/kg); (3) Indomethacin (5 mg/kg); (4) The lipoxygenase inhibitor AA-861 (0.2 mg/kg); (5) Platelet activating factor (PAF) antagonist receptor PCA4248 (5mg/kg); (6) The dual histamine / serotonin inhibitor cyproheptadine (2 mg/kg); (7) Tachykinin NK₁ antagonist SR-140333 (100 µg/kg); (8) Tachykinin NK₂ antagonist SR-48968 (1 mg/kg); (9) The NO synthesis inhibitor L-NAME (20 mg/kg) and (10) The iNOS preferential inhibitor aminoguanidine (75 mg/kg); and cellular migration was evaluated 16h-post DMTI-II administration. **RESULTS:** DMTI-II induced a dose-dependent total leukocyte accumulation, which peaked at 16h after injection. At 4h after DMTI-II injection (10 µg/cavity), the neutrophil and eosinophil counts increased by 14- and 10-fold, respectively, reaching a maximum response at 16h (22- and 16-fold increase, respectively). Treatments with dexamethasone, cyproheptadine, celecoxib and PCA4248 significantly reduced (P<0.05) DMTI-II-induced neutrophil and eosinophil influxes, whereas the other treatments used had not effects. **CONCLUSION:** DMTI-II is able to attract neutrophils and eosinophils into the rat peritoneal cavity by mechanisms involving the release of COX-2-derived mediators, PAF and mast cell-derived amines. **Supported by:** FAPESP

06.099

GUANILATE CYCLASE-CGMP-PKG SIGNALING PATHWAY MEDIATES NITRIC OXIDE-DEPENDENT IMPAIRMENT OF CHEMOTATIC RESPONSES IN LPS-STIMULATED HUMAN NEUTROPHILS

Aor, A. C.¹; Paula Neto, H.¹; Alves-Filho, J. C.²; Souto, F. O.²; Cunha, F. de Q.²; Barja Fidalgo, T. C.¹ - ¹UERJ - Farmacologia; ²FMRP - USP - Farmacologia

Introduction: Neutrophil (PMN) chemotaxis is important for host defense because allows PMNs to reach infectious focus where they ingest and kill invading microorganisms. PMNs migrate in response to chemotatic gradients of host-derived mediators and/or pathogen-derived products. These chemotatic mediators signal through G protein-coupled receptors (GPCRs) and this chemotatic signaling is tightly regulated by several mechanisms including receptor desensitization mediated by GPCR kinases (GRKs) and receptor internalization. We have recently shown that PMNs isolated from septic patients show an impaired responsiveness to chemotatic mediators that correlated with prognostic and subject survival. Impaired PMN chemotaxis was also correlated with increased GRK-2 and GRK-5 expression as well as increased expression of the inducible nitric oxide synthase (iNOS) and increased nitric oxide (NO) production. In the present study we sought to determine if nitric oxide signaling through the guanylate cyclase (GC)/ cyclic GMP (cGMP)/ protein kinase G (PKG) pathway is involved in the impairment of PMN chemotatic responsiveness and GRK expression. Methods: We stimulated human PMNs in vitro with LPS after treating cells with specific pharmacological inhibitors that target different components of the NO-GC-cGMP-PKG signaling pathway. PMN chemotaxis towards interleukin (IL)-8 and formyl-Met-Leu-Phe (fMLP) was evaluated in Boyden chamber and GRK-2 expression was evaluated by immunoblotting. Results: Our results show that LPS treatment leads to impaired PMN responsiveness to chemotatic stimuli and that this effect could be reverted by pharmacological inhibition of the NO-GC-cGMP-PKG pathway. Inhibition of iNOS-derived NO production could revert the increase in GRK-2 expression triggered by LPS treatment. Discussion: Together these data points to the NO-GC-cGMP-PKG pathway as an important signaling pathway in sepsis pathophysiology and raises the possibility of targeting this pathway in future therapeutic approaches. **Supported by:** CAPES, CNPq, FAPERJ and FAPESP

06.100

ROLE OF MACROPHAGE MIGRATION INHIBITORY FACTOR IN SILICA-INDUCED LUNG INFLAMMATION IN MICE.

Gallois, K. D.¹; Ferreira, T. P. T.¹; Arantes, A. C. S. de¹; Bozza, M.²; Cordeiro, R. S. B.¹; Hogaboam, C.³; Martins, M. A.¹; Silva, P. M. R. e¹ - ¹FIOCRUZ - IOC - Physiology and Pharmacodynamics; ²UFRJ - Immunology; ³University of Michigan Medical School, USA - Pathology

Introduction: Silicosis is a pulmonary disease caused by the inhalation of crystalline silica particles and characterized by an acute inflammatory process followed by chronic fibrosis, in a way dependent on a wide range of chemical mediators. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) has been postulated to function as a pro-inflammatory cytokine in several lung diseases. This study was undertaken in order to investigate the potential role of MIF in a model of silicosis in mice. **Methods:** Wild-type (WT) (Balb/c) and MIF knockout (KO) mice were injected intranasally with silica particles (10mg) and the analyses of inflammatory parameters made on day 7 (acute phase) and 28 (chronic phase). Total cell numbers and differential counts were performed in the bronchoalveolar lavage (BAL) and the lung morphology was evaluated by means of classical histological techniques. Quantification of cytokines and chemokines was made by ELISA. Airway responsiveness to inhaled methacholine was also analyzed by means of an invasive technique (Buxco system) with anaesthetized animals (Nembutal, 60mg/kg i.p.). **Results:** The kinetics of leukocyte infiltration in the BAL fluid revealed that there is a marked increase in the number of total leukocytes, at 7 days. Similar profile was noted in the case of mononuclear cells, while neutrophil numbers remained elevated for at least 28 days. Tissue analyses showed that there is a marked inflammatory cell infiltration at day 7, followed by peribronchiolar granuloma formation and an extensive tissue fibrosis at day 28. By means of Sircoll technique, we verified that WT silicotic mice exhibited an increase in collagen deposition in the lungs when compared to controls. A marked increase in the levels of MIP-2 and MIP-1a as well as of fibrogenic cytokines TNF- α e TGF- β was detected at both time-points. These phenomena directly correlated with an increase in airway hyperreactivity to methacholine as attested by an increase in lung resistance and reduction in compliance. The MIF KO mice showed a less intense neutrophil infiltration in BAL, lower levels of MIP-2 and MIP-1 α as well as suppression of airway hyperreactivity to methacholine. In contrast, at 28 day post-silica, an exacerbation of the granulomatous response and higher levels of TNF- α and TGF- β were detected in MIF KO mice as compared to the WT mice. **Discussion:** Our findings show that MIF KO mice exhibited suppression of the acute phase and exacerbation of the chronic phase of silicosis, clearly indicating that MIF seems to play a relevant modulatory role in this disease. **Supported by:** PAPES4/FIOCRUZ, CNPq, FAPERJ and UNESCO.

06.101

ESTUDO DO EFEITO DE LIDOCAÍNA E ANÁLOGOS NÃO ANESTÉSICOS SOBRE A ATIVAÇÃO DE MACRÓFAGOS *IN VITRO*.

Guimaraes, T.¹; Carvalho, V.¹; Costa, J. C. S.²; Cordeiro, R. S. B.¹; Calegari-Silva, T. C.³; Lopes, U. G.³; Martins, M. A.¹; Silva, P. M. R. e¹ - ¹FIOCRUZ - IOC - Fisiologia e Farmacodinâmica; ²FIOCRUZ - IOC - Far-Manguinhos; ³UFRJ - IBCCF

INTRODUÇÃO: A lidocaína é um anestésico local que apresenta propriedades antiinflamatórias em vários sistemas biológicos, incluindo supressão da ativação de macrófagos. Recentemente foram sintetizados por nosso grupo análogos estruturais da lidocaína que apresentaram maior potência anti-inflamatória associada a uma menor atividade anestésica. Neste trabalho tivemos por objetivo avaliar, comparativamente, o efeito da lidocaína e dos análogos estruturais JMF2-1, JMF23-1 e JM25-1 sobre a ativação de macrófagos *in vitro*. **MÉTODOS:** Células da linhagem macrófágica RAW 264,7 foram estimuladas com lipopolissacarídeo (LPS 1mg/mL) + INF-g (0,045 ng/mL) e o sobrenadante recolhido 6 h após. Foram feitas análises de viabilidade utilizando azul de tripan e da produção de óxido nítrico pelo método indireto de quantificação de metabólitos por Griess. Para análise do fator de transcrição NFkB, foi feita obtenção de extrato nuclear e avaliada a translocação para o núcleo através da técnica de EMSA. **RESULTADOS:** Verificamos que a incubação das células RAW 264,7 com lidocaína e os análogos JMF2-1, JMF23-1 e JM25-1 (10^{-8} - 10^{-5} M) não foi capaz de alterar a taxa de viabilidade das células nas concentrações testadas. Na condição de pré-tratamento das células RAW 264,7, 1 h antes da estimulação com LPS + INF-g, vimos que tanto a lidocaína como os análogos inibiram de forma dose-resposta a produção de óxido nítrico. De forma interessante, foi verificado que tanto lidocaína como os análogos foram capazes de inibir de forma importante a translocação do NFkB para o núcleo. **CONCLUSÃO:** Em conjunto, nossos resultados mostram que a lidocaína e os análogos não anestésicos JMF2-1, JMF23-1 e JM25-1 se mostraram eficazes em inibir a produção de óxido nítrico por macrófagos ativados, por um mecanismo que independe do bloqueio de canais de sódio. Além disso, indicam também que esta ação supressora está associada a um efeito ao nível transcripcional, uma vez que foi verificada inibição da translocação do NFkB por todos os compostos testados. **Apoio Financeiro:** PDTIS e PAPES4/FIOCRUZ, CNPq e FAPERJ.

06.102

INVESTIGATION OF THE LEUKOCYTE-ENDOTHELIUM INTERACTIONS IN AN EXPERIMENTAL MODEL OF HERPETIC(HSV-1) ENCEPHALITIS IN C57BL/6 AND TNF RECEPTOR1-DEFICIENT MICE

Vilela, M. C.¹; Mansur, D. S.²; Queiroz, N. L.³; Rodrigues, D. H.⁴; Arantes, R. M. E.¹; Kroon, E. G.²; Campos, M. A.⁵; Teixeira, M. M.²; Teixeira, A. L.⁶ - ¹UFMG - Patologia Geral; ²UFMG - Microbiologia; ³UFMG - Parasitologia; ⁴UFMG - Ciências Biológicas; ⁵Centro de Pesquisas René Rachou / FIOCRUZ - ImunoPatologia; ⁶UFMG - Medicina

Introduction: The Herpes Simplex Virus-1 (HSV-1) is a pathogen for humans and it may cause severe cases of encephalitis. We aimed at developing a severe model of HSV-1 encephalitis and assessing the role of TNF- α in this model. **Methods:** Wild type C57BL6 and TNFR1^{-/-} C57BL6 mice were intracerebrally inoculated with 10⁴ PFU of HSV-1 or PBS. Visualization of leukocyte recruitment using intravital microscopy was done at 1 and 3 days post-infection (dpi). The brain was removed for chemokine analysis by ELISA and histological studies. Virus titration in cerebral tissue was done by TCID. **Results:** Wild type C57BL/6 mice showed high mortality; 75% of these mice died until 3 days post infection. All infected animals developed clinical signs, such as weight loss, hunched posture and ataxia. C57BL/6 had high virus titers at 24h and 72h after intracerebral injection of HSV-1. Intravital microscopy revealed a significant increased leukocyte rolling and adhesion microvasculature in C57BL/6 infected mice at 1 and 3 dpi. The infection was also followed by a significant increase in chemokine levels, including MCP-1/CCL2, MIP1 α /CCL3, Rantes/CCL5, Kc/CXCL8 and MIG/CXCL9. Histological analysis demonstrated focal encephalitis characterized by cells infiltrates and activated glial cells in C57BL/6 infected mice. We studied these same parameters in TNFR1^{-/-} infected mice, but no difference was observed. **Discussion:** The present model of HSV-1 encephalitis is severe as all animals died in the very first days of infection. We confirmed increase of leukocytes along the endothelium wall and higher expression of chemokines in central nervous system. Receptor 1 for TNF- α may not play a relevant role in this model of severe encephalitis. **Supported by:** CAPES, CNPq and Fapemig.

06.103

MEASUREMENT OF PLATELET ADHESION AND AGGREGATION IN VITRO IN A RAT MODEL OF ASTHMA

Baldissera Junior, L.¹; Monteiro, P. F.¹; Antunes, E.¹ - ¹UNICAMP - Pharmacology

Introduction: Platelet activation has been reported to participate in inflammatory diseases, including allergic asthma (Pichford et al, 2006). Clinical evidences have also shown an intravascular activation of platelets accompanying the allergen-induced bronchoconstriction in asthmatic patients (Sullivan et al, 2000; Pitchford et al, 2003), but the role of platelets to allergic diseases has been poorly investigated. Therefore, we have examined the in vitro platelet adhesion and aggregation in ovalbumin-(OVA) sensitized and challenged rats. **Methods:** Male Wistar rats (180-230g) were actively sensitized with OVA (1 mg/mL, s.c.) dissolved in Al(OH)₃. The control group was injected only with Al(OH)₃. Fourteen days after OVA sensitization, animals were intranasally challenged with OVA (5 mg/mL). At 8 h post-OVA challenge, arterial blood was collected in presence of the anticoagulant acid citrate dextrose (ACD-C). Blood was centrifuged at 300 g, 20°C for 25 min. Platelet-rich plasma (PRP) was centrifuged at 800 g, 20°C for 13 min. Platelets were washed and resuspended (1.2×10^8 plat/mL) for using in the adhesion and aggregation. Adhesion assays were carried out in 96-well plates coated with fibrinogen, whereas aggregation was performed using an aggregometer. Platelets activated with either thrombin (10-100 mU/mL) or ADP (0.5-50 μ M) have been used. **Results:** Thrombocytopenia was observed at 1 to 12 h post-OVA challenge, returning to basal levels at 24 h. At 8 h post-OVA challenge, the platelet aggregation induced by ADP (50 μ M) did not change in comparison with platelets from the non-sensitized rats (59 ± 3.1 % and 55 ± 3.2 %, respectively) Similarly, no changes in the platelet adhesion were observed in the OVA-sensitized group compared with the non-sensitized rats (53.5 ± 8.9 % and 58.2 ± 9.1 %). **Discussion:** Our preliminary data suggest that platelets are not involved in the allergic cell recruitment in vivo, but further studies using platelets collected at different time-period after OVA-challenge are required in order to establish the exact contribution of platelets. **Supported by:** CAPES

CXCL5 AND CXCL1 MEDIATE ANTIGEN-INDUCED NEUTROPHIL MIGRATION BY STIMULATING MACROPHAGES- AND MAST CELLS-DERIVED TNF- α AND IL-1 β PRODUCTION

Vieira, S. M.¹; Lemos, H. P.¹; Grespan, R.¹; Napimoga, M. H.¹; Dal Secco, D.¹; Freitas, A.¹; Cunha, T. M.¹; Verri Jr., W. A.¹; Cunha, F. de Q.¹ - ¹FMRP - USP - Farmacologia

Introduction: Neutrophils are the primary leukocyte subset responsible for host defense against microorganism infections and their migration from the blood stream to the inflammatory foci is crucial for this process. Although they have a protective role in infections, tissue damage is a deleterious consequence of the intense neutrophil migration and is observed in inflammatory diseases such as glomerulonephritis and rheumatoid arthritis. The recruitment of neutrophils to the inflammatory site is a multifactorial event, which depends on several inflammatory mediators such as chemokines and cytokines that orchestrate neutrophil migration to inflammatory foci. Here we addressed the role of CXCL5 (LPS-induced CXC chemokine; LIX), CXCL1 (keratinocyte-derived chemokine; KC), TNF- α and IL-1 β in antigen (methylated bovine serum albumin; mBSA)-induced neutrophil migration to peritoneal cavity of immunized mice. **Methods:** Balb/c, C57Bl/6 and p55^{-/-} mice were immunized with mBSA/CFA. Neutrophil migration was assessed 4 h after challenges. CXCL1, CXCL5, TNF- α and IL-1 β levels were detected by ELISA. The CXCR2 mRNA assay was performed by RT-PCR. Purified mast cells and macrophages (M \emptyset s) were used for *in vitro* and immunofluorescence assays. **Results:** The i.p. challenge with mBSA in immunized mice but not in control (PBS-injected immunized mice) induced a dose- and time-dependent neutrophil migration statistically significant since the 4th h, which peaked at 6 h, declining 12 h later and returning to basal levels 24 h after the challenge. The mBSA challenge-induced neutrophil migration was inhibited by repertaxin (CXC receptor 2-CXCR2 antagonist) or anti-CXCL5, anti-CXCL1, anti-TNF- α antibody or IL-1ra (IL-1 receptor antagonist) treatments and in p55 deficient (-/-) mice. In agreement, the mBSA challenge increased the expression of CXCR2 mRNA as well as CXCL5, CXCL1, TNF- α and IL-1 β production in the peritoneal cavity. Moreover, intraperitoneal injection of CXCL5 or CXCL1 induced dose- and time-dependent neutrophil migration inhibited by repertaxin, IL-1ra or anti-TNF- α treatments. In addition, CXCL5 or CXCL1 injection induced an increase of TNF- α and IL-1 β levels in the peritoneal cavity. On the other hand, none of the treatments with anti-CXCL5, anti-CXCL1 antibodies or repertaxin inhibited TNF- α or IL-1 β -induced neutrophil migration; however TNF- α -induced neutrophil migration was inhibited by IL-1ra treatment. Furthermore, it was detected that M \emptyset and mast cells present CXCR2 receptors by immunofluorescence microscopy and that increased M \emptyset or decreased mast cell populations respectively enhance and diminish CXCL5-induced neutrophil migration. In fact, M \emptyset and mast cells produce TNF- α and IL-1 β upon CXCL5 *in vitro* stimulus. **Discussion:** The present results suggest a significant role for CXCL5 and CXCL1 in antigen-induced neutrophil migration by acting on CXCR1/2 receptors on resident M \emptyset and mast cells inducing the sequential production of TNF- α and IL-1 β , and finally neutrophil migration. Therefore, if this chemokine-induced release of TNF- α and IL-1 β is clinically relevant, targeting chemokines could be an alternative pharmacological approach to limit inflammatory diseases displaying abnormal neutrophil migration. **Supported by:** INPA, FAPEAM, FAPESP & FAEPA

06.105

RESOLVIN E1 INHIBITS OSTEOCLAST DIFFERENTIATION AND ACTIVITY IN VITRO

Herrera, B. S.¹; Muscara, M. N.¹; Van Dyke, T. E.²; Serhan, C. N.³; Gyurko, R.² - ¹USP - Farmacologia; ²Boston University - Periodontology and Oral Biology; ³Harvard Medical School - Anesthesiology

INTRODUCTION: Resolvin E1 (RvE1), a novel inflammation resolving mediator, decreases alveolar bone loss in a rabbit model of periodontal disease. However, the direct actions of RvE1 on osteoclasts (OC) are unknown. The aim of this study is to investigate the effect of RvE1 on OC differentiation, bone resorption and the pathway involved in this process. **METHODS:** OC differentiation was induced with M-CSF and RANKL in freshly isolated bone marrow cultures extracted from the femoral bone of C57BL/6 mice. Cultures were treated with various doses of RvE1 or the inactive intermediate 18-HEPE as control. OC were counted 6 days later following TRAP staining. Bone resorption was assessed in vitro on dentine discs. Protein was extracted for Western blotting (NFkB – nucleus and cytoplasm; and Akt – total, Ser 473 and Thr 308). **RESULTS:** Osteoclast differentiation is significantly inhibited by RvE1 but not by 18-HEPE at 1, 3 and 10 ng/mL doses ($P < 0.05$). Peak inhibition was observed at 3 ng/mL RvE1 ($90 \pm 14\%$ vs. $37.4 \pm 2.3\%$). No significant inhibition was observed at higher doses (30 and 100 ng/ml). A time-course experiment showed that OC differentiation is inhibited by day 4 and day 6 of culture ($P < 0.05$). In vitro bone resorption is also inhibited by RvE1 (175 ± 9 resorption pits) but not by 18-HEPE (407 ± 59 resorption pits; $P < 0.05$). When OC were classified according to the number of nuclei after 6 days of culture, we found that the number of mature OC (> 5 nuclei) was significantly lower in RvE1-treated cultures (36 ± 3.1 vs. 78.8 ± 3.6 cell numbers, $p < 0.001$). On the other hand RvE1-treated cultures had significantly more TRAP-positive cells having less than 5 nuclei (186.3 ± 29.2 vs. 135.9 ± 26.4 cell numbers, $p < 0.001$) showing RvE1's inhibition in cell fusion. Moreover, NFkB translocation to the cell nucleus, a key event in OC differentiation is inhibited by RvE1 ($22.3 \pm 3.2\%$) but not by 18-HEPE ($40 \pm 6.1\%$, $p < 0.05$). Akt phosphorylation was also monitored as its activation has been shown to be necessary for NFkB activation as well as for cell fusion and survival. RvE1 treatment significantly attenuated Akt phosphorylation in OC at amino acid residues Ser 473 and Thr 308, while it did not influence the total amount of Akt. **CONCLUSION:** In summary we have found that RvE1 inhibits OC formation in a dose-dependent manner by interfering with Akt and NFkB signaling. The molecular pathways linking RvE1 and Akt and NFkB activation remain the subject of further investigations. The important role played by RvE1 in OC differentiation and activity may support its potential therapeutical use for treatment of bone diseases, such as the bone loss secondary to periodontitis. **Supported by:** DE16191 (NIDCR), DE14568 (NIDCR) and CAPES (1154/05-2).

06.106

EFFECT OF FLUNISOLIDE ON SILICA-INDUCED NITRIC OXIDE GENERATION BY MACROPHAGES “IN VITRO”.

De Almeida, A. G.¹; Carvalho, V.¹; Cordeiro, R. S. B.¹; Wallace, J. L.¹; Martins, M. A.¹; Silva, P. M. R. e¹ - ¹FIOCRUZ - IOC - Fisiologia e Farmacodinâmica

Introduction: Silicosis is a restrictive pulmonary disease characterized by an acute inflammatory response followed by an intense fibrosis. Macrophages are considered crucial cells in this disease. In previous studies we showed that local treatment with flunisolide curatively inhibited experimental silicosis in mice. This study was carried out in order to investigate the potential effect of flunisolide on macrophages stimulated by silica particles *in vitro*. **Methods:** Macrophages were obtained from the peritoneal cavity of Swiss-Webster mice and stimulated with silica (3-100 µg/mL) for 6 and 24 h at 37°C, 5%CO₂. Nitric oxide release was measured indirectly by means of nitrite quantification (Griess technique). Incubation of macrophages with flunisolide (0.25 - 250 nM) was done 1 h before stimulation with silica. The glucocorticoid dexamethasone was also used for comparison. **Results:** We showed that macrophages were significantly activated by silica, as attested by an increase in the amount of nitric oxide release, with the maximal response noted at the dose of 10 µg/mL and at the 24 h time-point. Treatment of macrophages with flunisolide dose-dependently inhibited silica-induced cell activation, with highest concentrations interfering with basal levels of nitric oxide. Dexamethasone also suppressed macrophage stimulation, though being less potent than flunisolide. **Discussion:** Our findings show that silica directly activated macrophages *in vitro* and that flunisolide significantly inhibited this phenomenon. In addition, they also lead us to suggest that the suppressive effect of flunisolide on the silicotic response in mice seems to be associated with down-regulation of macrophage biological functions. **Supported by:** PAPES 4/FIOCRUZ, CNPq; FAPERJ, UNESCO.

06.107

ACUTE PHASE PROTEIN HEMOPEXIN MEDIATES NEUTROPHIL MIGRATION FAILURE IN EXPERIMENTAL SEVERE SEPSIS

Spiller, F.¹; Alves-Filho, J. C.¹; Souto, F. O.¹; Mestriner, F. L. A. C.¹; Laure, H. J.²; Freitas, A.¹; Mendonça, A. L.¹; Orrico, M. I. L.¹; Rosa, J. C.²; Ferreira, S. H.¹; Greene, L. J.²; Cunha, F. de Q.¹ - ¹FMRP - USP - Farmacologia; ²FMRP - USP - Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos

INTRODUCTION: The reduction of neutrophil migration to infection sites is associated with bad outcome in sepsis. Recently, we showed that alpha-1-acid glycoprotein could mediate the failure of neutrophil migration in human severe sepsis. **OBJECTIVE:** Identify proteic substances in serum of septic mice that inhibit neutrophil migration. **MATERIALS AND RESULTS:** One pool of sera, obtained two hours after induction of severe sepsis by cecum ligation and puncture (CLP) in mice, partially inhibited thioglycolate-induced neutrophil migration into the peritoneal cavity of naïve mice. This septic serum also inhibits the neutrophil migration in C57BL/6-TLR2+/+, C57BL/6-TLR2-/-, C3H/HePas-TLR4+/+ e C3H/HeJ-TLR4-/- mice, discarding the possible presence of bacterial products for the inhibitory effect of septic serum. Separation and identification by Blue-Sepharose, HPLC, native electrophoresis and mass spectrometry of serum septic proteins with inhibitory activity under neutrophil migration showed the acute phase protein hemopexin. The purified hemopexin, as well as the commercial sample of hemopexin, inhibited thioglycolate-induced neutrophil migration to peritoneal cavity of mice. Furthermore, incubation of isolated mice neutrophils with commercial hemopexin resulted in a marked inhibitory effect of chemotactic response to MIP-2. Pretreatment with specific antibody to hemopexin receptor, LRP/CD91, blocked the inhibitory effect of hemopexin on neutrophil chemotaxis. In accordance, commercial hemopexin also reduced neutrophil migration to the infection focus and significantly increased mortality in mice subjected to mild sepsis induced by CLP. **CONCLUSION:** These data demonstrate that hemopexin via LRP/CD91 inhibits neutrophil chemotaxis and is an important mediator of failure of neutrophil migration in mice severe sepsis. **Supported by:** FAPESP, CAPES, CNPq and FAEPA.

06.108

TUMOR DE WALKER 256 DIMINUE A ATIVIDADE EDEMATOGÊNICA MAS NÃO A MIGRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS INDUZIDA POR CARRAGENINA EM RATOS.

Barbosa, A. L. R.¹; Oliveira, G. J.¹; Araujo, C. P.¹; Vale, M. L.¹; Ribeiro, R. A.¹; Souza, M. H. L. P.¹ - ¹UFC - Fisiologia e Farmacologia

Introdução: Dados da literatura indicam que animais portadores de tumor experimental apresentam inibição de parâmetros inflamatórios. O presente trabalho objetiva avaliar o edema de pata e migração de neutrófilos induzidos por carragenina em ratos inoculados com Tumor de Walker. **Métodos:** A linhagem do tumor foi mantida nos ratos através de inoculações intramusculares sucessivas de 1 milhão de células na coxa direita a cada 7 dias. Os experimentos foram realizados após o 4º, 7º e 10º dias (4D, 7D e 10D) da inoculação do tumor de Walker ou de salina (controle). A atividade antiedematogênica foi avaliada em animais com tumor (4º, 7º e 10º dias) e animais sem tumor (controle) após a injeção do estímulo Carragenina (CG; 300µg/pata direita) injetado na região intraplantar. Essa atividade foi avaliada 1, 2, 3 e 4 hs (CG) e por plestimometria. A migração de neutrófilos foi induzida pela administração de carragenina (300µg) na pata contra lateral ao tumor ou na cavidade peritoneal. Após 4 horas da administração da carragenina na pata, os ratos foram sacrificados e as peles das patas foram retiradas para medir indiretamente a infiltração de neutrófilos, pela técnica da dosagem da atividade da mieloperoxidase (MPO). A migração de neutrófilos induzida por CG também foi avaliada mediante à contagem de células presentes na cavidade peritoneal de animais injetados com CG (300 µg /cavidade) realizando se contagem total e diferencial de células. **Resultados:** Os animais com tumor apresentaram uma inibição significativa da resposta edematogênica na pata contra-lateral ao tumor, após 7 dias, com a CG (0,4100 ml±0,0923), no pico de edema, quando comparados com o controle (0,8999 ml±0,0715). Em nenhum dos tempos estudados, foram observadas diferenças na atividade da MPO na pata induzida por CG, no grupo com tumor, quando comparado com o grupo controle (controle=17,3±1,9U/mg, N= 12, Tumor: 4º dia = 15,4±4,1U/mg, N=5; 7º dia= 20,1±2,1U/mg, N=5, 10º dia= 20,1±2,1U/mg, N=5). Em relação á migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal induzida por CG, também não observamos diferenças entre o grupo controle e o grupo com tumor, em todos os dias estudados. **Discussão:** No curso do desenvolvimento tumoral em ratos observa-se uma diminuição da resposta edematogênica induzida pela carragenina, sem diminuição da migração neutrófilica, indicando que provavelmente essa atividade antiedematogênica seja resultado de um fenômeno vascular e não celular. **Supported by:** Capes, CNPq

06.109

TUMOR DE WALKER 256 DIMINUI A PERMEABILIDADE VASCULAR CUTÂNEA E A DEGRANULAÇÃO MASTOCITÁRIA EM RATOS.

Barbosa, A. L. R.¹; Oliveira, G. J.¹; Araujo, C. P.¹; Ribeiro, R. A.¹; Souza, M. H. L. P.¹; Vale, M. L.¹ - ¹UFC - Fisiologia e Farmacologia

Introdução: Dados prévios do nosso laboratório demonstram que animais portadores de tumor de Walker têm uma diminuição do curso da resposta inflamatória. O presente trabalho tem como objetivo avaliar a permeabilidade vascular cutânea e a degranulação mastocitária em ratos inoculados com tumor de Walker 256 na coxa esquerda.

Métodos: O tumor foi mantido nos ratos através de inoculações intramusculares sucessivas de 10^6 células na coxa direita a cada 7 dias. Após 4^o, 7^o e 10^o dias (4D, 7D, 10D) da inoculação do tumor ou de salina (controle), a permeabilidade vascular na pele do dorso foi avaliada após a injeção de bradicinina (2µg/sítio), histamina (30µg/sítio), serotonina (1µg/sítio), substância P (250ng/sítio), capsaicina (50µg/sítio) ou 48/80 (1µg/sítio). A seguir azul de Evans (0,1mL/100g do animal), foi administrado na veia do plexo peniano. Após 30 minutos, os ratos foram sacrificados e a pele do dorso retirada, para avaliar o extravasamento do azul de Evans por espectrometria (µg de azul / mg de tecido). Em outro grupo de animais, após 4^o, 7^o e 10^o dias da inoculação do tumor ou de salina (controle), foram retiradas partes do mesentério dos ratos as quais foram colocadas em placas de Petri contendo Ringer-Locke com ou sem o composto 48/80 (0,8 µg/mL). Após 30 min, os tecidos foram colocados em lâminas e corados com azul de toluidina. Foram contadas 100 células com o auxílio de MO (aumento de 400x). Depois, foi calculada a média do percentual de mastócitos degranulados para cada grupo. **Resultados:** Após 4^o e 7^o dia da inoculação do tumor, os animais apresentaram uma significativa diminuição na permeabilidade vascular cutânea induzida por bradicinina (TUMOR4D=0,35±0,10, CONTROLE4D=0,91±0,14, TUMOR7D=0,29±0,01, CONTROLE7D=0,91±0,14), serotonina (TUMOR4D=0,25±0,020, CONTROLE4D=1,12±0,19, TUMOR7D=0,35±0,037, CONTROLE7D=1,12±0,19), e 48/80 (TUMOR4D= 0,13±0,034, CONTROLE4D= 1,95±0,14, TUMOR7D= 0,60±0,10, CONTROLE 7D= 1,95±0,14). O aumento da permeabilidade vascular induzida por histamina, substância P e capsaicina foram semelhantes nos portadores ou não do tumor, após 4^o e 7^o dia da sua inoculação. Após 10 dias da inoculação do tumor, observou-se uma diminuição da permeabilidade vascular induzida por todos os estímulos nos ratos portadores de tumor quando comparado com os ratos controles. Após 4^o e 7^o dias da inoculação do tumor, os animais apresentaram uma diminuição significativa da degranulação mastocitária com 37,33%±5,35, para o 4D e 32,20%±8,87, para o 7D de mastócitos degranulados em relação ao controle (87,13%±3,19). **Discussão:** No curso do desenvolvimento tumoral em ratos observa-se uma diminuição da permeabilidade vascular cutânea e da degranulação mastocitária, possivelmente devido a fatores do microambiente tumoral os quais podem estar diminuindo a resposta inflamatória sistêmica. Estudos futuros necessitam ser realizados para determinar o possível mecanismo. **Supported by:** Capes, CNPq

06.110

EFFECTS OF CHRONICLE BLOCKAGE OF NITRIC OXIDE SYNTHASES ON CYTOKINES SECRETION BY NEUTROPHILS MIGRATED TO INFLAMMATORY FOCUS

Hebeda, C. B.¹; Barboza, L.¹; Mello, S. B. V.²; Farsky, S.¹ - ¹USP - Análises Clínicas e Toxicológicas; ²FM - USP - Reumatologia

Introduction: We have demonstrated that oral administration of L-NAME (20mg/Kg/day; during 14 days) evokes reduction of 50% on circulating NO levels and on inflammation induced by *Bothrops jararaca* venom or LPS in male Wistar rats (Farsky et al., *Inflamm. Res.* v.53, p. 442; 2004). Reduced expressions of L-selectin on leukocytes and of PECAM-1 on endothelial cells are responsible, at least in part, for a lower number of leukocytes in the inflammatory focus (Hebeda et al., *Inflamm. Res.* v.54:S169; 2005). Now our objective was to elucidate the role of L-NAME treatment on secretion of pro or anti-inflammatory cytokines and iNOS expression by neutrophils migrated to the peritoneal cavity. **Methods:** Male Wistar rats were treated with L-NAME (20mg/Kg/day; 14 days) administered in drinking water and control rats received water by same route. Neutrophils were obtained from the peritoneal cavity 4 hours after injection of oyster glycogen (1%; 10mL) and cultured with or without LPS (5 μ g/mL; 18h). Neutrophils were employed to determine expression of iNOS mRNA by RT-PCR and supernatant was used to determine TNF- α , IL-1 β , IL-6 and IL-10 by ELISA and NO by Griess reaction. **Results:** Concentrations of TNF- α , IL-6, IL-10 and NO were not altered by L-NAME treatment. However, the concentrations of IL-1 β reduced on the supernatant, after LPS stimulation, of neutrophils obtained from L-NAME treated rats. Expression of iNOS was not altered. **Conclusions:** Data obtained suggest that: 1) reduction on IL-1 β secretion by neutrophils may contribute to anti-inflammatory effects evoked by chronicle blockage of NO synthesis; 2) migrated neutrophils are not responsible for the reduction of NO levels in the inflammatory exsudate; 3) chronicle blockage of NOS did not alter inducible NOS gene expression. **Supported by:** FAPESP (grants 05/60329-0) and CAPES.

06.111

PECAM-1 EXPRESSION AND ENDOTHELIAL CELL DETACHMENT AFTER DIRECT CONTACT WITH INTESTINAL ISCHEMIA/REPERFUSION LYMPH IN RATS.

Vitoretto, L. B.¹; Breithaupt-Faloppa, A. C.¹; Vanni Domingos, H.¹; Oliveira-Filho, R. M.¹; Vargaftig, B. B.¹; Tavares de Lima, W.¹ - ¹ICB - USP - Farmacologia

Introduction: Factors present in lymph seems to play a role as a modulator of the adult respiratory distress syndrome (ARDS) upon intestinal ischemia and reperfusion (I/R) during gut trauma (Cavriani et al, 2005). In this study, we tested the effects of lymph or circulating neutrophils collected of rats subjected to intestinal I/R on human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). **Methods:** Upon anesthesia, male rats (200-230 g) were subjected to occlusion of the superior mesenteric artery for 45-min using a micro vascular clip. Thereafter, the clip was removed and the intestinal reperfusion was established. The rats were killed 2 h later. Lymph was obtained by cannulation of the thoracic duct and neutrophils from bloodstream. Lymph (50% concentration) and neutrophils (5×10^4 cells/cm²) were maintained in contact with a HUVEC monolayer for 4 h. The HUVEC detachment was evaluated by comparing the optical density (620 nm) of the HUVEC layer after experiments with a confluent monolayer. The expression of endothelial PECAM-1 and von Willebrand factor (vWf) and the presence of extracellular fibronectin were also evaluated. **Results:** We observed that lymph was able to cause a detachment of 28% of the HUVEC layer and neutrophils induced a 15% cell loss. Both caused a significantly higher detachment when compared with respective control groups ($P < 0.05$). Expression of PECAM-1 was strongly reduced and the presence of cytoplasmatic granules of vWf was not identified. In parallel study we found that extracellular network of fibronectin was not affected by lymph or neutrophils. **Conclusions:** Our findings indicate that gut-derived factors carried in the lymph can potentiate endothelial dysfunction and that neutrophils activated by a gut trauma reduce the integrity of endothelial layer, without affecting the extracellular fibronectin. **Supported by:** FAPESP, CNPq.

06.112

INCREASED NITRIC OXIDE PRODUCTION AND LUNG VASCULAR PERMEABILITY IN A TWO-HIT MODEL OF ACUTE LUNG INJURY

Soares, A. L.¹; Oliveira-Filho, R. M.¹; Vargaftig, B. B.¹; Tavares de Lima, W.¹ - ¹ICB - USP - Farmacologia

Objectives: Intestinal I/R is implicated as a prime initiating event in the development of Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS) after trauma and hemorrhagic shock. We investigated the effects of LPS challenge to mice previously submitted to i-I/R, a two-hit model of acute lung injury. **Methods:** Male C57Bl/6 mice were subjected to 45 min of intestinal ischemia and challenged with 0.1 µg/kg of intranasal LPS at the 4th hour of reperfusion (two-hit). BALF and culture of lung explants were performed 20 h after LPS challenge. Mice subjected to i-I/R or LPS alone were used as controls.

Results: Two-hit mice showed marked increase in lung Evans blue dye leakage compared to i-I/R (375.5±53.9 vs 48.8±3.5, µg/mg). Lung MPO was increased (0.30±0.03 vs 0.15±0.03; OD 450nm) whereas the neutrophil recruitment to BALF was inhibited in the two-hit group compared to LPS group (11.5±2.6 vs 28.5±3.4; x 10³cells/mouse). The levels of NO_x in the two-hit group were significantly increased when compared to i-I/R controls in BALF (10.6±0.5 vs 6.5±0.8; µM) and in lung explants (3.1±0.3 vs 1.3±0.1; µM/mg of tissue).

Conclusions: Intestinal I/R predisposes the animal to an exacerbated response to a low dose LPS insult. The exacerbated production of nitric oxide observed in the two-hit group may cause endothelial damage, thereby explaining the major increase in vascular permeability in the two-hit group. The results are suggestive that patients exposed to systemic inflammatory response might develop ARDS when in contact with secondary inflammatory stimuli. Nitric oxide may play an important role in this process. **Apoio financeiro:** FAPESP n° 03/02271-0; CNPq

06.113

ATIVIDADE EDEMATOGÊNICA DO VENENO DA SERPENTE *Crotalus durissus collilineatus* CROTAMINA POSITIVO E CROTAMINA NEGATIVO

Aymore, S.¹; Barros, J. S.²; Peres, M. C.³; Magalhaes, M. R.³; Moreira, K. G.³ - ¹UCG - Centro de Estudo de Pesquisas Biológicas; ²UCG - Toxinologia; ³UCG - Centro de Estudos e Pesquisas Biológicas

Introdução: Os venenos das serpentes da sub-família Crotalinae apresentam grande diversidade de atividades biológicas específicas do gênero, espécie ou subespécie (Melgarejo, Anim. Peçonh. no Brasil: Biol. Clín e Terap. dos Acid, cap.8, 91, 2003). O veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus* apresenta ação miotóxica sistêmica atribuída às frações crotoxina e crotamina (Aird, Toxicol, v, 40, 335, 2002). **Métodos:** O presente estudo comparou a atividade edematogênica dos venenos de *Crotalus durissus collilineatus* crotamina positivo (CdcP) e crotamina negativo (CdcN). Para avaliação da atividade edematogênica foi observada a formação do edema em pata de camundongo através de injeção sub-cutânea (20µL) de veneno de *Crotalus durissus collilineatus* crotamina positivo e crotamina negativo em solução salina. Os venenos foram inoculados via sub-cutânea no coxim plantar da pata traseira direita do animal e o grupo controle, recebeu solução salina 0,9%. A espessura da pata foi mensurada, com auxílio do pletismômetro, antes da injeção e, após esta, em diferentes intervalos: 1, 2, 3, 24 horas (Al-Asmari, Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis, v,11, p.51, 2005).

Resultados: Ambos venenos apresentaram atividade edematogênica significativa em relação ao grupo controle. No entanto, o veneno CdcN apresentou a atividade edematogênica maior que a do veneno CdcP. Verificou-se também, que a atividade edematogênica dos venenos não é dose-dependente, e que apresentam o máximo de atividade com cerca de duas horas após a inoculação. Não foi identificado um aumento da permeabilidade vascular induzido pela Dose Mínima Edematogênica dos venenos CdcP e CdcN, o que não impede que doses maiores possam apresentar esse extravasamento vascular. **Discussão:** O veneno de CdcN e CdcP apresentam atividade edematogênica. Sendo o primeiro mais edematogênico que o segundo, sugerindo que a presença da crotamina pode estar relacionada com a formação de um edema discreto. MOREIRA (Dissertação de Mestrado, 2003), sugere uma ação antiinflamatória para o veneno CdcP, pois este inibiu o edema induzido por carragenina, o que não ocorreu com o veneno CdcN. Assim, o mecanismo de ação da atividade edematogênica dos venenos, CdcP e CdcN, ainda é desconhecido. **Palavras Chaves:** inflamação, edema, *Crotalus*, crotamina.

06.114

ACTIVATION OF MACROPHAGES BY THE ANNEXIN 1 - DERIVED PEPTIDE AC 2-26 "IN VITRO".

Reigada, C. L. L.¹; Carvalho, V.¹; Oliveira, M. dos S. S.¹; Martins, M. A.¹; Silva, P. M. R. e¹ - ¹FIOCRUZ - IOC - Fisiologia e Farmacodinâmica

Introduction: Annexin-1 is a protein regulated by corticosteroids and mediates some of the beneficial actions of glucocorticoids, such as inhibition of cellular proliferation, anti-inflammatory effects and the regulation of cell differentiation. The N-terminal peptide of annexin 1 as well as its binding to the G-protein-coupled 7 transmembrane receptors formyl-peptide receptors (FPRs) are critical for its anti-inflammatory effects. Thus, in this study we investigated the effect of the annexin 1-derived peptide Ac2-26 on the macrophages *in vitro*. **Methods:** The RAW 264.7 cell line was used and stimulation with the peptide Ac2-26 (50, 100 and 200 µg/mL) was performed at 6 and 24 h time points. The nitric oxide production was assessed by measuring the stable metabolite nitrite using the Griess reaction. Incubation of RAW 264.7 cells with the FPR receptor antagonist BOC-2 (5-25 µM) as well as with the nitric oxide synthase inhibitors aminoguanidine and L-NAME (2 mM) was done concomitantly with the Ac 2-26 peptide. **Results:** We showed that incubation of RAW 264.7 cells with Ac 2-26 peptide led to a significant cell activation as attested by a dose- and time-dependent increase in the nitric oxide production. Maximal response was detected at the concentration of 200 µg/mL and at 24 h after stimulation. Treatment of RAW 264.7 cells with the FPR receptor antagonist BOC-2 markedly inhibited the response induced by the peptide. The blockade of nitric oxide synthase by the inhibitors L-NAME and aminoguanidine also abrogated the Ac 2-26 peptide-induced nitric oxide release. **Discussion:** Our results show that the peptide Ac 2-26 has the ability to stimulate nitric oxide production by RAW 264.7 cells, in a mechanism clearly dependent on FPR receptor and nitric oxide synthase activation. Since nitric oxide may act as a down-regulatory mediator in some conditions, we can speculate that anti-inflammatory activity of the Ac2-26 peptide may be, at least partially, associated with its ability to induce nitric oxide production. **Supported by:** FIOCRUZ; CNPq; FAPERJ

06.115

***Lonchocarpus sericeus* LECTIN DECREASES LEUKOCYTE MIGRATION AND MECHANICAL HYPERNOCEPTION BY INHIBITING CYTOKINE AND CHEMOKINES PRODUCTION**

Clemente-Napimoga, J. T.¹; Cavada, B. S.²; Alencar, N. M. N. de³; Mota, M. R. L.³; Alves-Filho, J. C.⁴; Grespan, R.⁵; Freitas, A.⁴; Parada, C. A.⁶; Ferreira, S. H.⁴; Cunha, F. de Q.⁴; Napimoga, M. H.⁷ - ¹UNIUBE - Biologia Molecular; ²UFC - Bioquímica e Biologia Molecular; ³UFC - Fisiologia e Farmacologia; ⁴FMRP - USP - Farmacologia; ⁵UEM - Farmácia e Farmacologia; ⁶UNICAMP - Farmacologia; ⁷UNIUBE - Biologia Celular e Molecular

INTRODUCTION: In this study, we tested the potential useful of a lectin from *Lonchocarpus sericeus* seeds (LSL), to control neutrophil migration and inflammatory hypernociception (decrease of nociceptive threshold). **METHODS/RESULTS:** Pretreatment of the animals intravenously (15 min before) with LSL inhibited neutrophil migration to the peritoneal cavity in a dose dependent fashion confirmed by an inhibition of rolling and adhesion of leukocytes by intravital microscopy. We also tested the ability of the pretreatment with LSL to inhibit neutrophil migration on immunized mice, and it was observed a strong inhibition of neutrophil migration induced by ovalbumin in immunized mice. Another set of experiments showed that pretreatment of the animals with LSL, inhibited the mechanical hypernociception in mice induced by the i.pl. injection of OVA in immunized mice and of carrageenan in naïve mice, but not that induced by prostaglandin E₂ (PGE₂) or formalin. This anti-nociceptive effect correlated with an effective blockade of neutrophil influx, as assessed by the hind paw tissue myeloperoxidase levels. In addition, we measured cytokines (TNF- α and IL-1 β) and chemokines (MIP-1 α [CCL3] and KC [CXCL1]) from the peritoneal exudates and i.pl. tissue. Animals treated with LSL showed inhibition of cytokines and chemokines release in a dose dependent manner. **DISCUSSION:** We demonstrated that the inhibitory effects of LSL on neutrophil migration and mechanical inflammatory hypernociception are associated with the inhibition of the production of cytokines and chemokines. **Supported by:** FAPESP #05 - 60295-8

06.116

MIGRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS PARA OS PULMÕES DURANTE A SEPSE EM RATOS: CINÉTICA DE MIGRAÇÃO E INIBIÇÃO PELA GLIBENCLAMIDA.

Rattmann, Y. D.¹; Silva, E. M.¹; Marques, M. C. A.¹; da Silva-Santos, J. E.²; Santos, A. R. S.³ - ¹UFPR - Farmacologia; ²UNIVILLE - Farmácia; ³UFSC - Ciências Fisiológicas

Introdução: Pacientes com sepse comumente desenvolvem lesão pulmonar aguda na qual os neutrófilos parecem estar envolvidos. No entanto, o tráfego dos neutrófilos para os pulmões ainda não é bem compreendido. Várias pesquisas demonstraram que variações na condutância iônica na membrana plasmática parecem interferir na migração dos neutrófilos. Neste estudo foi investigada a migração de neutrófilos para os pulmões em ratos submetidos à sepse através da cirurgia de ligação e perfuração do ceco (CLP) frente a alguns tratamentos. **Métodos:** Foram utilizados ratos Wistar machos (250 – 280 g, N=6-14/grupo). Inicialmente foi obtida uma curva de letalidade nos animais submetidos à CLP com 0 (falso-operados), 6, 12, 20 e 40 perfurações no ceco por um período de 8 dias. Em seguida, outros grupos de animais foram submetidos à CLP 12 perfurações e nos tempos de 3, 6, 12, 18 e 48 horas após a indução da sepse o lavado broncoalveolar (LB) e o lavado torácico (LT) foram coletados para contagem total e diferencial das células. Os pulmões e o coração dos mesmos animais foram coletados para avaliar a infiltração tecidual dos neutrófilos através do ensaio da mieloperoxidase (MPO). Além disso, a migração dos neutrófilos foi investigada no LT de ratos tratados com a aminoguanidina (inibidor seletivo da iNOS; 30 mg/Kg, s.c.), glibenclamida (bloqueador de canais de K⁺_{ATP}; 40 ou 80 µmol/Kg, s.c.) ou salina (1ml/Kg, s.c.), administradas antes e após a indução da sepse. **Resultados e Discussão:** Na curva de letalidade, a taxa de mortalidade dos animais foi proporcional ao número de perfurações. Ao 4º dia de observação a porcentagem de sobrevivência nos grupos CLP 40, 20, 12 e 6 perfurações no ceco correspondeu respectivamente a 0%; 9,1%; 33,3% e 40% dos animais. Até o 8º dia de observação, sobreviveram 8,3% dos animais CLP 12 e 20% do CLP 6 perfurações. Devido à capacidade intermediária de induzir a letalidade, os animais CLP 12 perfurações foram selecionados para os experimentos posteriores. Houve modificação da migração de neutrófilos avaliada no LT nos tempos 3, 6, 12, 24 e 48 horas, mas não no LB. Nestes animais observou-se o aumento gradativo da migração de neutrófilos em relação ao tempo e o ápice desta migração ocorreu nos tempos de 6 h após a indução da sepse (falso-operado de $0,16 \times 10^{-6}$ para $7,7 \times 10^{-6}$ células no grupo CLP) e 12 h (houve aumento de $0,0 \times 10^{-6}$ no grupo falso-operado para $7,9 \times 10^{-6}$ células no grupo CLP). Nos períodos seguintes, 18 a 48 h, a migração decresceu. As dosagens da MPO confirmaram estes resultados. A aminoguanidina não interferiu de forma significativa na migração dos neutrófilos no LT, contudo, a glibenclamida foi capaz de reduzir esta migração de forma significativa em ambas as concentrações administradas (reduziu de $7,1 \pm 1,2$ no grupo controle para $3,2 \pm 0,9$ e $2,7 \pm 0,4$ para glibenclamida 40 e 80 µmol/Kg, respectivamente). Esses resultados demonstram uma cinética de migração dos neutrófilos para os pulmões durante a sepse em ratos, bem como a inibição ocasionada pelo bloqueador de canais de K⁺_{ATP}. Novos experimentos estão em curso e visam investigar as conseqüências da inibição da migração dos neutrófilos para os pulmões ocasionada pela glibenclamida e quais os possíveis mecanismos envolvidos neste evento. **Apoio financeiro:** CAPES, CNPq, FAPESC.

06.117

MODELO EXPERIMENTAL DE MUCOSITE ORAL INDUZIDA POR RADIOTERAPIA DE MEGAVOLTAGEM EM HAMSTERS

Bezerra, N. P.¹; Capaz, R. A. C.¹; Alexandre, A. A. T. V. A.¹; Gomes, A. S.¹; Almeida, P. R. C.²; Lima, V.¹; Moura, J. F. B.¹; Ribeiro, R. A.¹ - ¹UFC - Fisiologia e Farmacologia; ²UFC - Patologia

Introdução: A radioterapia é um recurso bem definido para o tratamento de cânceres iniciais ou avançados. O modelo de MO descrito na literatura utiliza radiação por ortovoltagem, forma antiga de radioterapia (RXT), hoje usada em tumores superficiais. A RXT de megavoltagem é uma forma utilizada atualmente na grande maioria dos tratamentos e, classicamente, é responsável pela indução de mucosite oral. A estomatite ou mucosite oral (MO) é uma resposta inflamatória da mucosa à ação de radioterapia ou fármacos antineoplásicos e constitui-se num efeito colateral debilitante, potencialmente sério e dose-limitante, com impacto na sobrevida e qualidade de vida de pacientes oncológicos. O objetivo deste trabalho foi desenvolver um modelo inédito de MO induzida por radioterapia (RXT) com aparelho de megavoltagem-Cobalto-60 (MV-Co⁶⁰). **Métodos:** Foram utilizados hâmssters Golden Siriam machos, provenientes do Biotério Setorial do Depto. Fisiologia e Farmacologia-UFC. Os animais foram submetidos à RXT da mucosa jugal utilizando dose única de 3500 cGy em aparelho de MV-Co⁶⁰ com campo direto e bolus sobre a mucosa. No 4ºd pós-RXT foram feitas irritações mecânicas (IM) na mucosa jugal como fator potencializador da MO. Grupos de animais foram mortos nos dias 7, 10, 13 e 16 a partir da RXT e avaliados os seguintes parâmetros da MO: análise macroscópica (hiperemia, áreas hemorrágicas, úlceras e abscessos), histologia (infiltrado celular, dilatação e ingurgitamento vascular, hemorragia, edema, úlceras e abscessos), dosagem da mieloperoxidase (MPO) e detecção de TNF-a por imunohistoquímica. Ainda, foram analisados leucograma e variação de massa corpórea dos animais. Os dados foram expressos como mediana e valores extremos ou média±epm. **Resultados e Discussão:** Verificou-se que a indução da MO causou lesões significantes a partir do 7ºd (Md=0;0-3), atingindo pico entre o 13ºd (Md=3;1-3) e 16ºd (Md=3;3-3), quando comparados a animais normais (Md=0;0-0), apenas 13d de RXT (Md=0;0-2) ou IM (0;0-0, 10d). Esses achados foram corroborados pela histologia, onde as lesões tornam-se significantes a partir do 7ºd (Md=1;0-3) e evoluem do 10º e 13ºd (Md=2;1-3) até o 16ºd (Md=3;1-3), quando comparados aos animais normais (Md=0;0-0), apenas 13d de RXT (Md=0;0-3) ou IM (Md=1;0-1, 10d). Para determinar o dia de pico de lesões associado à baixa mortalidade dos animais, verificou-se que no 13d ocorre aumento (p<0,05) da atividade de MPO (13ºd: 2,7±0,4; normal: 0,4±0,1, apenas RXT: 0,5±0,2 ou IM: 0,7±0,1) e aumento importante de marcação de TNF-a, sem alteração do hemograma e, apesar da MO causar perda significativa de peso a partir do 5ºd, este se manteve estável até o 13ºd, com queda significativa da sobrevida dos animais até o 16ºd. Em resumo, o modelo original de MO induzido por radioterapia de MV-Co⁶⁰ em hamster mostrou características muito semelhantes a MO humana, quanto aos achados e curso temporal, prestando-se, portanto, para o estudo de novos agentes capazes de combatê-la. **Apoio Financeiro:** CNPq

06.118

LIVE *E. coli* INJECTED INTRAPERITONEALLY CAUSES FEVER AND INCREASE PGE₂ IN THE CEREBROSPINAL FLUID. EITHER STNFRI OR IL-1RA DOES NOT ALTER THIS FEVER

Soares, D. de M.¹; Figueiredo, M. J.¹; Machado, R. R.²; Martins, J. M.¹; Vercesi, J. A.²; Souza, G. E. P.² - ¹FMRP - USP - Farmacologia; ²FCFRP - USP - Física e Química

Introduction: The involvement of PGE₂, IL-1 and TNF- α in the fever induced by lipopolysaccharide (LPS) from *E. coli*, a Gram-negative bacteria is well established. The present study investigated if the increase on body temperatures (bT) induced by i.p. injection of live *E. coli* is a thermoregulatory response and the participation of IL-1, TNF- α and PGE₂ in this response. **Methods:** *E. coli* (10⁸, i.p., 0,5 ml), TNF- α or IL-1b (250 ng and 3,12 ng, i.c.v., 3ml, respectively) were injected in male Wistar rats (200g). IL-1 receptor antagonist (IL-1ra; 200 mg, 3ml, i.c.v.) or soluble TNF receptor I (sTNFRI; 500 ng, 3ml, i.c.v., a TNF- α scavenger) were given 15 min before IL-1b or TNF- α , respectively. In *E. coli* stimulated animals these cytokine inhibitors were given 15 min before or 2h later. Body temperature (bT, °C) was measured by biotelemetry, every 30 min, during 48h. CSF from rats was collected 0,5, 4, 12, 24 and 48 h after *E. coli* (10⁸ or 5x10⁸ CFU) and PGE₂ concentration was measured by ELISA. The skin tail temperature (skT, °C) was measured by telethermometry during 6h. **Results:** Saline (SAL) + IL-1ra did not alter bT of the animals (37.2±0.1; 4h). I.p. injection of *E. coli* and i.c.v. injections of either IL-1b or TNF- α increased bT (°C, 3h: 38.25±0.1; 38.5±0.2, and 38.5±0.22, respectively) of rats. IL-1ra abolished the increase on bT to IL-1b (37.4±0,1 °C, 3h) and srTNF blocked fever to TNF- α (°C, 3h: 37.66±0.25). However neither IL-1ra nor srTNF alter fever to *E. coli* (°C, 3h: 38.5±0,2; 38.3±0.17, respectively). The increase in bT induced by *E. coli* was accompanied by a reduction on skT (32.4±0.1 °C, 3h). SAL did not alter skT of rats (33.4±0.1 °C, 3h). The level of PGE₂ was increased by either the lethal dose (4h: from non detectable levels (ND) to 1335±609 pg/ml) or the non-lethal dose (from ND to 0.5h: 192.39±0.9; 3h: 330.3±88; 12h: 62.2±12; 24h: 105±13.3; 48h: 152.4±17.2 pg/ml). **Conclusion:** These data show that i.p. replicating *E. coli* promotes an integrated thermoregulatory response which, at least in doses of cytokines inhibitors used here, seems do not depend on IL-1 and TNF differing from LPS-induced fever. Moreover, either lethal or non-lethal doses of *E. coli* increased PGE₂ concentration in the CSF which remains up to 48h. **Supported by:** CAPES

06.119

OXIDATIVE STRESS MARKERS IN DIAPHRAGM MUSCLE FROM RATS SUBMITTED TO INTESTINAL ISCHEMIA AND REPERFUSION

Bolonheis, S. M.¹; Varriano, A. A.¹; Teixeira, S. A.¹; Dias, A. A.¹; Coelho, C. F.¹; Gouvea, I. M.¹; Costa, S. K. P.¹; Muscara, M. N.¹ - ¹USP - Farmacologia

Objectives: Under septic conditions, as well as after intestinal ischemia-reperfusion (IRI), the occurrence of respiratory failure (RF) is a common finding. Contractile dysfunction, secondary to increased production of oxygen and/or nitrogen reactive species has been implicated in RF physiopathology. Therefore, we analyzed some oxidative stress markers in diaphragm muscle samples obtained from rats submitted to IRI, including protein expression of nitric oxide synthases (NOS) and superoxide dismutase (SOD) isoforms, NOS activity, in addition to neutrophil infiltration (measured as myeloperoxidase activity - MPO). **Methods:** Male Wistar rats (~250 g) under ketamine and xylazine anesthesia (80 and 16 mg.kg⁻¹, respectively) were subjected to a 45 min period occlusion of the superior mesenteric artery followed by either 2 or 6 hours of reperfusion, after which time they were sacrificed by decapitation; sham animals were used as controls. Diaphragm muscle samples were collected and stored at -80°C for posterior biochemical analysis. **Results:** When compared to Sham group, diaphragm from animals collected after 2 hours of reperfusion showed increased activities of both MPO (115%) and calcium-dependent NOS (163%). However, reductions in nNOS, eNOS and SOD-1 protein expression (78; 55 and 21%, respectively) were detected. On the other hand, after 6 hours of reperfusion, diaphragms from IRI animals showed increased calcium-independent NOS activity (815%). Nevertheless, no differences were found in protein expression (constitutive NOS and SOD isoforms) or MPO activity when compared to the Sham group. **Conclusions:** Based on these results, we suggest that reperfusion after intestinal ischemia induces modifications in diaphragm proteins which seem to strongly depend on the duration of the reperfusion period. **Supported by:** CNPq, CAPES, FAPESP

06.120

O ESTRESSE OXIDATIVO E MECANISMOS DE DEFESA NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL DE RATOS SUBMETIDOS À ISQUEMIA E REPERFUSÃO INTESTINAL

Varriano, A. A.¹; Bolonheis, S. M.¹; Teixeira, S. A.¹; Dias, A. A.¹; Coelho, C. F.¹; Gouvea, I. M.¹; Lepsch, B. L.¹; Scavone, C.¹; Costa, S. K. P.¹; Muscara, M. N.¹ - ¹ICB - USP - Farmacologia

Introdução: O estresse oxidativo resultante das situações de isquemia intestinal sustentada seguida da reperfusão, está associado frequentemente ao comprometimento de vários órgãos internos; entretanto, o prejuízo cerebral não tem sido comumente relatado. Neste trabalho nós investigamos os efeitos da isquemia e reperfusão intestinal (IRI) sobre a expressão gênica das isoformas de óxido-nítrico sintases (NOS) e de ciclooxigenases (COX), expressão de proteína inibitória da NOS neuronal (PIN), atividade de NOS, infiltração de neutrófilos (através da atividade de MPO), ativação do fator de transcrição nuclear kB (NF-kB), peroxidação lipídica (através do conteúdo de espécies reativas do ácido tiobarbitúrico, TBARs), presença de proteínas contendo resíduos de nitrotirosina (3-NT), e expressão protéica de nNOS, eNOS e superóxido-dismutases (SOD-1 e SOD-2) em algumas estruturas cerebrais, após duas horas de reperfusão. **Métodos:** A IRI foi realizada em ratos Wistar (machos, ~250 g) anestesiados com cetamina /xilazina, através da interrupção total do fluxo sanguíneo da artéria mesentérica superior durante 45 min seguido de 2 h de reperfusão. A seguir, os animais foram decapitados e amostras de córtex, hipotálamo, hipocampo e cerebelo foram coletadas para as análises bioquímicas mencionadas acima. **Resultados:** Em relação ao grupo Sham, os animais submetidos à IRI mostraram aumento na expressão gênica de nNOS no córtex frontal, acompanhada de significativa diminuição da atividade de NOS dependente de Ca^{2+} ($66\pm 7\%$; $P < 0,05$), que também apresentou-se menor no hipotálamo ($64\pm 9\%$; $P < 0,05$) e hipocampo ($51\pm 7\%$; $P < 0,05$), mas não no cerebelo. O aumento da expressão gênica de eNOS no hipocampo foi acompanhado do aumento da expressão protéica. Aumento de RNAm para COX-2 foi observado no hipotálamo. Animais IRI apresentaram diminuição na expressão protéica de SOD-1, mas não de SOD-2, no hipotálamo ($17\pm 2\%$; $P < 0,01$) e hipocampo ($16\pm 6\%$; $P < 0,05$) e diminuição do TBARs, em córtex e hipotálamo. Atividade de MPO, ativação do NF-kB e expressão de 3-NT e PIN não foram diferentes entre os grupos, nas estruturas encefálicas analisadas. **Discussão:** Com base nos resultados sugerimos que, pelo menos durante as primeiras 2 h de reperfusão, o SNC reage diferentemente aos efeitos da IRI. Aparentemente existem eficientes mecanismos centrais de defesa frente a esta situação, podendo a atividade diminuída de NOS neuronal ser um deles. No entanto, cabe futura investigação se estas mudanças no estado redox refletem um retorno à homeostase ou prejuízo neuronal após períodos de reperfusão mais prolongados. **Apoio financeiro:** CNPq, CAPES, FAPESP

06.121

EFEITO DE UMA FOSFOLIPASE A₂ SECRETADA, DO GRUPO IIA (MT-III), ISOLADA DO VENENO DA SERPENTE *Bothrops asper*, NA FORMAÇÃO DE CORPÚSCULOS LIPÍDICOS EM MACRÓFAGOS.

Leiguez Jr, E.¹; Zuliani, J. P.²; Lima, S. A.¹; Cianciarullo, A. M.³; Gutiérrez, J. M.⁴; Teixeira, C. F. P.¹ - ¹Instituto Butantan - Farmacologia; ²Instituto Butantan - Farmacologia - Instituto de Pesquisas em Patologias Tropicais de Rondônia; ³Instituto Butantan - Genética; ⁴Universidade da Costa Rica - Instituto Clodomiro Picado

Introdução: As fosfolipases A₂ secretadas são enzimas importantes em diversas doenças inflamatórias. Pesquisas recentes evidenciaram que uma fosfolipase A₂, denominada miotoxina III (MT-III), isolada do veneno da serpente *Bothrops asper*, induz eventos inflamatórios relevantes e estimula diversas funções de macrófagos isolados. Nestas células, a formação de corpúsculos lipídicos (CLs) está aumentada em condições patológicas. Isto posto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da MT-III na formação de CLs em macrófagos murinos isolados. **Métodos:** Os macrófagos foram obtidos da cavidade peritoneal de camundongos Swiss machos, após 96 horas da injeção de tioglicolato 3 %. A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio da redução do brometo de 3,4,5-dimetiltiazol-2il 2,5-difenil tetrazólio bromídeo (MTT). A formação dos CLs foi mensurada por marcação com tetróxido de ósmio a 1% e contagem por microscopia de contraste de fase. Os macrófagos (2x10⁵ células) foram incubados com MT-III (3,15; 6,3 e 12,6 µg/mL) ou RPMI apenas (controle) por 1h. **Resultados:** Após a incubação dos macrófagos com a MT-III, por 1 hora, nas concentrações 3,15; 6,3 e 12,6 µg/mL, detectou-se 90%, 82% e 77% de células viáveis, respectivamente. Adicionalmente os macrófagos incubados com a MT-III tiveram um aumento de 78%, 115% e 134% do número de CLs em relação ao controle nas concentrações 3,15; 6,3 e 12,6 µg/mL, respectivamente. **Discussão:** Esses dados demonstram a capacidade de uma fosfolipase A₂ secretada, do grupo IIA, induzir o aumento dos CLs em macrófagos elicitados, de modo dependente da concentração. **Apoio financeiro:** FAPESP e CNPq

06.122

O ÓXIDO NÍTRICO E O FATOR DE NECROSE TUMORAL-A MODULAM A REAÇÃO EDEMATOGÊNICA INDUZIDA PELO VENENO DA SERPENTE *Bothrops moojeni* EM CAMUNDONGOS

Nascimento, N. G.¹; Olivo, R. A.¹; Souto, P.¹; Teixeira, C. F. P.¹ - ¹Instituto Butantan - Farmacologia

Introdução: O veneno da serpente *Bothrops moojeni* (VBm) induz uma reação local intensa, com edema grave, em humanos e em animais de experimentação. Dentre os mediadores que modulam a inflamação estão o óxido nítrico (NO) e o fator de necrose tumoral-a (TNF-a), porém não se conhece a participação desses mediadores no efeito edematogênico causado pelo VBm. O objetivo deste trabalho foi avaliar a participação do óxido nítrico e do TNF-a na formação do edema desencadeado pelo VBm, em camundongos. **Metodologia:** Foram utilizados camundongos Swiss machos (18 a 20 g.). O edema foi medido por pletismografia (15 min, 30 min, 1 h, 3 h, 6 h e 24 h) após a injeção intraplantar de VBm (1 mg/pata) e salina (50 mL/pata) contralateral. Grupos de animais foram tratados com os inibidores da NO sintase L-NAME (15 mg/Kg, i.v) ou aminoguanidina (50 mg/Kg e 100 mg/Kg, i.v.), 24 h e 30 min, respectivamente, antes do VBm, ou com clorpromazina (1,25 mg/Kg, i.p.), inibidor do TNF-a, 30 min antes do VBm, ou com salina, por vias e tempos de latência correspondentes aos diferentes tratamentos (controle). **Resultados:** A injeção intraplantar de VBm causou aumento do volume das patas entre 15 min e 6 h, atingindo níveis basais na 24^a h ($48,8 \pm 1,6$; $78,0 \pm 1,8$; $70,9 \pm 2,0$; $41,0 \pm 1,8$; $22,1 \pm 1,0$ e $5,7 \pm 1,0$ %, nos períodos de 15 e 30 min; 1, 3, 6 e 24 h, respectivamente; n = 8). O pré-tratamento dos animais com L-NAME causou um aumento do volume das patas, entre a 3^a e a 6^a h (43 e 157 %, respectivamente; n = 6) além de aumento do volume podal na 24^a h após a injeção do VBm (71,2 %; n = 6), significativos em relação aos respectivos controles ($p < 0,001$). Do mesmo modo, o tratamento com aminoguanidina acarretou aumento do efeito edematogênico do VBm, porém a partir da 6 h (91 e 147,4 % na 6^a e 24^a h, respectivamente; $p < 0,03$ vs controle; n = 5). Por outro lado, a clorpromazina acarretou uma diminuição marcante da resposta edematogênica ao VBm, significativa entre 15 min e 6 h após a injeção do VBm, em relação aos controles (32,0; 58,9; 76,6; 83,2 e 81,4 %, nos períodos de 15 e 30 min, 1, 3 e 6 h, respectivamente, $p < 0,001$). **Discussão:** Os dados sugerem que o óxido nítrico modula positivamente o edema de pata desencadeado pelo VBm, em camundongos e que o TNF-a deve contribuir para este efeito.

Apoio financeiro: FAPESP, CAPES e SSPSP.

06.123

ENVOLVIMENTO DO TNF- α , IL-1 β E KC NA PATOGÊNESE DA MUCOSITE INTESTINAL (MI) INDUZIDA PELO CLORIDRATO DE IRINOTECANO (CPT-11) – PAPEL PROTETOR DA PENTOXIFILINA

Ribeiro, R. A.¹; Melo, M. L. P.¹; Brito, G. A. C.²; Silva, L. R.¹; Soares, P. M. G.¹; Vale, M. L.¹; Souza, M. H. L. P.¹; Cunha, F. de Q.³ - ¹UFC - Fisiologia e Farmacologia; ²UFC - Morfologia; ³FMRP - USP - Farmacologia

INTRODUÇÃO: O cloridrato de irinotecano (CPT-11) é um inibidor da topoisomerase I, utilizado no tratamento do câncer colorretal, ovário, estômago e pulmão de pequenas células. Apesar da MI acompanhada de severa diarreia ser o efeito colateral mais limitante do seu uso terapêutico, os exatos mecanismos que levam a este efeito não são claramente estabelecidos. **OBJETIVO:** O presente trabalho teve como objetivo avaliar o papel de citocinas (TNF- α , IL-1 β e KC) e óxido nítrico na fisiopatologia dos eventos inflamatórios que acompanham a mucosite intestinal provocada pelo CPT-11.

METODOLOGIA: A MI foi induzida em camundongos Swiss, machos pela administração intraperitoneal de CPT-11 (75mg/Kg) por quatro dias consecutivos. Os animais receberam PTX (1,7, 5 e 15 mg/kg, s.c.) ou solução salina 0,9% (0,5 mL, s.c. ou gavagem) por 7 dias consecutivos, iniciando um dia antes do tratamento com CPT-11. A incidência de diarreia foi monitorada por escores; a variação de peso foi avaliada diariamente e o leucograma foi realizado imediatamente antes do sacrifício. Os animais foram sacrificados no sétimo dia para análise histológica, dosagem de mieloperoxidase (MPO), determinação de citocinas no intestino (TNF- α , IL-1 β e KC) por ELISA e imunohistoquímica para TNF- α , IL-1 β e iNOS. **RESULTADOS:** CPT-11 provocou diarreia significativa (escore 3, 0-3) acompanhada de perda acentuada de massa corpórea ($P<0,05$) e redução do total de leucócitos em 80% ($P<0,05$). As alterações histopatológicas intestinais induzidas pelo CPT-11 caracterizaram-se pela presença de infiltrado inflamatório nas células da lâmina própria, perda da arquitetura das criptas e achatamento dos vilos (escore 4, 3-4; $P<0,05$). CPT-11 também aumentou significativamente ($P<0,05$) os níveis intestinais de MPO, TNF- α , IL-1 β e KC, e induziu aumento significativo na marcação de TNF- α (escore 4, 4-4), IL-1 β (escore 4, 3-4) e iNOS (escore 4, 3-4) na mucosa duodenal. A PTX nas doses de 1,7 e 5 mg/kg reduziu significativamente a gravidade da diarreia induzida por CPT-11 (escore 0, 0-3; $P<0,05$) e reduziu a destruição histopatológica (escore 1, 0-4; $P<0,05$) e bloqueou o aumento dos níveis intestinais de MPO ($P<0,05$). PTX (1,7 mg/kg) inibiu significativamente ($P<0,05$) os níveis intestinais de TNF- α em 39,1%, IL-1 β em 79% e KC em 59%, e reduziu a marcação de TNF- α (escore 2, 2-3; $P<0,05$), IL-1 β (escore 2, 2-3; $P<0,05$) e iNOS (1,5, 1-2; $P<0,05$) na mucosa duodenal. Entretanto, nenhuma dose de PTX reverteu à perda de massa corpórea e a leucopenia induzida pelo CPT-11 ($P>0,05$). **CONCLUSÃO:** Estes resultados sugerem o envolvimento de TNF- α , IL-1 β , KC e NO, via iNOS na patogênese da mucosite intestinal induzida pelo CPT-11. O papel protetor de PTX também foi evidenciado. **Apoio financeiro:** CNPq

06.124

THE EFFECT OF LOW LEVEL LASER THERAPY (INFRA-RED 830 NM) ON COLLAGENASE-INDUCED RAT TENDINITIS

Labat, R.¹; Ramos, L.¹; Penna, S. C.¹; Pallotta, R. C.¹; Teixeira, S. A.¹; Muscara, M. N.¹; Lopes-Martins, R. A. B.¹ - ¹ICB - USP - Farmacologia

Introduction. Low Level Laser Therapy (LLLT) has been used clinically since 1981 on the treatment from patients with inflammatory pathologies. Hypotheses on reduced duration of the acute inflammatory phase and tissue repairing stimulation were soon formed to explain the pain relief induction. The aim of the present study is to investigate effects and LLLT action mechanisms on the experimental model of collagenase-induced rat tendonitis. **Methods.** Male Wistar rats weighing about 250 g were housed in two animals per cage. Food and water were provided “*ad libitum*” throughout the experimental protocol. In 40 animals, peritendinous tissue of Achilles tendons was injected with 100 µl of crude collagenase. Rats were sacrificed 4, 6, 12 and 24 and 48h post-collagenase injection by CO₂ inhalation. The Achilles tendons were cleaned up surrounding tissues and analysed. **Results.** Collagenase induced in a significant tendon oedema between 24 and 48 hours. After seven days we could observe a residual oedema, however, not statistically significant. Achilles tendon from saline control group had showed normal collagen fiber orientation with dispersed and fusiform tenocytes. Morphological tendon characteristics underwent significant changes due to collagenase injection. Hypercellularity had been observed in disorganized area showing the damaging nature of the protocol. Laser irradiation was also able to reduce leukocyte infiltration into rat tendon. COX expression by Western Blotting revealed a delayed expression about 12 hours after collagenase injection. Laser treatment (100 mW) was applied 1 hour after collagenase with 1.5 and 3 Joules of total energy with a single irradiation, and it was able to stimulate COX expression after 3 Joules irradiation. However, PGE₂ levels were decreased in laser-treated groups. **Discussion.** LLLT presented an anti-inflammatory effect on collagenase-induced tendonitis. Its mechanism of anti-inflammatory actions seems to be related to the other mechanisms than COX inhibition. Further studies will be necessary to elucidate the LLLT antinflammatory mechanism.

Supported by: FAPESP Grants 05/02117-6

06.125

MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA POR 5-FLUOROURACIL: PARTICIPAÇÃO DE CITOCINAS (IL-1 β E IL-4).

Soares, P. M. G.¹; Mota, J. M. S. C.¹; Brito, G. A. C.¹; Cunha, F. de Q.²; Ribeiro, R. A.¹; Souza, M. H. L. P.¹ - ¹UFC - Fisiologia e Farmacologia; ²FMRP - USP - Farmacologia

Introdução: Mucosite intestinal é um freqüente efeito colateral associado ao uso de 5-fluorouracil (5-FU), cuja fisiopatologia ainda não foi completamente elucidada. O objetivo desse trabalho foi investigar o papel das citocinas IL-4 e IL-1 β nesse evento.

Métodos: Camundongos C57BL/6 selvagens ou nocautes para IL-4 (-/-) foram tratados com 5-FU (450 mg/Kg, i.p.). Outros grupos de C57BL/6 foram tratados com salina ou IL-1Ra (receptor solúvel de IL-1 β , 100 mg/Kg, i.p., por dia). Depois, receberam 5-FU (450 mg/Kg, i.p.) ou salina (grupo controle-C). Após 03 dias, os animais foram sacrificados e amostras do duodeno (D), jejuno (J) e íleo (I) foram colhidas para avaliação morfológica do dano ao epitélio intestinal. A medida da atividade de mieloperoxidase e dosagem de citocinas por ELISA foi feita em amostras de duodeno. Significância estatística (testes ANOVA e Bonferroni) foi considerada quando $P < 0,05$. **Resultados:** 5-FU induziu ($P < 0,05$) dano ao epitélio intestinal (redução da razão altura dos vilos/profundidade das criptas) em todos os segmentos (duodeno-C= $3,3 \pm 0,2$, 5-FU= $1,0 \pm 0,1$; jejuno-C= $2,3 \pm 0,2$, 5-FU= $1,0 \pm 0,1$; íleo-C= $2,1 \pm 0,1$, 5-FU= $0,7 \pm 0,1$), aumento da atividade de MPO (nº neutrófilos/mg de tecido) (C= $663,5 \pm 76,6$, 5-FU= 3579 ± 492) e aumento da concentração de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β : C= $134,8 \pm 31,9$, 5-FU= $280,3 \pm 41,5$; KC: C= $123,9 \pm 27,3$, 5-FU= $177,2 \pm 28,2$; TNF- α : C= $9,9 \pm 0,4$, 5-FU= $12,1 \pm 1,8$). IL-1Ra protegeu ($P < 0,05$) todos os segmentos intestinais da lesão induzida por 5-FU (D= $1,7 \pm 0,1$, J= $2,0 \pm 0,1$, I= $1,1 \pm 0,1$), protegeu contra o aumento da atividade de MPO (2061 ± 308) e da concentração de citocinas (IL-1 β : $98,6 \pm 41,7$; KC: $100 \pm 17,1$; TNF- α : $7 \pm 1,1$). Nocautes para IL-4 apresentaram menos ($P < 0,05$) lesão ao epitélio intestinal (D= $2,9 \pm 0,2$, J= $2,0 \pm 0,2$, I= $1,4 \pm 0,1$), menor atividade de MPO (1702 ± 315) e concentração de citocinas (IL-1 β : $86,5 \pm 29,6$; KC: $105,6 \pm 21,6$, TNF- α : $7,4 \pm 0,5$). **Discussão:** Nossos resultados sugerem que IL-4 e IL-1 β participam na fisiopatologia da mucosite intestinal induzida por 5-FU em camundongos. **Apoio financeiro:** CNPq

06.126

MPO ACTIVITY AND LIPOPEROXIDATION IN PERIPHERAL ORGANS FROM RATS WITH EAE

Dias, A. A.¹; Teixeira, S. A.¹; Bolonheis, S. M.¹; Varriano, A. A.¹; Carrari, C. C.²; Scavone, C.¹; Costa, S. K. P.¹; Muscara, M. N.¹ - ¹USP - Farmacologia; ²UNICAMP - Farmacologia

Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) is a demyelinating autoimmune disease that results from an immunological reaction against different myelin components at the CNS. This disease is widely employed as an animal model of human multiple sclerosis. Interestingly, the number of studies on the consequences of these diseases on peripheral organs are limited. In this work, we investigated the consequences of EAE on the degree of lipoperoxidation (TBARs) and MPO activity in different rat peripheral organs (lung, spleen, liver, stomach, duodenum, colon, ileum, kidney and bladder). EAE was induced by immunization of female Lewis rats with guinea-pig myelin basic protein (MBP) in complete Freund's adjuvant (CFA) and the animals were studied at the stage III of the disease (characterized by complete paralysis of the hind-limbs); control rats received either CFA alone or were not manipulated at all (na^dve). When compared to the CFA rats, EAE resulted in increased MPO values (U/mg tissue) in kidney (280 ± 75 vs. 121 ± 14 ; $p<0.05$), stomach (571 ± 44 vs. 220 ± 45 ; $p<0.001$), duodenum ($3,965\pm386$ vs. $2,721\pm361$; $p<0.05$) and bladder (548 ± 95 vs. 179 ± 35 ; $p<0.001$) and higher TBARs contents (nmol MDA/mg tissue) in liver (6.4 ± 0.3 vs. 5.1 ± 0.1 ; $p<0.05$), stomach (4.2 ± 0.3 vs. 2.0 ± 0.1 ; $p<0.001$) and duodenum (8.0 ± 0.8 vs. 4.0 ± 0.2 ; $p<0.01$). Interestingly, CFA alone caused significant increases of MPO in lung, spleen, duodenum and colon, as well as lung TBARs when compared to na^dve animals. These findings show that the inflammatory process that characterizes EAE is not limited to the CNS and may have systemic consequences by selectively affecting different peripheral organs. **Supported by:** CAPES, CNPq, FAPESP.

06.127

ANTI-INFLAMMATORY EFFECTS OF LIPOXIN A₄ ON ENDOTOXIN-INDUCED UVEITIS IN RATS

Rodrigues, G. B.¹; Passos, G. F.¹; Rodrigues, E. B.¹; Menezes de Lima Jr., O.¹; Medeiros, R.¹; Calixto, J. B.¹ - ¹UFSC - Farmacologia

Introduction: Uveitis is an intraocular inflammation and a leading cause of visual impairment or blindness. It may be caused by infectious organisms or by an immune-mediated process. Lipoxin A₄ (LXA₄) is generated from arachidonic acid via the phospholipase A₂-lipoxygenase pathway during cell-cell interactions. Activation of LXA₄ receptor (ALXR) stops recruitment of neutrophils and facilitates resolution of inflammation by stimulating monocytes and macrophages to perform phagocytosis without releasing cytokines or chemokines. LXA₄ also attenuates NF-κB activation and blocks phosphorylation of p38 and extracellular signal-regulated kinase (*Serhan, Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids. 73:141-162, 2005*). In the present study we attempted to investigate the topical anti-inflammatory effects of LXA₄ in rats subjected to endotoxin-induced uveitis (EIU). **Methods:** EIU was produced by a hindpaw injection of lipopolysaccharide (LPS, 200 mg/rat, 24 h prior) in Wistar rats. Animals were treated with aspirin (ASA)-triggered lipoxins (200 mg/kg, p.o.) or with ASA plus ALXR antagonist Boc2 (butoxycarbonyl-Phe-Leu-Phe-Leu-Phe, 10 µg/kg, i.p.). In other set of experiments, lipoxin 1, 5 or 10 % was topically applied in rat eyes 1 h before and at 6, 12 and 18 h after EIU. A separate group of animals received LXA₄ 10 % plus Boc2 (10 µg/kg, i.p.). Inflammatory cell number and levels of interleukin (IL)-1β, tumor necrosis factor (TNF)-α, prostaglandin (PG)E₂ and protein were determined in the aqueous humor (AqH). **Results:** The topical LXA₄-treatment decreased in a dose-dependent manner the number of inflammatory cells (ID₅₀ = 4 %) and protein leakage (ID₅₀ = 5 %) in the AqH. In addition, LXA₄ 10 % decreased the levels of IL-1β (inhibition of 95 %), TNF-α (inhibition of 95 %) and PGE₂ (inhibition of 69 %) when assessed in the AqH 24 h after LPS injection. Of note, ALXR antagonist Boc2 significantly reverted the anti-inflammatory effects of ASA-triggered lipoxins (200 mg/kg p.o.) and LXA₄ 10 % against LPS. **Conclusions:** Data obtained indicate that LXA₄ causes marked topical ocular anti-inflammatory properties in rats with EIU, an effect that seems to be associated with its ability to inhibit the production of inflammatory mediators, namely IL-1β, TNF-α and PGE₂. Together, these results suggest that stable LXA₄ analogs could represent a promising agent for the management of ocular diseases. **Supported by:** CNPq, CAPES and FAPESC.

06.128

EFEITO DO ÓXIDO NÍTRICO (NO) INALATÓRIO NA ISQUEMIA E REPERFUSÃO INTESTINAL EM RATOS.

Coelho, C. F.¹; Bolonheis, S. M.¹; Varriano, A. A.¹; Teixeira, S. A.¹; Gouvea, I. M.¹; Martins Porto, R.¹; Lopes-Martins, R. A. B.¹; Costa, S. K. P.¹; Muscara, M. N.¹ - ¹USP - Farmacologia

Introdução: A utilização do NO inalatório é reservada ainda há algumas situações clínicas específicas, como a hipertensão pulmonar persistente do recém nascido. Além de seus efeitos pulmonares, existe a possibilidade do NO inalatório atuar em órgãos periféricos, daí a possibilidade de seus efeitos terapêuticos ou colaterais em leitos distantes. Nosso trabalho investigou os efeitos sistêmicos do NO administrado por via inalatória em animais submetidos à isquemia e reperfusão intestinal (IR). **Métodos:** A IR foi realizada em ratos Wistar através da interrupção total do fluxo sanguíneo da artéria mesentérica superior durante 45 min seguido de reperfusão (grupo IR). Metade os animais recebeu, aos 10 minutos iniciais de isquemia, tratamento com NO inalatório (13,6 ppm) durante 30 minutos (grupo IR-NO). Animais controle, respectivamente grupo Sham e Sham-NO, foram utilizados. Após 6 h de reperfusão, os animais foram decapitados e amostras de órgãos periféricos foram coletadas para posteriores análises como infiltração de neutrófilos (através da atividade de MPO) e o grau de peroxidação lipídica (através do conteúdo de TBARs). **Resultados:** Animais submetidos à IR apresentaram uma diminuição na atividade de MPO ($2,9 \pm 0,2$ U/mg tecido) e no conteúdo de TBARs ($4,8 \pm 0,4$ nmol aldeído/ mg tecido) no baço quando comparados com o grupo Sham ($9,9 \pm 1,8$ U/mg tecido e $8,3 \pm 1,1$ nmol aldeído/ mg tecido, respectivamente) sugerindo um efluxo celular neste órgão, comprovando sua contribuição para a propagação dos efeitos deletérios iniciados no intestino. O tratamento com NO inalatório não interferiu nesta resposta. O grupo IR apresentou um aumento no conteúdo de TBARs no fígado ($4,0 \pm 0,2$ nmol aldeído/ mg tecido), quando comparado com seu respectivo grupo controle (Sham: $3,1 \pm 0,2$ nmol aldeído/ mg tecido; $P < 0,001$). O tratamento com NO agravou o prejuízo oxidativo neste órgão ($5,2 \pm 0,1$ nmol aldeído/ mg tecido ; $P < 0,001$ vs IR). O grupo IR não apresentou aumento na peroxidação lipídica no rim quando comparado com animais Sham. No entanto, o prejuízo oxidativo ocorreu quando estes animais foram submetidos ao tratamento com NO inalatório (IR-NO: $8,1 \pm 0,4$ vs IR: $7,0 \pm 0,2$ nmol aldeído/ mg tecido; $P < 0,05$). Valores de MPO no fígado e no rim não diferiram entre os grupos analisados. **Conclusão:** Manobras cirúrgicas ou condições clínicas associadas à isquemia e reperfusão mesentérica devem levar em consideração possibilidades de efeitos deletérios do tratamento com NO inalatório no fígado e no rim, principalmente em pacientes com comprometimento renal e hepático anteriormente estabelecidos. **Apoio financeiro:** CAPES, FAPESP, CNPq.

06.129

NEUROGENIC AND BIOCHEMICAL INVESTIGATIONS OF BOWEL INFLAMMATION IN A EXPERIMENTAL MODEL OF GASTROSCHISIS

Branco, L. T. P.¹; Teixeira, S. A.¹; Varriano, A. A.¹; Muscara, M. N.¹; Lopes-Martins, R. A. B.¹; Sbragia Neto, L.²; Silva, L. V.³; Bueno, M. P.³; Costa, S. K. P.¹ - ¹USP - Farmacologia; ²UNICAMP - Cirurgia; ³UNICAMP - Tocoginecologia

Background: Gastroschisis is a congenital defect of abdominal wall closure resulting in perivisceritis due to the contact between the bowel and amniotic fluid. Here, we would like to address the possible link between neuropeptides, cytokines, nitric oxide (NO) and reactive oxygen species (ROS) in this inflammatory process in rats.

Methods: Pregnant Sprague Dawley rats (18.5 days of pregnancy) were anesthetized with 0,6ml of cetamine/xilazine i.m. (50:10 mg/ml) and separated in to three main groups, the first one was induced experimental gastroschisis (G), the Sham group the procedure was simulated (S) and the Naïve used as a control (C). Half of each group was treated with glucocorticoid (dexametasone; CT – 0.25 mg/Kg) or saline solution during the surgery procedure (i.p.) totalizing six groups (S, C, G, SCT, CCT e GCT). On day 21.5 of pregnancy, the rats were sacrificed, the embryos' intestine samples were removed and kept in –80° C for biochemical analyses: For gene expression we used RT-PCR for the neuronal nitric oxide synthase (nNOS) and inducible (iNOS), kinins (CINC-1, CINC-2 e CINC-3), tumoral necrosis factor receptor (TNFR1 and TNFR2) and NK2 receptor; and for protein expression, Western blotting for 3-Nytrotirosine (3NT) and superoxide dismutase (SOD1). **Results:** We observed an iNOS gene expression in G group and the treatment with glucocorticoid (GCT) was not able to inhibit this expression. Otherwise the glucocorticoid treatment in the G group (GCT) increased nNOS gene expression when compared with untreated one ($p < 0.05$) and 3NT protein expression against the all groups ($p < 0.01$). No significant alteration was observed between the groups in the others gene expression analyzes and SOD1 protein expression. **Conclusion :** Our results show the role of the oxidative stress in the deleterious effects caused by Gastroschisis and the treatment with dexametasone seems to increase such effect. On the other hand we did not observed neurogenic inflammation markers in this animal model of gastroschisis. In summary these results remains the subject of further investigations between inflammatory biochemical markers and the embryos' intestine under experimental model of gastroschisis. **Supported by:** CAPES, CNPq and FAPESP.

06.130

EVIDENCE THAT SUBSTANCE P CONTRIBUTES TO KAOLIN-INDUCED RAT KNEE INFLAMMATION

Camargo, L. L.¹; Yshii, L. M.¹; Denadai-Souza, A.¹; Lopes-Ferreira, M.²; Lima, C.²; Barreto, M. A. A.¹; Boletini-Santos, D.²; Teixeira, S. A.¹; Muscara, M. N.¹; Costa, S. K. P.¹ - ¹ICB - USP - Pharmacology; ²Butantan Institute - Immunopatology Laboratory

OBJECTIVES: The neuropeptide substance P (SP) released by capsaicin-sensitive nerves (CSN) plays a pivotal role in neurogenic inflammation. Despite the prevalence of arthritis, the contribution of SP to the progression of arthritis has not been established. This study investigated the effect of CSN ablation and SR140333, a SP antagonist, on knee joint inflammation. **METHODS:** The knee joint inflammation was induced by intraarticular (i.art.) injection of kaolin (10 %) in anaesthetised female Wistar rats (200 – 250 g) pre-treated with capsaicin (50 mg/kg s.c.; Jancsó *et al.*, 1977) or NK₁ receptor antagonist SR140333 (1 nmol/joint). Inflammatory parameters such as knee oedema and spontaneous pain measured by scores (Kisin *et al.*, 2005) were evaluated over a period of 5 h. Additional measurement of inflammatory response including histopathological changes in the knee as well as leukocyte influx, myeloperoxidase activity (MPO) and cytokines levels were determined in the synovial fluid after 5 h. **RESULTS:** The kaolin-injected knee (ipsilateral - IPSI) of vehicle-treated rats exhibited a significant, time-dependent oedema as compared to the contralateral knee. In addition, increased pain score and high levels of MPO activity and both pro-inflammatory (IL-1b and IL-6, but not TNFa) and anti-inflammatory (IL-10) cytokines were detected in the IPSI synovial fluid of arthritic rats. Either destruction of knee joint CSN fibres by neonatal capsaicin treatment or treatment with SR140333 significantly attenuated the kaolin-induced pain score and knee oedema, suggesting that kaolin is acting, at least partially, via a neurovascular-mediated mechanism. In contrast, the same treatment caused increased cytokine concentrations measured 5 h post kaolin injection. **CONCLUSIONS:** The i.art. injection of kaolin caused significant clinical signs in the rat knee compatible with arthritis. Our findings suggest that the peripheral release of SP after kaolin injection acts to increase pain generation, oedema formation and inflammatory cell influx. However, chronic tachykininergic depletion by capsaicin treatment up-regulates the production of pro-inflammatory cytokines that are important in triggering cell influx in the synovial cavity. **Supported by:** CNPq, CAPES and Fapesp.

06.131

INVESTIGATION INTO A POTENTIAL ANTIINFLAMMATORY EFFECT OF HEMOPRESSIN ON EXPERIMENTAL ARTHRITIS

Camargo, L. L.¹; Denadai-Souza, A.¹; Yshii, L. M.¹; Schenka, A.²; Barreto, M. A. A.¹; Boletini-Santos, D.³; Lima, C.³; Rioli, V.³; Muscara, M. N.¹; Ferro, E. S.⁴; Costa, S. K. P.¹ - ¹ICB - USP - Pharmacology; ²UNICAMP - Pathology; ³Butantan Institute - Immunopatology Laboratory; ⁴ICB - USP - Cell Biology and Development

OBJECTIVES: Arthritis is characterized by severe pain, oedema and destruction of the cartilage and bone, reducing quality of life. Early and long-term treatment is essential for preventing or delaying progression of arthritis. Although common world wide, no effective cure is available. This study proposes a new strategy for the treatment of antigen-induced experimental arthritis (AIA) based on daily administration of hemopressin, a peptide derived from rat hemoglobin α -chain, with antinociceptive actions (Dale *et al.* 2005, Peptides 26:431-6). **METHODS:** AIA was induced via intraarticular (i.art.) injection of methylated bovine serum albumin in immunized male Sprague Dawley rats under anaesthesia with halothane. Knee oedema and pain score were assessed daily in controls and animals treated with hemopressin (10 or 20 μ g/day; i.art.). Additional measurement of inflammatory response including histopathological changes in the knee as well as leukocyte influx, and cytokines levels were determined in the synovial fluid at day 4. **RESULTS:** AIA rats developed a severe mono-arthritis characterized by joint oedema and pain. At day 4, there was marked cellular infiltration, hyperplasia, pannus formation and destruction of bone and cartilage, but pro-inflammatory cytokines were undetectable by ELISA. Both doses of hemopressin significantly reduced the knee oedema, but only 20 μ g of hemopressin attenuated the pain score. Acute joint inflammation was significantly reduced by hemopressin, but failed to significantly affect histopathological signs (hyperplasia, pannus etc.). **CONCLUSIONS:** Hemopressin has potential for treating acute signs of AIA by reducing synovial plasma protein extravasation, alleviating pain and reducing acute joint histopathological changes, thus providing an alternative strategy for treatment of oedema and pain in arthritis. **Supported by:** Fapesp, CNPq and Capes

06.132

EFEITO DO VENENO DA SERPENTE *Crotalus durissus terrificus* E DO SEU COMPONENTE MAJORITÁRIO, A CROTOXINA, NA VIABILIDADE DE CÉLULAS ENDOTELIAIS *IN VITRO*

Matsubara, M. H.¹; Lima, S. A.¹; Teixeira, C. F. P.¹ - ¹Instituto Butantan - Farmacologia

Introdução: O veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus* (VCdt) induz efeitos locais e sistêmicos que interferem no sistema nervoso central e de coagulação. O componente majoritário do VCdt é a crototoxina (CTX), de ação neurotóxica e miotóxica, que consiste de duas subunidades: a crotapotina (CA) e a fosfolipase A₂ (CB). A CTX e as suas subunidades exercem efeitos adicionais, como a indução da agregação plaquetária e inibição de eventos inflamatórios como edema, dor e infiltrado leucocitário. Apesar das ações do veneno e da CTX envolverem componentes de vasos sanguíneos, os efeitos dos mesmos sobre o endotélio não são conhecidos. O endotélio, por sua vez, desempenha papel protetor do sistema cardiovascular e modificações desse tecido comprometem a homeostasia e desencadeiam uma resposta imediata, de componentes fisiológicos, para o retorno ao estado normal. Desse modo, o presente estudo tem por objetivo avaliar o efeito do VCdt e da CTX na viabilidade de células endoteliais em cultura. **Métodos:** As células endoteliais murinas (hibridoma), da linhagem tEnd, foram cultivadas em meio de cultura RPMI-1640 com 10% soro fetal bovino (SFB) e semeadas em microplacas de 96 poços para formação da monocamada. Após atingirem confluência (48 horas), as CEs foram incubadas com o VCdt e a CTX (1, 10 e 100 mg/mL) ou RPMI (controle). Decorridos 1, 4, 24 e 48 horas, as microplacas foram centrifugadas a 200 x g, por 10 minutos e o sobrenadante coletado para o ensaio da atividade enzimática da lactato desidrogenase (LDH). A avaliação da atividade metabólica foi feita pelo método da redução do sal de tetrazolium (MTT), a partir da monocamada celular. **Resultados:** O VCdt reduziu significativamente a atividade metabólica das CEs (35, 51, 89 e 82% em relação ao controle) em todos períodos de incubação (1, 4, 24 e 48 horas, respectivamente) somente na maior concentração (100 mg/mL). A análise da atividade da LDH mostrou que esse veneno causou redução da viabilidade celular, em percentuais de 48 e 100%, entre 4 e 24 horas, apenas na maior concentração. Entretanto, a CTX, na maior concentração reduziu a atividade metabólica das CEs somente a partir de 24 horas de incubação (10 e 43%, em relação ao controle). Nas demais concentrações, esta toxina não afetou o metabolismo celular em nenhum dos tempos avaliados. A CTX causou redução da viabilidade celular, em relação ao controle, a partir de 24 horas de incubação (26 e 48%, em relação ao controle) apenas na maior concentração. **Discussão:** O VCdt e a CTX são capazes de afetar a atividade metabólica e a viabilidade de células endoteliais em cultura, de modo tempo-dependente, sendo a CTX menos tóxica do que o veneno bruto. Esta é a primeira demonstração da capacidade do veneno de *Crotalus durissus terrificus* e do seu componente majoritário, a crototoxina, afetarem parâmetros fisiológicos do endotélio. **Apoio Financeiro:** FAPESP e CNPq.

06.133

PROPRIEDADE ANTI-HIPERALGÉSICA DE NOVOS PROTÓTIPOS HETEROCÍCLICOS SIMBIÓTICOS

Louback, L. S.¹; Lacerda, R. B.¹; Romeiro, N. C.¹; Fraga, C. A. M.¹; Barreiro, E. J.¹; Miranda, A. L. P.¹ - ¹UFRJ - FM - LASSBio

Introdução: A inflamação é um processo fisiopatológico envolvido na gênese de um grande número de doenças como artrite reumatóide, psoríase e esclerose múltipla. Embora a eficácia dos fármacos inibidores seletivos de ciclooxigenase-2 (COX-2) tenha sido comprovada para o tratamento de doenças inflamatórias crônicas, estudos subseqüentes demonstraram que a alta seletividade pode gerar efeitos cardiovasculares indesejáveis. Desta forma é necessário buscar novas estratégias terapêuticas e novos alvos para o tratamento seguro e eficaz de doenças inflamatórias. Neste contexto, a MAPk p38 vem surgindo como potencial alvo terapêutico para o tratamento da inflamação, câncer, leucemia e outras doenças. Em nosso laboratório foi sintetizada uma série de derivados imidazo[1,2-a]piridínicos planejados como agentes antiinflamatórios e analgésicos simbióticos, através da hibridação molecular entre inibidores seletivos de COX-2 e MAPk p38. Este trabalho tem por objetivo avaliar a atividade anti-hiperalgésica desta série. **Metodologia:** Foram utilizados ratos wistar de ambos os sexos, pesando 130-200 g. Os animais foram tratados com veículo (tween:etanol:água) ou com os derivados LASSBio (100µmol/kg), uma hora antes da injeção intraplantar de capsaicina (5µg/5µl/pata) na pata traseira direita. Foram realizadas medidas do tempo de latência da pata do animal em placa quente (52 °C) instantes antes do tratamento oral, da injeção intraplantar (tempo zero) e nos tempos 2, 5, 10, 30 e 60 minutos após a injeção de capsaicina. A variação de latência foi calculada diminuindo a latência (s) dos tempos 2-60 min da do tempo zero (Mizushima et al, Pain, 113, 51, 2005). **Resultados:** A capsaicina intraplantar induz um efeito hiperalgésico, observado pelo estímulo térmico, nos tempos de 2, 5 e 10 minutos, revertendo após os 30 minutos. Estudos preliminares com cinco derivados da série proposta permitiram destacar dois compostos ativos: LASSBio 987 e LASSBio 1002, que foram capazes de inibir a hiperalgesia térmica induzida por capsaicina. LASSBio 987 inibiu a hiperalgesia em 70% nos tempos de 5 e 10 minutos, enquanto LASSBio 1002 inibiu na ordem de 50% nos tempos de 2, 5 e 10 minutos. **Discussão e Conclusão:** As MAP cinases estão envolvidas na transmissão fisiológica e patológica da dor e estudos recentes demonstram o envolvimento da MAPk p38 no modelo de hiperalgesia térmica induzida por capsaicina (Sweitzer et al, Pain, 111, 278, 2004). Compostos inibidores de COX não possuem atividade neste ensaio, portanto os resultados obtidos sugerem que o efeito dos compostos LASSBio 987 e 1002 pode ser indicativo de uma ação sobre MAPk p38, corroborando com o planejamento estrutural proposto. A avaliação destes derivados sobre a atividade antinflamatória está em andamento. **Apoio Financeiro:** PRONEX, CNPq, FAPERJ E CAPES.

06.134

UP REGULATION OF KININ B₁ RECEPTORS IN NORMAL AND INFLAMED MOUSE COLON: A PHARMACOLOGICAL AND MOLECULAR APPROACH

Balz, D.¹; Leite, D. F. P.¹; Campos, M. M.²; Fernandes, E. S.¹; Passos, G. F.¹; Leal, P. C.³; Pesquero, J. B.⁴; Calixto, J. B.¹ - ¹UFSC - Farmacologia; ²PUC - RS - Cirurgia - Odontologia; ³UFSC - QMC / CFM; ⁴UNIFESP - EPM - Biofísica

Introduction: The inflammatory bowel diseases (IBD) are chronic inflammatory conditions of the gastrointestinal tract, clinically present as two main disorders: Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC). Previous publications on animal models of colitis and human IBD suggest that kinins appear to greatly contribute to development and maintenance of gastrointestinal diseases, such as IBD (Devani et al., 2002; Stadnicki et al., 2003, 2005; Hara et al., 2007). In the present study, we sought to investigate the contribution of kinin B₁ receptor (B1R) in the pathogenesis of UC and some of the mechanisms underlying B1R up-regulation. **Methods:** Colitis was induced in mice after a fasting period by administration of 0,1 ml of 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS; 2,5 mg in 50% ethanol) into the colon. After different time points following colitis induction the distal portion of the colon was removed and used for diverse assays. The technical approaches used included; organ bath studies, measurement of myeloperoxidase (MPO) activity and semi-quantitative RT-PCR. **Results:** Induction of colitis resulted in a time-dependent increase of des-Arg⁹-BK (1 µM)-induced contraction in mouse colon. This enhancement was significant as early as 6 h after colitis induction, and reached the maximal at 72 h (a 20 fold increment). Interestingly, B1R mRNA expression was found increase 6h after colitis induction (3.6 fold), decreased afterwards, but remained up-regulated until 72h (1.9 fold), as analyzed by RT-PCR. To assess the possible mechanisms involved in B1R induction, mice were treated (twice a day) since the fasting period of colitis induction with: dexametasone (1 mg /kg s.c.), the NFκB inhibitor (PDTC- 30 mg /kg i.p.), the iNOS blocker (1400 W- 10 mg/kg s.c.) or the TNF-α inhibitors (Thalidomide- 50 mg/kg v.o. and infliximab 2 mg/kg, s.c once a day). The maximal contractile responses elicited by des-Arg⁹-BK at 72 h of colitis were significantly reduced after the treatment with all groups of drugs (83,2±1,8; 53,9±5,2; 32,8±4,2; 46,4±6,0 and 38,0±4,9 %, respectively) in comparison to control. To analyze the role of B1R in the pathogenesis of UC, 72 h after colitis induction the macroscopic score and MPO were accessed in knockout B1R (B1R^{-/-}) and wild-type mice. The B1R^{-/-} animals showed significant reduction of both damage score (55,24±3,63 %) and MPO activity (54,08±7,05 %) in comparison to their wild-type counterparts. **Discussion:** Present results provide convincing pharmacological and molecular evidence indicating that B1R is an important player in the pathogenesis of UC. Data reinforces the notion that selective B1R antagonists might represent new therapeutic choices for the treatment of IBD. **Supported by:** CNPq, CAPES e FAPESC