

## Setor 08. Imunofarmacologia

08.001

### **PARTICIPAÇÃO DOS LEUCOTRIENIOS NO MECANISMO DE LESÃO PULMONAR AGUDA INDUZIDA PELA SEPSE.**

Soledade, E. S.<sup>1</sup>; Oliveira, G. P.<sup>2</sup>; Oliveira, M. B. G.<sup>2</sup>; Rocco, P. R. M.<sup>3</sup>; Canetti, C.<sup>4</sup>; Benjamim, C. F.<sup>1</sup> - <sup>1</sup>UFRJ - Farmacologia Básica e Clínica - ICB; <sup>2</sup>UFRJ - IBCCF - Investigação Pulmonar; <sup>3</sup>UFRJ - Investigação Pulmonar; <sup>4</sup>UFRJ - IBCCF

**Introdução:** A sepse é um evento freqüente em hospitais do mundo inteiro e resulta em alto índice de mortalidade e de morbidade. A intubação por insuficiência respiratória e sedação é uma prática rotineira durante o tratamento a longo prazo, com níveis de Ransay variados, sendo dependente da situação de dinâmica ventilatória apresentada pela exposição prolongada ao ventilador. Esse procedimento prejudica a retomada voluntária da suficiência respiratória, apresentando-se como o segundo maior fator de risco para o desenvolvimento de LPA (lesão pulmonar aguda) e SARA (síndrome da angústia respiratória do adulto), depois da pneumonia. Esses dados sugerem que há a necessidade da compreensão dos mecanismos e mediadores que interagem no processo inflamatório durante a SARA. Dados de literatura já demonstraram a participação de 5-LO e seus produtos em algumas doenças respiratórias, porém nada foi feito no modelo experimental de sepse induzido por CLP (cecal ligation and puncture) com a finalidade de estudar sua influência no processo de indução a LPA e suas devidas alterações sobre a mecânica pulmonar. **Métodos:** Camundongos das linhagens WT-129 e 5-LO<sup>-/-</sup> pesando aproximadamente 18-22g foram usados para os experimentos (20 animais por experimento). Animal anestesiado do grupo CLP foi submetido a laparotomia com a ligação parcial e 5 perfurações no ceco. Os animais sham operados foram utilizados como controle. A mecânica pulmonar e coleta de materiais para histologias são feitas após 16h. Mecânica pulmonar - foi avaliada pelo método de oclusão ao final da inspiração após insuflação com fluxo constante (BATES et al, 1985; BATES et al, 1988), que permite analisar separadamente os componentes elástico, resistivo e viscoelástico e/ou inomogêneo do pulmão. Histologia e morfometria pulmonar – Os pulmões foram retirados em bloco ao final da expiração (capacidade residual funcional – CRF) para análise morfométrica com a parede torácica aberta. O tecido pulmonar foi avaliado através do número de pontos do campo que coincidirão com a área de tecido e não sobre o espaço aéreo. Os valores finais serão expressos como média±erro padrão. **Resultados:** Estudos preliminares apontam proteção histológica nos animais 5-LO<sup>-/-</sup> do grupo CLP com ausência de membrana hialina e espessamento de septo inter alveolar indicativos de LPA. Quanto a mecânica pulmonar, houve preservação dos componentes elástico, resistivo e viscoelástico e/ou inomogêneo do pulmão nos animais 5-LO<sup>-/-</sup> comparado aos animais selvagens. **Discussão:** Os resultados indicam que o animal 5-LO<sup>-/-</sup> possui diferente susceptibilidade a LPA induzida pela sepse apresentando preservação dos componentes pulmonares devido à ausência dos leucotrienos, estes responsáveis pelo aumento da resposta inflamatória. **Apoio Financeiro:** CNPq; FAPERJ

08.002

## COMPARAÇÃO DO PERFIL DE IMUNOSSUPRESSÃO EM CAMUNDONGOS C56BL6 E BALB/C SUBMETIDOS À SEPSE GRAVE

Brogliato, A. R.<sup>1</sup>; Antunes, C. A. C.<sup>2</sup>; Benjamim, C. F.<sup>2</sup>; Vianna-Jorge, R.<sup>2</sup> - <sup>1</sup>UFRJ - Farmacologia; <sup>2</sup>UFRJ - Farmacologia Básica e Clínica - ICB

**Introdução e Objetivos:** Prostaglandina E2 (PGE2) é um dos primeiros mediadores liberados por macrófagos. É considerado um poderoso agente imunossupressor associado com a redução da mitose de linfócito T, síntese de IL-12 e apresentação de antígeno. Os camundongos C56BL6 e Balb/c apresentam diferentes susceptibilidades à sepse e produzem diferentes níveis de PGE2 quando estimulados com LPS. Entretanto, a correlação entre os níveis de PGE2 e a susceptibilidade à sepse ainda não foi esclarecida. O presente estudo objetiva comparar o perfil da resposta inflamatória pós sepse e a susceptibilidade à infecção secundária por *Aspergillus fumigatus* entre os camundongos C57BL6 e Balb/c. **Métodos e Resultados:** Os animais C57BL6 e Balb/c são submetidos a CLP (*cecal ligation and puncture*), onde o ceco é parcialmente ligado e perfurado com agulha 21G por nove ou duas vezes, respectivamente. Os animais usados como controle, sofrem apenas a exposição do ceco (sem perfuração e ligação) e são denominados Sham operados. Os camundongos submetidos à Sham ou CLP são tratados com antibióticos 5, 24 e 48 horas após a cirurgia resultando em ~60% de sobrevivência. No 3º dia subsequente cada animal é desafiado intratraquealmente com conídeos de *A. fumigatus*. A sobrevivência desses animais é acompanhada por 7 dias após o desafio. Resultados preliminares mostram que somente os camundongos submetidos a CLP são suscetíveis à infecção secundária pelo fungo. Os Balb/c são mais suscetíveis à infecção secundária pelo *A. fumigatus*, alcançando 70% de letalidade quando são administrados  $4 \times 10^6$  conídeos, enquanto se faz necessário  $7 \times 10^7$  conídeos para o C57BL6 apresentar o mesmo perfil de letalidade. A determinação dos níveis de PGE2 no lavado bronco alveolar (BAL) foi realizada 18 horas após a administração de  $4 \times 10^6$  conídeos nos Balb/c e C57BL6. Os animais que passaram por CLP produzem menor quantidade de PGE2 quando comparados com os Sham. Após o desafio com o fungo ou salina, os Balb/c foram capazes de produzir níveis mais elevados de PGE2 quando comparado com os níveis alcançados pelos C57BL6. **Conclusão:** Esses resultados mostram que os camundongos C57BL6 e Balb/c apresentam diferentes susceptibilidades quanto à infecção secundária por *A. fumigatus*. Os animais Balb/c, sendo eles Sham operados ou CLP, produzem maiores quantidades de PGE2 quando comparados com os C57BL6, fato que poderia ser explicado pela diferença genética entre os animais. **Apoio Financeiro:** FAF-RJ, Pronex, FAPERJ, CNPQ

08.003

## O PAPEL DA CÉLULA DENDRÍTICA NA RESISTÊNCIA DE CAMUNDONGOS DEFICIENTES PARA O RECEPTOR CCR2 DURANTE SEPSE GRAVE

França, A. M.<sup>1</sup>; Coelho, R. M.<sup>2</sup>; Benjamim, C. F.<sup>3</sup> - <sup>1</sup>UFRJ - Farmacologia; <sup>2</sup>UFRJ - DFBC; <sup>3</sup>UFRJ - Farmacologia Básica e Clínica - ICB

**Introdução e objetivos:** A manifestação clínica da sepse é consequência de uma resposta imune intensa do hospedeiro contra um patógeno. Durante uma infecção o organismo responde inicialmente de forma inespecífica (resposta inata), liberando mediadores inflamatórios na tentativa de eliminar o agente agressor. Dados de literatura demonstraram que a população de células dendríticas (DCs) está reduzida após sepse grave e que as presentes no pulmão apresentam perfil Th2. O receptor CCR2 está presente nas células dendríticas e são importantes para o recrutamento até o local da injúria. Assim, nosso objetivo foi estudar se os animais CCR2<sup>-/-</sup> são mais resistentes a sepse grave e possivelmente a uma infecção secundária, e os mecanismos envolvidos nesse processo. Os dados obtidos podem favorecer o desenvolvimento de um fármaco que bloqueie a atividade do receptor CCR2 em pacientes que apresentem um quadro séptico, conseguindo conter a evolução da doença. **Materiais e métodos:** Animais C57/Bl6 e CCR2 deficientes foram submetidos à ligadura do ceco e perfurações (CLP – sigla em inglês), sendo o ceco parcialmente ligado e perfurado nove vezes com agulha 21G. Os animais controles (sham-operados) apenas a exposição do ceco à cavidade abdominal. Estes animais, CLP ou Sham operados, foram tratados com antibiótico, ertapenem, por 5, 24 e 48hs. No terceiro dia cada animal recebeu i.t. salina ou  $5,5 \times 10^7$  de conídios de *Aspergillus fumigatus* (Asp). A sobrevivência destes animais foi acompanhada por sete dias. Em outro grupo experimental os animais submetidos à CLP e desafiados com Asp foram sacrificados 2 dias após, a medula e o pulmão foram coletados para análise de marcadores de células dendríticas por citometria de fluxo. **Resultados:** Os animais CCR2<sup>-/-</sup> apresentaram 100% de sobrevivência pós sepse e também pós infecção secundária, quando comparados com os animais B6. DCs CD11c<sup>+</sup> estavam presentes em maior quantidade na medula do que no pulmão 2 dias após infecção secundária. O pulmão dos animais CCR2<sup>-/-</sup> já apresentam em torno de 50% menos DCs quando comparados com animais selvagens, quando submetidos a CLP ou sham-operados antes da infecção secundária. Estes dados sugerem que as DCs alteradas após sepse grave não são recrutadas para o pulmão em animais CCR2<sup>-/-</sup> e esse fato talvez justifique a melhor sobrevivência dos animais deficientes. **Conclusão:** Os animais CCR2<sup>-/-</sup> apresentaram maior resistência à CLP e a infecção por *Aspergillus fumigatus* supostamente por não apresentarem células dendríticas alteradas pós-sepse grave no pulmão. Isto parece ser devido ao acúmulo de DCs na medula de animais CCR2<sup>-/-</sup> após a infecção secundária.

Apoio Financeiro: CNPq - PIBIC

08.004

**EFFICACY OF MEDICALLY IMPORTANT ANTIVENOMS AND THE CROSS-IMMUNOREACTIVITY BETWEEN OPHIDIC TOXINS REVEALED BY ANTI-PEPTIDE ANTIBODIES**

Teixeira, F. R.<sup>1</sup>; Cunha, O. A. B.<sup>1</sup>; Oliveira, E. B.<sup>2</sup> - <sup>1</sup>FMRP - USP - Bioquímica e Imunologia; <sup>2</sup>FMRP - USP - Biochemistry and Immunology

It has long been realized that antivenoms contain numerous redundant antibodies specific to non-toxic venom antigens that dilute the efficacy of the toxin-specific antibodies. The phenomenon of cross-reactivity involving structurally unrelated epitopes, as confirmed by this work, might disclose an additional "dilution factor" in the efficacy of medically important antivenoms since certain anti-toxin antibodies could engage in therapeutically irrelevant interactions with cross-reacting, non-toxic venom components. It is widely established that antivenoms cross-react with venoms of phylogenetically related species, and that anti-toxin antibodies cross-react with other functionally and structurally related components of homologous and heterologous venoms. Only recently it was shown that affinity-purified antibodies against an undecapeptide derived from *B.moojeni* L-amino acid oxidase cross-reacted with functionally unrelated venom toxins, among which two serine proteases and a phospholipase A<sub>2</sub> homolog. In the present work we confirmed and extended the demonstration that immunological cross-reactivity in snake venoms involves functionally unrelated proteins. First, we prepared rabbit anti-sera against a synthetic peptide (SSEHIAPLSLPSSPPI) whose sequence was chosen among those of the various external loops of the *Crotalus durissus* thrombin-like enzyme, as judged by the crystallographic 3-D structure of the homologous (70% sequence similarity) *Trimeresurus stejnegeri* plasminogen activator. The specificities of these antisera were then studied by using the affinity-purified anti-peptide antibodies to probe western blots of venoms of representative Brazilian snakes, indicating that components besides the parental coagulating enzyme were also labeled in most cases. The specificities of the affinity-purified antibodies varied slightly depending on the N- or C- terminal coupling orientation of the peptide during the immunoabsorbent preparation. In summary, the anti-peptide antibodies raised against a well defined segment of the *C.durissus* thrombin-like enzyme cross-reacted with functionally unrelated venom components, as judged by the western blot analyses. Immunological cross-reactivity of snake venom components has implications in antivenom production beyond anti-venom therapy. In a recent report of the WHO workshop on the standardization and control of antivenoms that new approaches to boost effectiveness of antivenom therapy, leading to the administration of reduced amounts of antiserum, should include the use of clinically important toxic fraction of venom as immunogens in the process of antivenom production. Our results reinforce the cautionary note, expressed on the use of whole venom or venom fractions in the immunization of animals for antivenom production as little is known about the interactions between different venom components. **Supported by:** CAPES

**08.005**

**INDUCED NITRIC OXIDE SYNTHASE-DEFICIENT MICE HAVE ELEVATED SUSCEPTIBILITY TO DENGUE INFECTION.**

Cisalpino, D.<sup>1</sup>; Fagundes, C. T.<sup>1</sup>; Amaral, F. A.<sup>1</sup>; Sousa, L. P.<sup>2</sup>; Souza, R. S.<sup>2</sup>; Zirke, C.<sup>2</sup>; Souza, P. R. S.<sup>2</sup>; Kroon, E. G.<sup>3</sup>; Atrasheuskaya, A.<sup>4</sup>; Ignatyev, G.<sup>4</sup>; Teixeira, M. M.<sup>2</sup>; Souza, D. da G. de<sup>3</sup> - <sup>1</sup>UFMG - Bioquímica e Imunologia / Microbiologia; <sup>2</sup>UFMG - Bioquímica e Imunologia; <sup>3</sup>UFMG - Microbiologia; <sup>4</sup>State Research Center of Virology and Biotechnology Vector - Novosibirsk region, Russia - Virology

Introduction: Dengue virus infection has emerged as the most important mosquito-borne viral disease in tropical areas. The activity of iNOS seems to play an important role during the pathogenesis and in the control of viral infections. Our group evaluated the importance of iNOS in an experimental model of Dengue virus serotype 2 (DEN-2) infection. This model of DEN-2 infection is followed by great inflammatory response as assessed by cytokine/chemokine production and neutrophil recruitment. Moreover, there is a significant lethality after DEN-2 inoculum. Methods: Wild type (WT) and iNOS deficient (iNOS<sup>-/-</sup>) mice, were infected intra-peritoneally with 10 PFU of DEN-2. After various periods of time (3<sup>rd</sup>, 5<sup>th</sup> and 7<sup>th</sup> days of infection), lethality, hematocrit and platelet number, cytokine/chemokine production and neutrophil influx were evaluated. Results and Discussion: iNOS<sup>-/-</sup> presented elevated lethality rates when compared with WT mice. This was associated with intense hemoconcentration and exacerbated thrombocytopenia. Despite high IFN- $\gamma$  production, iNOS<sup>-/-</sup> mice showed increased levels of TNF- $\alpha$  (liver, spleen and serum) and IL-6 (spleen and serum) and decreased production of CCL-2 (spleen) and CXCL-9 (spleen) after DEN-2 infection. Furthermore, neutrophil influx in liver and lungs was reduced in iNOS<sup>-/-</sup> mice infected with DEN-2, even in the presence of high amounts of tissue CXCL1-3. These alterations did not result in higher viral titres in spleen after inoculum. Thus, the production of NO seems to be of great importance to resistance to Dengue infection. In the absence of this molecule, the infection evolves to a more severe manifestation, resulting in enhanced lethality. **Supported by:** CNPq e FAPEMIG

08.006

**ANTI-INFLAMMATORY EFFECTS OF AT1 RECEPTOR ANTAGONIST, LOSARTAN, IN A MOUSE MODEL OF RHEUMATOID ARTHRITIS**

Silveira, K.<sup>1</sup>; Coelho, F. M.<sup>2</sup>; Sachs, D.<sup>2</sup>; Barroso, L. C.<sup>2</sup>; Thomaz Vieira, A.<sup>2</sup>; Lopes, F.<sup>2</sup>; Bretas, T. L.<sup>2</sup>; Santos, R. A. S.<sup>1</sup>; Teixeira, M. M.<sup>2</sup> - <sup>1</sup>UFMG - Fisiologia e Biofísica; <sup>2</sup>UFMG - Bioquímica e Imunologia

**Introduction:** The role of renin-angiotensin system (RAS) in cardiovascular control is classically known. However, there is an increasing body evidence showing the involvement of RAS in inflammatory diseases. Rheumatoid arthritis is an inflammatory disease that ultimately leads to a progressive destruction of intra and periarticular structures. **Objective:** The purpose of this study is to investigate the anti-inflammatory potential of a selective AT1 receptor antagonist, Losartan, in murine antigen-induced arthritis (AiA). **Methods:** AiA was induced by the injection of methylated bovine serum albumin (mBSA) into the knee joint of preimmunized mice with mBSA + complete Freund's adjuvant (CFA). Animals received dose-ranging of a AT1 receptor antagonist, Losartan, one hour before and 6 hours after the challenge with mBSA (10 $\mu$ g/knee). The inflammatory peak occurred 24 hours after the challenge. In this time, recruitment of neutrophils was measured by assaying the myeloperoxidase activity (MPO) and differential cell count. Tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and keratinocyte-derived chemokine (KC) levels were determined by ELISA. **Results:** Losartan decreased neutrophil accumulation intra and periarticular knee tissues. The number of neutrophils in intraarticular cavity was 2165 $\pm$ 461 (n=4) for control mice, 937.6 $\pm$ 235 (n=5) for Losartan 15mg/kg and 594.6 $\pm$ 133 (n=5) for Losartan 3mg/kg. In the periarticular tissue, the relative number of neutrophils decreased from 0.67 $\pm$ 0.06 (n=4) in control mice to 0.33 $\pm$ 0.05 (n=4) in Losartan 3mg/kg. In addition, Losartan 10mg/kg induced a decrease in the levels of TNF- $\alpha$  as compared with control mice: 129.03 $\pm$ 2.7 (n=3) and 96.88 $\pm$ 37.1 (n=5), respectively. KC levels were not change when compared to control mice. **Discussion:** The blocker of AT1 receptor showed an anti-inflammatory effect in an experimental model of rheumatoid arthritis. Losartan anti-inflammatory effect could be useful in future therapeutic approaches. **Supported by:** CAPES

08.007

## INFLUÊNCIA DO ÓXIDO NÍTRICO NA ADESÃO *IN VITRO* À FIBRONECTINA DE EOSINÓFILOS DA MEDULA ÓSSEA E DO PULMÃO DE CAMUNDONGOS ALÉRGICOS

Pontes, R. F.<sup>1</sup>; Guimarães, L. A. F.<sup>1</sup>; Benetti, L. R.<sup>1</sup>; Leal, A. B.<sup>1</sup>; Ferreira, H. H. A.<sup>1</sup> -  
<sup>1</sup>USF - Pesquisa em Inflamação

O objetivo deste trabalho foi estudar a influência do NO na adesão *in vitro* à fibronectina dos eosinófilos (EOs) da medula óssea (MO) e do lavado broncoalveolar (LBA) de camundongos alérgicos e no conteúdo de EOs nestes dois compartimentos. Camundongos Balb/c machos, 6 a 8 semanas, foram sensibilizados nos dias 0 e 7 com OVA (100 mg), sc, e no dia 14 receberam o desafio com OVA in (10 mg; 2 x/dia). 2h antes e 4 e 12h após o desafio, os animais foram tratados com inibidores não seletivos das NOS, o L-NAME (10mg/Kg) ou seletivo para iNOS, o 1400W (1,0mg/Kg), via ip. Alguns camundongos não foram tratados com os inibidores (controles) e outros receberam somente salina intranasal em vez do desafio com OVA (falsamente desafiados). A MO foi retirada do fêmur utilizando-se fluxo de PBS. Para a adesão *in vitro* placas foram recobertas com fibronectina e o número de EOs aderidos foi calculado medindo-se a atividade residual da peroxidase eosinofílica (EPO). As contagens de EOs na MO e no LBA estão expressos em número absoluto ( $\times 10^5$  células/ml). O desafio com OVA provocou aumento significativo no número de EOs na MO dos animais controles alérgicos no período de 24h após o desafio ( $4,5 \pm 0,6$ ) quando comparado com o grupo falsamente desafiado ( $2,3 \pm 0,1$ ). Uma redução deste conteúdo foi observada entre 48 e 72h ( $2,8 \pm 0,2$ ;  $2,9 \pm 0,7$ , respectivamente). Comparado a estes resultados, nenhuma diferença significativa foi verificado no número de EOs da MO dos animais tratados com L-NAME ( $5,2 \pm 0,4$ ;  $3,7 \pm 0,3$ ;  $5,2 \pm 0,07$  para 24, 48 e 72h, respectivamente), ou 1400W ( $5,3 \pm 1,0$ ;  $2,8 \pm 0,5$ ;  $2,9 \pm 0,4$  para 24, 48 e 72h, respectivamente). O influxo de EOs para o pulmão dos controles iniciou-se em 24h ( $1,02 \pm 0,1$ ) atingindo seu pico em 48h ( $4,7 \pm 0,7$ ), sendo que em 72h o conteúdo desta célula já se encontrava diminuído ( $4,0 \pm 0,6$ ). O tratamento com L-NAME e 1400W provocou uma redução significativa no número de EOs no LBA em 48h ( $2,35 \pm 0,7$ ;  $1,4 \pm 0,3$ , respectivamente). Foi observada uma correlação entre a diminuição do número de EOs na MO e o aumento no LBA dos controles em 48h. O mesmo não foi verificado nos animais tratados com os inibidores. A adesão *in vitro* à fibronectina foi feita utilizando-se os EOs da MO e do LBA destes mesmos grupos de camundongos. Verificou-se que em 48 e 72h a adesão dos EOs da MO dos controles estava aumentada em aproximadamente 140% comparado com os valores observados em 24h. Ao contrário, quando os animais foram tratados com os inibidores um aumento de 150% foi observado na adesão em 24h, em relação aos demais períodos. Um declínio da adesão foi observado a partir de 24h, sendo que em 72h não existiu mais diferenças entre os valores dos grupos tratados e controle. Com relação à adesão dos EOs do LBA destes animais, não foram verificadas diferenças inter- ou intra-grupos nos diferentes períodos. Nossos resultados sugerem que o tratamento com os inibidores provocou um aumento de adesão e, conseqüentemente, uma diminuição da emigração dos EOs da MO. Este fato pode refletir na redução do conteúdo de EOs verificado em 48h no LBA dos animais tratados com os inibidores da síntese de NO. Podemos também sugerir que o NO modula a adesão dos EOs da MO, não tendo influência sobre estas células no LBA, indicando uma ação específica sobre a(s) molécula(s) de adesão expressa(s) pelos EOs nos diferentes compartimentos.

**Apoio Financeiro:** FAPESP

08.008

**EVALUATING THE IMMUNOMODULATORY POTENTIAL OF THE LIDOCAINE DERIVATIVE JMF2-1 IN A MURINE MODEL OF ASTHMA**

Olsen, P. C.<sup>1</sup>; Serra, M. F.<sup>1</sup>; Costa, J. C. S.<sup>2</sup>; Fonseca, B.<sup>3</sup>; Viola, J. P. B.<sup>3</sup>; Cordeiro, R. S. B.<sup>1</sup>; Silva, P. M. R. e<sup>1</sup>; Martins, M. A.<sup>1</sup> - <sup>1</sup>FIOCRUZ - IOC - Fisiologia e Farmacodinâmica; <sup>2</sup>FIOCRUZ - IOC - Far-Manguinhos; <sup>3</sup>INCA - Biologia Celular

**Introduction:** Our previous study showed that nebulized JMF2-1 might be a way of achieving the anti-asthmatic effects of lidocaine without the anesthetic activity. Since the mode of action of JMF2-1 is still unclear, we examined here the putative immunoregulatory effect of this lidocaine derivative in comparison to dexamethasone and lidocaine itself.

**Methods:** Ovalbumin-sensitized BALB/c mice were daily nebulized with ovalbumin and treated concomitantly and eight hours post-challenge, from day 19 to 21 post-sensitization, all analyses were performed 24 h after the last challenge.

**Results:** We found that both lidocaine and JMF2-1 inhalation (0.5-2%, w/v) abolished crucial features of asthma including blood and lung eosinophilia and bronchial hyperresponsiveness in mice. Treatments with inhaled lidocaine or JMF2-1 (2%), as well as i.p. dexamethasone (1 mg/kg), abolished IL-4, IL-5 and IL-13 secretion by cultures of lung explants obtained from mice sensitized and challenged with ovalbumin. Following a second challenge, now *in vitro*, IL-5 and IL-13 production were inhibited when the explants were from dexamethasone- but not lidocaine- or JMF2-1- treated donors. Ovalbumin-evoked cytokine production and proliferation of lymph node cells, from DO11.10 TCR transgenic mice, were inhibited by both JMF2-1 (99%,  $P<0,01$ ) and lidocaine (70%,  $P<0,05$ ) applied *in vitro* at 600  $\mu$ M. Moreover, JMF2-1 and lidocaine induced apoptosis of these T cells *in vitro*. In all parameters assessed *in vitro* JMF2-1 appeared more potent than lidocaine.

**Discussion:** These results show that inhalation of JMF2-1 prevents cardinal features of asthma, probably by reducing  $T_H2$  cytokine generation via inhibition of T cell function and survival. JMF2-1 should be considered as a new prototype in drug discovery for asthma with advantages over local anesthetics.

**Supported by:** CNPq, FAPERJ, PDTIS



08.009

### **FIBROBLASTOS GENGIVAIS ESTIMULADOS POR FLUORETO DE SÓDIO EXPRESSAM METALOPROTEINASE 9 E PRODUZEM CCL3**

Tiano, G. C.<sup>1</sup>; Oliveira, S. H. P.<sup>2</sup> - <sup>1</sup>UNESP - FO - Araçatuba - Odontologia Infantil e Social; <sup>2</sup>UNESP - FO - Araçatuba - Ciências Básicas

**Introdução:** O declínio mundial da cárie dentária é atribuído ao uso abrangente e indiscriminado do flúor, que além de proteger os dentes pode ter uma ação citotóxica ocasionando uma inibição do crescimento celular, da síntese de proteínas e de DNA. O objetivo do estudo foi avaliar o efeito do fluoreto de sódio (NaF) sobre a ativação de fibroblastos gengivais (Fg) para expressão de metaloproteinase 9 (MMP-9) e a produção de proteína inflamatória derivada de macrófagos (CCL3), bem como a atividade citotóxica do NaF sobre essas células. **Métodos:** Para a obtenção dos Fg, fragmentos gengivais foram extraídos de camundongos normais e mantidos em cultura a 37°C em 5% de CO<sub>2</sub> até atingirem confluência. Após a 3ª passagem, os Fg foram plaqueados e estimulados por NaF nas concentrações de 1, 5, 10 e 20 µg F/mL e avaliados nos tempos de 1, 6 e 24 horas. Para tanto, os sobrenadantes e as células foram coletados para os ensaios de ELISA e RT-PCR respectivamente. Para a citotoxicidade, os Fg foram plaqueados e estimulados pelo NaF nas concentrações de 1, 5, 10, 20 e 40 µg F/mL e avaliados após 6, 24 e 48 horas. Posteriormente a cada período, MTT foi adicionado às células e 4 horas depois foi realizada a leitura de fluorescência por meio do espectrofotômetro. **Resultados:** Os Fg estimulados com 20 µg F/mL expressaram MMP-9 e produziram CCL3, de forma significativa, 6 horas após o estímulo. A atividade citotóxica do NaF também foi observada depois de 6 horas na concentração de 40 µg F/mL (p<0,05), sendo constatada sobrevida celular de 68,9% em relação ao grupo controle. O pico máximo de citotoxicidade foi observado no tempo de 24 horas com 40 µg F/mL (p<0,001), apresentando sobrevida de 37,4%. **Discussão:** O NaF foi capaz de induzir a expressão de MMP-9 e produção de CCL3 nos fibroblastos gengivais. Esses resultados sugerem que o NaF é capaz de ativar os Fg a produzir proteína degenerativa da matriz e quimiocina, mediadores envolvidos na resposta imune, visto que, tanto as MMP-9 quanto a CCL3 podem alterar eventos durante o processo inflamatório. O efeito citotóxico do NaF sobre os fibroblastos depende da concentração e do tempo de exposição.

**Apoio Financeiro:** FAPESP, CNPq

**08.010**

**AVALIAÇÃO DAS RESPOSTAS IMUNE HUMORAL E DE HIPERSENSIBILIDADE TARDIA EM CAMUNDONGOS TRATADOS COM MIDAZOLAM**

Augusto, M. B.<sup>1</sup>; Araujo, E. F.<sup>1</sup>; Carvalho, C. O.<sup>1</sup>; Pinto, F. G.<sup>1</sup> - <sup>1</sup>UFSCAR - Morfologia e Patologia

Os ansiolíticos como os benzodiazepínicos (BDZ) passaram a ser vastamente usados a partir da década de 1970, prescritos para aliviar sintomas como ansiedade, no uso como pré-anestésico em hospitais. A ação dos BZDs ocorre sobre dois tipos principais de receptores, os centrais (GABA<sub>A</sub>) atuando no SNC e os periféricos (RBP) encontrados em diversos tecidos e células do organismo. Pesquisas têm relacionado o uso dos benzodiazepínicos (diazepam, clonazepam e midazolam) a imunidade humana, pela grande interação desta substância às células do sistema imune. O objetivo do trabalho é avaliar a influência do midazolam na resposta imune humoral e celular em camundongos, após sua sensibilização com hemácias de carneiro. Foram utilizados 69 camundongos Swiss fêmeas sensibilizados nos dias 0 e 10 (primeira dose e reforço) com hemácias de carneiro (0,1 ml contendo  $6,0 \times 10^8$  hemácias) via intraperitoneal (i.p.) e tratados com midazolam nas doses de 1 mg / kg (TS 1) ou 3 mg / kg (TS 3) via i.p. em dias alternados, completando um total de 10 aplicações, com início 48 horas antes do início da sensibilização. Animais sensibilizados e não tratados (NTS) ou tratados (3 mg / kg) e não sensibilizados (TNS) foram utilizados como grupos controle. Os animais foram sacrificados no 23<sup>o</sup> dia para obtenção do soro, utilizado para detecção de anticorpos específicos por meio da prova de hemaglutinação passiva em microplacas. Paralelamente 45 camundongos, fêmeas e representando os mesmos grupos experimentais, foram submetidos ao teste do coxim plantar para determinação da intensidade da resposta de hipersensibilidade tardia (HTT). O teste consistiu de sensibilizações prévias (dias 0 e 10), seguidas por aplicação, após 20 dias, de 30 µl de hemácias no coxim plantar esquerdo de cada animal. O volume do coxim plantar foi determinado previamente à inoculação e nos tempos de 3, 6, 12, 24, 48 e 72 horas após o desafio, com o uso de paquímetro digital. Os resultados foram analisados pelo teste não paramétrico Kruskal Wallis e complementado pelo teste de Dunn para comparações múltiplas entre os diferentes grupos experimentais ( $p < 0,05$ ) na avaliação da resposta humoral e, na HTT, os resultados foram analisados pelo teste paramétrico ANOVA e para comparações complementares, foi utilizado o teste de Turkey-Kramer ( $q > 4,076$  e  $P < 0,05$ ). Os valores foram expressos em variação das médias dos intervalos de tempo nos diferentes grupos. Todos os resultados foram representados como média ± desvio padrão e analisados estatisticamente. Não foi observada diferença estatística ( $p > 0,05$ ) entre os títulos médios de anticorpos dos grupos sensibilizados e não tratados (NTS=762±218) quando comparados aos animais sensibilizados tratados com 1 mg / kg (TS 1=407±110) ou 3 mg / kg de midazolam (TS 3=416;±118). Também não houve diferença estatística entre as porcentagens médias de aumento de volume do coxim plantar dos diferentes grupos (NTS=0,33±0,1; TS 1 =0,515±0,162 e TS 3=0,508±0,163). Portanto, embora não se exclua a possibilidade de que o midazolam possa influenciar nas respostas imunes, os resultados aqui obtidos sugerem um baixo potencial imunomodulador do fármaco nas doses em estudo.

08.011

**MODULATION OF MOUSE LUNG INFLAMMATORY RESPONSE BY L-998, A COMPOUND DESIGNED AS INHIBITOR OF P38 MAP KINASE.**

Brando Lima, A. C.<sup>1</sup>; Simon, P.<sup>1</sup>; Lima, L. M.<sup>2</sup>; Barreiro, E. J.<sup>1</sup>; Koatz, V. L. G.<sup>1</sup> - <sup>1</sup>UFRJ - Bioquímica Médica; <sup>2</sup>UFRJ - FM - LASSBio

**Aim:** The p38, Mitogen Activated Protein (MAP) kinase has a key role in signaling during the inflammatory response and the blockage of inflammatory cytokine production has been associated to inhibition of p38. In this work, we investigated the effect of treatment with a ureidic heterocyclic compound designed as a p38 inhibitor on lung inflammation induced in mice. **Methods:** BALB/C mice (male  $\pm$  25g) were treated orally with vehicle (carboxymethylcellulose, 0,5%) or with 200 mg/kg LASSBio 998 (L-998) 4 h before the inhalation of lipopolysaccharide aerosol (LPS - 0,5 mg/mL, in a final volume of 2 mL) of Gram-negative bacteria or intranasal instillation of tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$  - 0,5  $\mu$ g/mouse). Three hours after the inflammatory stimulus, the bronchoalveolar lavage fluids (BALF) were performed, the total and differential cellular counts evaluated, and the supernatants used for cytokine assay by ELISA. In parallel, the phosphorylated MAPK p38 levels in lung tissue were evaluated by western blotting and NF $\kappa$ B activation was analyzed by electrophoretic mobility shift assay (EMSA). The *in vitro* effect of L-998 was also demonstrated. For this, TNF- $\alpha$  production was investigated on peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and naïve murine alveolar macrophages stimulated with LPS (2  $\mu$ g/ml for 2h). **Results:** The treatment of mice with L-998 inhibited 60% of neutrophil influx (Saline:  $0 \pm 0$ ; LPS:  $250 \pm 30$ ; L-998:  $100 \pm 10 \times 10^3$  cels /mL  $p < 0.05$ ), 55% of IL-1  $\beta$  production (Saline:  $100 \pm 20$ ; LPS:  $2515 \pm 30$ ; L-998:  $1195 \pm 110$  pg/mL  $p < 0.05$ ) and 25% of TNF- $\alpha$  levels (Saline:  $300 \pm 41$ ; LPS:  $1100 \pm 70$ ; L-998:  $1700 \pm 20$  pg/mL  $p < 0.05$ ) after inhalation of LPS, but did not have effect on KC (Saline:  $400 \pm 120$ ; LPS:  $2650 \pm 250$ ; L-998:  $2752 \pm 500$  pg/mL) and MCP-1 (Saline:  $200 \pm 20$ ; LPS:  $1100 \pm 80$ ; L-998:  $1300 \pm 60$  pg/mL) production. It was also observed a reduction in 89% of neutrophil influx when the lung inflammation was induced by instillation of TNF- $\alpha$  (Saline:  $10 \pm 0,5$ ; TNF- $\alpha$ :  $57 \pm 16$ ; L-998:  $5,5 \pm 2 \times 10^3$  cels /mL  $p < 0.05$ ). Therefore, L-998 substantially suppressed LPS-induced rises in MAPK p38 phosphorylation and also blocked LPS-induced NF $\kappa$ B activation in a dose dependent manner. The results *in vitro* demonstrated that the addition of 100  $\mu$ M of L-998 to the culture medium inhibited 77% of TNF- $\alpha$  production by PBMC and 53% by alveolar macrophages. Results are expressed as means  $\pm$  S.E.M. and values of  $P < 0.05$  were considered statistically significant. **Conclusion:** The data suggest the compound L-998 as a potential new lead compound to be further investigated as an anti-inflammatory drug.

**Supported by:** CNPq, FAPERJ, CAPES, FUJB.

08.012

**INDOMETHACIN PARTIALLY INHIBITS THE INFLAMMATORY HYPORESPONSIVENESS OF GERM FREE-MICE**

Fagundes, C. T.<sup>1</sup>; Amaral, F. A.<sup>1</sup>; Vieria, L. Q.<sup>2</sup>; Nicoli, J. R.<sup>3</sup>; Teixeira, M. M.<sup>2</sup>; Souza, D. da G. de<sup>3</sup> - <sup>1</sup>UFMG - Bioquímica e Imunologia / Microbiologia; <sup>2</sup>UFMG - Bioquímica e Imunologia; <sup>3</sup>UFMG - Microbiologia

Introduction: Germ free (GF) mice presents an inflammatory hyporesponsiveness after an inflammatory stimuli, (of infectious origin or not) when compared to conventional (CV) mice. This phenotype is strongly associated to its ability to produce higher levels of IL-10. The aim of this work was to verify if prostanoids participate in the elevated IL-10 production and, consequently, inflammatory hyporesponsiveness of GF mice. Methods: CV and GF mice were subjected to Superior Mesenteric Artery ischemia (60min) and reperfusion (40 min) and, then, euthanized. Treatments (Vehicle or Indomethacin – 2 mg/Kg) were made 10 min prior reperfusion by i.v. injection. After sacrifice, the following parameters were evaluated in the intestine and lungs: vascular leakage, assessed by Evans Blue extravasation; Haemorrhage, by haemoglobin concentration; Neutrophil influx, assessed by Myeloperoxidase (MPO) activity assay; Cytokine production (also in serum), assessed by ELISA. Results and Discussion: After intestinal ischemia and reperfusion (IRI), GF mice did not present exacerbated inflammatory response (that is: absent vascular leakage, reduction in neutrophil influx to tissues and in haemoglobin concentration in intestine) or lethality. This was related to reduced TNF- $\alpha$  and elevated IL-10 production in intestine and lungs. However, indomethacin treatment resulted in an inflammatory response that resembled the response observed in CV mice submitted to IRI. Notoriously, after indomethacin treatment, there were increase in TNF- $\alpha$  production and inhibition in IL-10 liberation in intestine and lungs of IRI-submitted mice, which resulted in increased inflammatory response. However, indomethacin treatment did not change the inflammatory response of CV mice submitted to IRI, suggesting a lack of function for prostanoids in the IRI-induced inflammatory response, when microbiota is present. Thus, we suggest that prostanoids participate in the hyporesponsive phenotype of GF during IRI. This is likely associated to the stimulation of IL-10 production. **Supported by:** CNPq and FAPEMIG

08.013

**ROLE OF PI3K-GAMMA IN MEDIATING DISEASE IN AN EXPERIMENTAL MODEL OF DENGUE-2 INFECTION**

Souza, P. R. S.<sup>1</sup>; Souza, R. S.<sup>1</sup>; Fagundes, C. T.<sup>1</sup>; Amaral, F. A.<sup>1</sup>; Sousa, L. P.<sup>1</sup>; Zirke, C.<sup>1</sup>; Cisalpino, D.<sup>1</sup>; Teixeira, M. M.<sup>1</sup>; Souza, D. da G. de<sup>1</sup> - <sup>1</sup>UFMG - Bioquímica e Imunologia

**Introduction:** Dengue is a mosquito-borne infection which in recent years has become a major international public health concern. Approximately 2.5 billion people are at risk worldwide. The phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) pathway regulates various cellular processes. The gamma isoform plays an important role in mediating leukocyte activation and migration. In the present study, we evaluated the role of PI3K-gamma in an experimental model of Dengue virus 2 (Den-2) infection in mice. **Methods:** Wild-type (WT) and PI3K gamma deficient (PI3K $\gamma^{-/-}$ ) mice were infected with Den-2 ( $10^3$  LD50) and sacrificed 3, 5 or 7 days after inoculation to evaluate cytokine production, hematocrit and platelet number. Lethality was assessed till day 14. **Results:** Mice inoculated with Den-2 presented an inoculum-dependent hemoconcentration, thrombocytopenia, increase in systemic cytokine levels and lethality. In PI3K $\gamma^{-/-}$  mice, there was a 50% reduction of lethality when compared with WT infected mice. PI3K $\gamma^{-/-}$  mice were protected from the virus-induced thrombocytopenia and hemoconcentration at days 3, 5 and 7 after infection. Furthermore, levels of TNF- $\alpha$  were significantly lower in PI3K $\gamma^{-/-}$  than in WT mice. **Discussion:** We observed a lower inflammatory response and an improvement of clinical outcome PI3K $\gamma^{-/-}$  mice infected with Den-2. These data suggest that an inhibitor of PI3K could be used for the treatment of severe Dengue infection. **Supported by:** FAPEMIG, CNPq

08.014

**EFFECTS OF DSS (DEXTRAN SULFATE SODIUM)- INDUCED EXPERIMENTAL COLITIS ON GATA - 1 DEFICIENT MICE: A MAJOR ROLE FOR EOSINOPHILS IN THE PATHOGENESIS OF COLITIS**

Thomaz Vieira, A.<sup>1</sup>; Sousa, L. P.<sup>1</sup>; Guabiraba, R.<sup>1</sup>; Silveira, K.<sup>1</sup>; Negro-Correa, D. A.<sup>2</sup>; Arantes, R. M. E.<sup>3</sup>; Teixeira, M. M.<sup>1</sup> - <sup>1</sup>UFMG - Bioquímica e Imunologia; <sup>2</sup>UFMG - Parasitologia; <sup>3</sup>UFMG - Patologia Geral

**Introduction and Objectives:** GATA-1 transcription factor plays a crucial role in the development of eosinophils. Mice deficient in this factor fails to produce this cell type. Importantly, several inflammatory processes in the bowel are characterized by an accumulation of eosinophils at sites of inflammation, increasing the severity of this event. Thus, we decided to investigate how GATA-1 deficient (GATA-1<sup>-/-</sup>) mice responds in DSS - induced colitis. **Methods and Results:** Colitis was induced by Dextran Sulfate Sodium – DSS. GATA-1<sup>-/-</sup> or Wild type mice (WT) received DSS 4% (wt/vol) in water, *ad libitum*, for 7 days and, after this timepoint, lethality was evaluated. Clinical score (diarrhea and occult bleeding in feces) and weight loss were monitored at every 2 days. WT mice died after DSS-induced Colitis has been installed (100% of mortality), while GATA-1<sup>-/-</sup> mice did not. The severity of disease, as evaluated by the clinical score, was lower in GATA-1<sup>-/-</sup> mice than in WT mice. At the end of DSS treatment, a loss of about 10% of the initial weight were observed in GATA-1<sup>-/-</sup> mice, while in WT mice the loss was about 25 %. At day 7, mice were sacrificed and colon samples were excised to determine: levels of cytokines / chemokines through ELISA, histological analysis and quantitative determination of neutrophils and eosinophils (through MPO and EPO activity assay, respectively). Eotaxin (CCL11) and KC (CXCL1) chemokines were increased in WT mice, compared to controls (P<0.01). However, these chemokines showed no significant differences in GATA-1<sup>-/-</sup> with colitis and controls. JE (CCL2) levels were increased in both diseased groups, when compared to control mice (P<0.05). IL-6 levels were increased in GATA-1<sup>-/-</sup> mice that developed colitis, compared to GATA-1<sup>-/-</sup> control mice (P<0.05). Furthermore, eosinophil accumulation were higher in WT mice with colitis, but not in GATA-1<sup>-/-</sup> mice (P<0.01); and neutrophil accumulation was significantly increased in both groups with colitis (P<0.05). Of note, control animals received water and all these parameters remained unchanged. **Conclusion:** GATA-1 deficient mice are less susceptible to the effects of DSS-induced colitis than wild type mice, strengthening the idea of a major role for eosinophils in the immunopathogenesis of colitis. Moreover, compounds targeting GATA-1 transcription factor may be a useful pharmacological strategy for the treatment of colitis. **Supported by:** CNPq, FAPEMIG, CAPES

08.015

## LOCAL PERFUSION OF CORTICOSTERONE AMPLIFIES NOCTURNAL MELATONIN SURGE IN RAT PINEAL GLAND

Fernandes, P. A. C. M.<sup>1</sup>; Bothorel, B.<sup>2</sup>; Simonneaux, V.<sup>2</sup>; Markus, R. P.<sup>1</sup> - <sup>1</sup>IB - USP - Fisiologia; <sup>2</sup>ULP - Neurobiologie des Rythmes

**Introduction:** Physiological and psychological stresses trigger a series of reactions, which involves coordinate activities of the endocrine, neural and immune system. We have shown that in chronic inflamed animals the adrenal-pineal interaction is essential for maintaining the nocturnal plasma melatonin (MEL) rise (Lopes C, *Inflammation Res.* 50: 6, 2001), and that the synthesis of MEL by cultured pineal glands can be potentiated by corticosterone (Ferreira ZS, Jr. *Pineal Res.* 38(3):182, 2005). Adrenal hormone activates glucocorticoid receptors and enhances the noradrenaline (NA)-induced arylalkylamine-N-acetyltransferase (AA-NAT) mRNA transcription. Here we tested whether corticosterone (CORT) applied direct on pineal gland enhances nocturnal MEL peak *in vivo*, as well as, its effect on the activity of the enzymes involved in MEL biosynthesis. **Methods:** CORT effect on rat pineal MEL output was followed by trans-pineal microdialysis technique. Wistar male rats (12h/12h light/dark cycle), 5 days after probe implantation, were perfused with balanced saline solution in the first day (D1) and with CORT (6 mg/ml, 3 ml/min) at days 2 (D2) and 3 (D3). MEL concentration in the perfusate was determined by RIA and the values were normalized for MEL peak at D1. CORT effect on AA-NAT and hydroxyindol-O-metiltransferase (HIOMT) activity was accessed in glands incubated for 19 h in the presence or absence of CORT (1 or 10mM), followed by a 5-h incubation with NA (10nM) or vehicle, still in the presence of CORT. **Results:** CORT significantly enhanced the nocturnal pineal melatonin peak (D1= 83.80%±12.01; D2 = 186.42%±22.04; D3= 229.88%±40.43, n=6; p<0.05) without changing the phase. The NA-induced activity of both enzymes (AA-NAT 302±35 pM/pineal/h and HIOMT 22,0±0,4 pM/pineal/h, n=10) involved in MEL biosynthesis was significantly (p < 0.05) increased by CORT. However, the maximal CORT effect was attained with 1 and 10 µM for AA-NAT and HIOMT, respectively. **Discussion:** Here we show for the first time that CORT, in a concentration compatible to that found in plasma of inflamed animals, amplifies the nocturnal surge of MEL in the pineal gland *in vivo*. Moreover, CORT has no effect “per se”, but in the presence of NA it enhances the increase of the activity of the enzymes responsible for melatonin synthesis. Taking into account that melatonin synthesis is blocked by pro-inflammatory cytokines (Fernandes PACM, J. *Pineal Res.* 41:344, 2006)the present data strongly suggest that the rise in plasma corticosterone is necessary for the recovery of the circadian timing signal after physiological or psychological stresses. **Supported by:** CAPES-COFECUB/ FAPESP/ CNPq

08.016

**RECOMBINANT HUMAN INTERFERON  $\alpha$ -2A: BIOLOGICAL AND  
PHYSICOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF PHARMACEUTICAL  
FORMULATIONS**

Silva, L. M.<sup>1</sup>; Souto, R. B.<sup>1</sup>; Todeschini, V.<sup>1</sup>; Leal, D. P.<sup>1</sup>; Bergamo, A. C.<sup>1</sup>; Dalmora, S. L.<sup>1</sup> - <sup>1</sup>UFMS - Farmácia Industrial

**Introduction:** The interferon  $\alpha$ -2a is a cytokine with antiviral, antiproliferative and immunomodulatory properties. The recombinant human interferon  $\alpha$ -2a (rhIFN  $\alpha$ -2a) consists of a 165-166 amino acids with two disulphide bonds, and molecular mass of 19.5 kDa. Therapeutically, is indicated for the treatment of hepatitis B and C, leukemias and lymphomas. Due to its complex molecular structure the combination of methods is necessary for the identification and characterization of the biomolecule. The aim of this study was to carry out physicochemical, immunological and biological identification and characterization of pharmaceutical formulations. **Methods:** Purity and molecular weight were assessed using polyacrylamide electrophoresis (SDS-PAGE) with protein staining or immunoblotting for detection with a specific anti-rhIFN  $\alpha$ -2a antibody. The specific antiviral activity was evaluated by the cytopathic effect bioassay using the human amniotic cell line (WISH) and the vesicular stomatitis virus (VSV). The LC method was carried out on a Jupiter C<sub>4</sub> column (250 x 4.6mm ID), operated at controlled ambient temperature (25°C). The mobile phase A consisted of 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) in water and mobile phase B 0.1% TFA in acetonitrile. The gradient elution was performed at a flow rate of 1mL/min and UV detection at 214 nm. The method validation investigated parameters recommend for analytical methods. **Results and Discussion:** The non-reducing SDS-PAGE revealed a single band with a molecular weight of approximately 19.5 kDa. The calibration curves of the RP-LC method were found to be linear in the concentration range of 1-50 mUI/mL ( $r^2= 0.9989$ ). The limits of quantitation and detection were 1 and 0.5 mUI/mL, respectively. The accuracy was 100.62% with RSD of 1.31%. Moreover, method validation demonstrated acceptable results for the precision, sensitivity, specificity and robustness, without any interference from the excipients. Pharmaceutical batches of rhIFN  $\alpha$ -2a were analysed by the validated method and the biological assay giving potencies between 92.56% and 108.93% of the stated potency, with significant correlation ( $p>0.05$ ) of the results. The RP-LC method can be used in combination with the bioassay contributing to improve the potency evaluation, and also as an alternative for the quality control of the medicinal products assuring the therapeutic efficacy. **Supported by:** CNPq



08.017

## ESTUDO DA ESPECIFICIDADE DOS EFEITOS AGUDOS DA MORFINA, VIA RECEPTOR OPIÓIDE, SOBRE A ATIVIDADE DE NEUTRÓFILOS SANGÜÍNEOS DE CAMUNDONGOS

Rodrigues-Costa, E. C.<sup>1</sup>; Stankevicius, D.<sup>1</sup>; Portela, C. P.<sup>2</sup>; Palermo-Neto, J.<sup>2</sup>; Felício, L. F.<sup>2</sup> - <sup>1</sup>ICB - USP - Farmacologia; <sup>2</sup>FMVZ - USP - Patologia Veterinária

**Introdução:** É de amplo conhecimento na literatura que peptídeos opióides endógenos e compostos opióides exógenos, como a morfina, afetam as imunidades natural e adaptativa de humanos e animais de experimentação. Neste sentido, o presente estudo visou caracterizar os possíveis efeitos da morfina sobre a fagocitose e o "burst" oxidativo realizados por neutrófilos sangüíneos, via receptor opióide.

**Métodos:** Quarenta camundongos com 8-12 semanas de idade e pesando de 20-35g foram divididos ao acaso, em quatro grupos iguais: SS, SM, NS e NM. Os animais dos grupos SS e SM foram pré-tratados com 10ml/kg (s.c) de salina a 0,9% ( $t_0$  e  $t_{90}$ )<sub>min</sub> e, desafiados em ( $t_{30}$ )<sub>min</sub>, respectivamente, com 10ml/kg (s.c) de salina e 20mg/kg (s.c) de morfina. Em paralelo, os animais dos grupos NS e NM foram pré-tratados com 1mg/kg (s.c) de naloxone, um antagonista competitivo não seletivo para receptores opióides, ( $t_0$  e  $t_{90}$ )<sub>min</sub> e, desafiados em ( $t_{30}$ )<sub>min</sub>, respectivamente, com 10ml/kg (s.c) de salina e 20mg/kg (s.c) de morfina. Uma hora após a última injeção ( $t_{150}$ )<sub>min</sub>, fez-se a coleta de sangue total destes animais, em tubos para microcentrifuga contendo 10µl de heparina. A geração do "burst" oxidativo foi medida pela oxidação do DCFH-DA (2,7-diclorofluoresceína diacetato) pelo peróxido de hidrogênio, produzido pelo fagócito. Adicionalmente, foram utilizados nesta análise dois diferentes estímulos, a saber: o PMA (forbol miristato acetato) e o *S. aureus*, bactéria Gram positiva, marcado com o fluorocromo iodeto de propídeo. Assim, para cada animal incubou-se em banho-maria, a 37° C, durante 30min, 100µl de sangue/tubo, com os seguintes reagentes: Tubo A (800µl de PBS + 200µl de DCFH); Tubo B (700µl de PBS + 200µl de DCFH + 100µl de PMA); Tubo C (700µl de PBS + 200µl de DCFH + 100µl de *S. aureus*) e no Tubo D (900µl de PBS + 100µl de *S. aureus*). Ao final do tempo de incubação, as amostras foram centrifugadas (10 min a 1200rpm) e lisadas com solução salina a 0,2% (20s) para a remoção das hemácias e, na seqüência, restaurou-se a isotonicidade das mesmas com salina a 1,6%. Por fim, as amostras foram ressuspensas em 500µl de PBS e submetidas à aquisição dos dados, utilizando-se um citômetro de fluxo.

**Resultados:** Da análise estatística dos dados, verificou-se que o tratamento agudo dos animais com morfina reduziu o "burst" oxidativo induzido pela fagocitose do *S. aureus*, realizada pelos neutrófilos sangüíneos: DCH+SAPI (SM=131,7± 9,3 x SS=180,7± 13,4; P<0,05) sendo este efeito, revertido pelo naloxone DCFH+SAPI (NM=175,9 ± 8,0 x SM=53,5 ± 3,5; P<0,05). Já o tratamento dos animais com naloxone, "per se", reduziu tanto o "burst" oxidativo espontâneo DCFH (NS=19,8 ± 1,0 x SS=34,2 ± 2,8; P<0,05) como a intensidade de fagocitose do *S. aureus*, realizados pelos neutrófilos sangüíneos.

**Discussão:** Os resultados sugerem que a dose de 20mg/kg de morfina reduz o "burst" oxidativo induzido pela fagocitose do *S. aureus*, e este efeito é revertido pela administração de 1mg/kg do antagonista para receptor opióide, naloxone. O antagonista, "per se", reduz o "burst" oxidativo espontâneo, bem como o número médio de bactérias englobadas pelo fagócito.

**Apoio Financeiro:** CNPq e FAPESP

08.018

### CORRELAÇÕES NEUROIMUNOLÓGICAS DOS EFEITOS DA 3,4 METILENODIOXIMETANFETAMINA (MDMA, ECSTASY) SOBRE A ATIVIDADE DE NEUTRÓFILOS AVALIADOS POR CITOMETRIA DE FLUXO

Ferraz de Paula, V.<sup>1</sup>; Ribeiro, A.<sup>1</sup>; Pinheiro, M. L.<sup>1</sup>; Sakai, M.<sup>2</sup>; Moreau, R. L. M.<sup>3</sup>; Palermo-Neto, J.<sup>1</sup> - <sup>1</sup>FMVZ - USP - Patologia; <sup>2</sup>FMVZ - USP - VPT; <sup>3</sup>FCF - USP - Análises Clínicas e Toxicológicas

**Introdução:** O MDMA é uma anfetamina alucinógena amplamente utilizada por jovens adultos como droga de abuso. Esta droga altera diversos parâmetros na esfera imunológica, tanto inata como adquirida; entretanto, pouco se sabe a respeito dos mecanismos pelos quais o MDMA induz essas alterações. O presente trabalho avaliou os efeitos do MDMA sobre a atividade de neutrófilos, buscando por correlações neuroimunológicas. **Métodos:** Foram utilizados camundongos Balb/C machos. No 1º. experimento (EXP 1), 40 animais foram divididos em 4 grupos: Controle (C) tratados com salina 0.9% e Experimentais tratados com MDMA 10.0 mg/kg, via i.p. O sangue foi coletado após 30 min. (T1), 60 min. (T2) e 24 horas (T3) e (C), para avaliação da atividade de neutrófilos por citometria de fluxo. No 2º experimento (EXP 2), 20 animais foram divididos em 2 grupos: Controle (C) tratados com salina 0,9% e Experimental (E) tratados com MDMA 10,0 mg/kg, via i.p. Após 60 min os animais foram submetidos à eutanásia, sendo deles retirados o hipotálamo, para dosagem de noradrenalina e seu metabólito, o ácido vanililmandélico (VMA) por meio de HPLC-ED; e o sangue para dosagem dos níveis séricos de corticosterona por meio de radioimunoensaio.

**Resultados:** As tabelas a seguir ilustram os resultados obtidos.

EXP 1	GRUPOS			
Parâmetros <sup>A</sup>	C	T1	T2	T3
BB	27.0±6.9	33.0±9.6	28.8±5.8	24.1±8.7
BI SAPI	243.8±116.8	160.5±51.1 <sup>f</sup>	158.9±44.5 <sup>f</sup>	261.0±124.1
BI PMA	69.9±31.0	64.4±37.4	27.6±7.0*	71.5±32.8
%FAG	94.8±1.9	88.1±6.0	76.3±9.*	94.7±1.8
IFAG	27.0±3.2	22.0±3.2	14.0±3.6*	25.9±3.5

<sup>A</sup> BB: *burst* basal; BI SAPI: *burst* induzido por *Staphylococcus aureus* marcado com iodeto de propídio; BI PMA: *burst* induzido por phorbol miristate acetate; %FAG: porcentagem de fagocitose; IFAG: intensidade de fagocitose. Valores expressos como média ± desvio padrão: \*p<0.05 x C, T1, T3; <sup>f</sup>p<0.005 x C, T3.

EXP 2	GRUPOS	
Parâmetros	C	E
NOR (ng/g)	1290,2±248,4	1073,9±93,8#
VMA (ng/g)	1840,0±237,1	1655,1±182,4
VMA/NOR <sup>B</sup>	1,44±0,10	1,53±0,07#
Corticosterona (ng/mL)	71,657±21,892	451,314±80,421#

<sup>B</sup> Turnover de NOR. Valores expressos como média±desvio padrão: # p<0,05 em relação ao grupo controle.

**Discussão:** A diminuição da atividade de neutrófilos sanguíneos, avaliados tanto pelo *burst* oxidativo como pela fagocitose, após tratamento com MDMA é dependente de tempo e provavelmente decorrente de uma ativação do eixo HPA, que resultou em aumento dos níveis séricos de corticosterona. Esta ativação correlaciona-se positivamente com o aumento da atividade do sistema noradrenérgico hipotalâmico.

**Apoio Financeiro:** FAPESP e CNPq

08.019

## INVESTIGATION OF THE ROLE OF PI3 KINASE IN THE LEUKOCYTE RECRUITMENT IN AN EXPERIMENTAL MODEL OF MULTIPLE SCLEROSIS

Rodrigues, D. H.<sup>1</sup>; Vilela, M. C.<sup>2</sup>; Amaral, D. C. G.<sup>1</sup>; Sachs, D.<sup>3</sup>; Teixeira, M. M.<sup>1</sup>; Pinho, V.<sup>4</sup>; Teixeira, A. L.<sup>5</sup> - <sup>1</sup>UFMG - Ciências Biológicas; <sup>2</sup>UFMG - Patologia Geral; <sup>3</sup>FMRP - USP - Farmacologia; <sup>4</sup>UFMG - Bioquímica e Imunologia; <sup>5</sup>UFMG - Medicina

**Introduction:** The enzyme PI3 Kinase- $\gamma$  (PI3K) is an important signal transducer that is involved in cell growth and mobility. The investigation of its role in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), an animal model for multiple sclerosis, may be relevant for the comprehension of the mechanism involved in the development of this neuroinflammatory condition. This work aims to evaluate the leukocyte recruitment in the brain microvasculature of C57/BL6 mice treated with a PI3 kinase inhibitor as well as PI3K<sup>-/-</sup> mice submitted to EAE. **Methods:** To induce EAE, an emulsion of MOG<sub>35-55</sub>, Complete Freund Adjuvant, *Mycobacterium* and *Pertussis* toxins was injected in wild type (WT) and PI3K<sup>-/-</sup> C57/BL6 mice. Nociception was evaluated by electronic pressure-meter paw tests from 0 to 12 days post-immunization (p.i.). Leukocyte rolling and adhesion were assessed using intravital microscopy. The brain was removed for cytokine assay by ELISA. Brain and spinal cord were removed for histological studies. A subset of WT mice was treated with a PI3 kinase- $\gamma$  inhibitor (AS605240 1mg per animal, oral administration) 1h before intravital microscopy analysis. **Results:** PI3K<sup>-/-</sup> mice presented a delayed course of the EAE when compared to WT mice. PI3K<sup>-/-</sup> mice exhibited a decreased clinical score level (PI3K<sup>-/-</sup> 0,19 $\pm$ 0,13, WT 1,59 $\pm$ 0,44; p<0.001) and a higher weight (mean $\pm$ SE g, PI3K<sup>-/-</sup> 20,1 $\pm$ 0,25, WT 19,2 $\pm$ 0,36; p<0.001) until 26 days p.i.. There was no difference in cell adhesion at day 14 p.i. between PI3K<sup>-/-</sup> mice and WT mice. Adhesion was higher in PI3K<sup>-/-</sup> mice (mean $\pm$ SE cells/mm<sup>2</sup>, PI3K<sup>-/-</sup> 1034 $\pm$ 138,5, WT 453,2 $\pm$ 136,0; p<0.05) at day 32 p.i., when PI3K<sup>-/-</sup> were at acute phase and WT mice were at remission. We used a PI3 Kinase- $\gamma$  inhibitor at day 14 p.i. in WT mice 1h before intravital microscopy, but there was no statistical difference between treated and non-treated groups. The final clinical scores were similar in both groups of animals. We also analyzed nociception in these animals and found a trend of decreased nociception of PI3K<sup>-/-</sup> mice at day 10 p.i. (mean $\pm$ SE  $\Delta$  withdraw threshold g, PI3K<sup>-/-</sup> 1,68 $\pm$ 0,43, WT 3,0 $\pm$ 0,32; p<0.05). **Discussion:** The delayed clinical score development of PI3K<sup>-/-</sup> mice compared to WT mice suggest an involvement of the PI3K $\gamma$  isoform in the development of this experimental model of multiple sclerosis. There was a correlation between the beginning of disease in PI3 kinase animals (acute phase) and increased cell adhesion in brain microvasculature. There is hyperalgesia just before acute phase (10 days p.i.) of EAE in WT mice, but no hyperalgesia was observed in PI3K<sup>-/-</sup> mice submitted to EAE. All these data indicate a delay in disease onset in PI3K<sup>-/-</sup> mice. As clinical scores were similar in WT and PI3K<sup>-/-</sup> mice 34 days p.i. and PI3 kinase  $\gamma$  inhibitor had no effect in cell adhesion, this enzyme may be involved in the onset of EAE but other factors may play a more relevant role in the development of this neuroinflammatory condition. **Supported by:** CAPES, CNPq and Fapemig.

08.020

**THE FLAVONOID 3-O-[ $\beta$ -D-GLICOPIRANOSIL-(1-6)-L RAMNOPIRANOSIL] 7-O- $\alpha$ -L-RAMNOPIRANOSIL-7-O- $\alpha$ -L-RAMNOPIRANOSIL KAEMPFEROL (GRRR-KAEMPFEROL) INHIBITS PULMONARY CELL MIGRATION AND AIRWAYS HYPERREACTIVITY IN MURINE MODEL OF ASTHMA**

Medeiros, K. C. P.<sup>1</sup>; Borducchi, E.<sup>2</sup>; Nascimento, R. J. B.<sup>3</sup>; Gomes, E. A. G. M.<sup>2</sup>; Piuvezam, M. R.<sup>3</sup>; Russo, M.<sup>2</sup> - <sup>1</sup>UFPB / ICB - USP - LTF / Imunologia; <sup>2</sup>ICB - USP - Imunologia; <sup>3</sup>UFPB - LTF

**Introduction:** Asthma is a chronic respiratory disease characterized by airway inflammatory and airway hyperreactivity (AHR). One strategy for the treatment of allergic diseases is the development of new drugs. It has been shown that flavonoids possess anti-inflammatory and immunomodulatory effects. Here we investigated whether 3-o-[ $\beta$ -d-glicopiranosil-(1-6)-l ramnopiranosil]7-o- $\alpha$  -l- ramnopiranosil kaempferol (GRRR kaempferol) subcutaneous and oral routes treatment could modulate allergic lung disease. **Methods:** At weekly intervals BALB/c mice (n=5) were subcutaneously sensitized twice with OVA/Alum and challenged twice with OVA given intranasally mice. Subcutaneous and oral treatment with GRRR kaempferol (30 mg/mL and 50 mg/kg, respectively) was performed 1 h before each OVA-sensitization and OVA challenge. **Results and Discussion** Animals treated with GRRR kaempferol subcutaneously but not oral route showed a 3-fold decreased in the number of total cells in the bronchoalveolar lavage (BAL) fluid and a 6-fold decreased in the number of eosinophils when compared with non-treated mice. Also, AHR to methacoline was significantly inhibited in GRRR kaempferol subcutaneously treated animals. However the production of OVA-specific IgE antibodies was not altered by the treatment. The present data demonstrated the GRRR kaempferol downregulate the airway allergic inflammation and AHR without interfering in IgE production. **Supported by:** FAPESP/CNPq

## 08.021

### **CYSTEINYL-LEUKOTRIENES MEDIATE THE EFFECTS OF CYCLO-OXYGENASE INHIBITORS ON MURINE BONE MARROW EOSINOPOIESIS AND PROTECT BONE-MARROW EOSINOPHILS AGAINST PGE<sub>2</sub> PRO-APOPTOTIC EFFECTS**

Queto, T.<sup>1</sup>; Sales, S. M.<sup>1</sup>; Elsas, M. I. C. G.<sup>1</sup>; Elsas, P. P. X.<sup>2</sup> - <sup>1</sup>FIOCRUZ - IOC - IFF - Lab. Fisiopatologia Humana; <sup>2</sup>UFRJ - Imunologia - IMPPG

**Introduction** Cysteinyl-Leukotrienes (CysLT) are important mediators of asthma, which induce bronchoconstriction, mucus secretion and a variety of regulatory effects on the infiltrating leukocyte populations, especially eosinophils. Increased CysLT production resulting from the shunting of arachidonic acid towards the 5-lipoxygenase (5-LO) pathway in the absence of active cyclooxygenase (COX) is one mechanism proposed to explain the pathophysiology of aspirin-induced, asthma (AIA). Because the COX inhibitors, aspirin and indomethacin, increase Interleukin-5 (IL-5)-dependent eosinophilopoiesis in murine bone-marrow culture, we evaluated the participation of CysLT in the mechanism of action of both agents in this model. **Methods** Liquid bone-marrow cultures were established from BALB/c and C57BL/6 in the presence of IL-5, for 7 days. **Results** CysLTs (LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub> and LTE<sub>4</sub>) increased eosinophil production (maximum effect at 10<sup>-7</sup>-10<sup>-8</sup>M; for LTD<sub>4</sub>, 177% enhancement at 10<sup>-8</sup> M, P<0.001). Their effects were comparable, in number as well as morphology of the eosinophils, to those of aspirin (10<sup>-8</sup>M; 100%, P=0.007) and indomethacin (10<sup>-7</sup>M; 115%, P<0.001). The 5-lipoxygenase activating protein (FLAP) inhibitor, MK-886, blocked the effects of both aspirin and indomethacin, but not those of the CysLT (>92% in both cases; P<0.011). On the other hand, the competitive antagonists of the CysLT receptor type 1 (CysLT<sub>1</sub>R), MK-571 and Montelukast, blocked the effects of LTD<sub>4</sub>, indomethacin and aspirin (>93% in all cases, P<0.01). All three agents were capable of protecting developing eosinophils from the apoptosis-inducing actions of prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>). The ability of COX inhibitors to protect developing eosinophils from the effects of a preformed COX derivative (PGE<sub>2</sub>) further indicates that these drugs act by promoting CysLT production rather than preventing synthesis of PGE<sub>2</sub>. Furthermore, this cytoprotective effect is abolished if bone-marrow is incubated with COX inhibitors in association with FLAP or CysLT<sub>1</sub>R inhibitors, or with LTD<sub>4</sub> in association with CysLT<sub>1</sub>R inhibitors. **Discussion** These findings suggest that, in the presence of COX inhibitors, CysLT are formed, which promote eosinophilopoiesis by acting on high affinity CysLT<sub>1</sub>R. CysLT equally mediate the cytoprotective effects of COX inhibitors. The mechanism of action of COX inhibitors on murine eosinophilopoiesis is, therefore, similar in its essential features to the shunting mechanism proposed to account for AIA. **Supported by:** CNPq, Capes, Finep, FIOCRUZ

08.022

**METABOLIC PROGRAMMING INDUCED BY MATERNAL PROTEIN DEPRIVATION ALTERS THE LYMPHOCYTES RESPONSE TO MITOGEN IN ADULTHOOD**

Salama Rodrigues, C.<sup>1</sup>; Vargas da Silva, S.<sup>1</sup>; Villela, C. G.<sup>2</sup>; Garcia-Souza, E. P.<sup>3</sup>; Moura, A. S.<sup>4</sup>; Barja Fidalgo, T. C.<sup>1</sup> - <sup>1</sup>UERJ - Farmacologia; <sup>2</sup>UERJ - Farmacologia e Psicobiologia; <sup>3</sup>UERJ - Ciências Fisiológicas; <sup>4</sup>UERJ - Fisiologia

Our group has been demonstrating that adult progeny from dams submitted to protein deprivation during early lactation present an impairment in glucocorticoid and insulin secretion. Such hormonal alterations predispose to an inadequate mounting of acute and systemic inflammatory response, mainly related to neutrophils activation. Besides, we also demonstrated that these animals presented alterations in serum levels of TNF- $\alpha$  (in normal conditions and after LPS treatment - i.v) and IL-10 (after LPS treatment – i.v). In the present study, we evaluated the adaptative immune response (*in vitro*) from adult rat offspring of dams fed with either a protein free diet (UN-Group) or 22% protein diet (C-Group) during the first 10 days of lactation through of spleen lymphocytes. Lymphocytes isolated of spleen from UN rats present a higher proliferative capacity (thymidine incorporation) when activated with Con A (2 mg/mL), which did not alter intracellular ROS production (48 h – DHR oxidation) in C or UN group. We also investigated IL-10 gene expression (RT-PCR) in mitogen-stimulated lymphocytes. In basal condition, there was not difference in the IL-10 mRNA expression between the groups. However, 48h after the challenge with Con A the level of IL-10 mRNA increased (44%) in lymphocytes from UN rats as compared to control. Our results account evidence that maternal protein malnutrition during early lactation also affects the adaptative immune response from adult progeny. **Supported by:** CNPq; FAPERJ; CAPES; SR-2 UERJ

08.023

## **AÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO NA EXPRESSÃO E/OU FUNÇÃO DAS MOLÉCULAS DE ADESÃO DOS EOSINÓFILOS DE PACIENTES COM RINITE ALÉRGICA**

Becker, T. L.<sup>1</sup>; Muniz, F. R. M.<sup>1</sup>; Pallis, F. R.<sup>1</sup>; Pelaquini, E. H.<sup>1</sup>; Oliveira, C. H.<sup>1</sup>; Ferreira, H. H. A.<sup>1</sup> - <sup>1</sup>USF - Inflamação

**Introdução:** Este trabalho teve como objetivo verificar o envolvimento das isoformas de óxido sintase (NOS) na expressão e/ou função das integrinas VLA-4 e Mac-1 na adesão de eosinófilos (EO) de pacientes com rinite alérgica (PRA) **Método:** EO de voluntários sadios (VS) ou de PRA, obtidos por separação negativa utilizando CD16 micropartículas magnéticas e sistema magnético de separação celular (MACS) foram incubados por 15 min na presença ou não (controle) de 1400W (inibidor seletivo da iNOS; 1,0 mM) e 7-NINA (inibidor seletivo bNOS; 0,1 mM). Em alguns ensaios, as células foram co-incubadas com PAF (10<sup>-6</sup>M) e em outros com anticorpos anti-CD49d (anti-VLA-4; 10µg/mL-HP2/1), anti-CD11b (aMac-1; 10µg/mL-ICRF44). A adesão foi feita em placas recobertas com fibronectina e os EO aderidos foram quantificados pela atividade residual da peroxidase eosinofílica (EPO). Os resultados estão expressos como percentagem de EO aderidos comparados ao número total ± E.P.M. de seis experimentos independentes feitos em triplicata cada um. **Resultados:** Os resultados mostraram que a adesão à fibronectina dos EO dos VS foi aumentada pela presença do 1400W (9,7±1,5) e do 7-NINA (13,6±1,0) comparado à adesão basal (6,7±0,7), indicando a participação da iNOS e da bNOS no aumento da adesão basal dos EO dos VS. A participação exclusiva da bNOS na adesão basal dos PRA foi observada quando o 7-NINA e não o 1400W foi capaz de aumentar a adesão dos EO dos PRA (13,6±0,4 e 28,5±2,0 para basal e induzida, respectivamente). O PAF, indutor da expressão do Mac-1, aumentou a adesão dos EO dos VS e PRA (16,7±0,4 e 20,9x10<sup>6</sup>±0,6, respectivamente), sugerindo a participação do Mac-1 no processo. A co-incubação com o 1400W e o 7-NINA com o PAF não teve efeito adicional na adesão dos VS (14,2±0,3; 19,0±2,8, respectivamente) ou dos PRA (14,2±0,5; 30,3±0,9, respectivamente), sugerindo que todo o estoque intracelular do Mac-1 pode ter sido mobilizado pelo PAF. Para confirmar a participação das moléculas de adesão Mac-1 e verificar se o VLA-4 está envolvido no processo, a adesão foi feita na presença dos anticorpos para Mac-1 (anti-CD11b) ou VLA-4 (anti-CD49d). A adesão dos EO dos VS estimulada pelo 1400W foi inibida na presença do anti-Mac-1, mas não do anti-VLA-4 (10,7±2,1, 3,6±0,7 e 7,2±0,7 para 1400W, 1400W+anti-Mac-1 e 1400W+anti-VLA-4, respectivamente) confirmando a participação do Mac-1, mas não do VLA-4, na adesão dos EO dos VS mediada pela iNOS. No entanto, outra molécula poderá estar envolvida na adesão dos EO dos VS estimulada pela bNOS, desde que nenhum dos anticorpos inibiu a adesão estimulada pelo 7-NINA (13,6±1,0, 9,6±1,4 e 12,4±0,9 para 7-NINA, 7-NINA+anti-Mac-1 e 7-NINA+anti-VLA-4, respectivamente). Por outro lado, a adesão dos EO dos PRA estimulada pelo 7-NINA foi inibida pelos dois anticorpos (28,5±0,1, 10,5±1,8 e 11,7±0,6 para 7-NINA, 7-NINA+anti-Mac-1 e 7-NINA+anti-VLA-4, respectivamente), sugerindo que a bNOS é capaz de modular as integrinas Mac-1 e VLA-4 na adesão dos EO dos PRA. **Discussão:** Pelos resultados da adesão à fibronectina na presença do PAF ou dos anticorpos para o Mac-1 e VLA-4, nossos dados sugerem que a integrina Mac-1 participa da adesão à fibronectina dos EO dos VS e dos PRA, mas o VLA-4 somente participa da adesão à fibronectina dos eosinófilos dos PRA. O tratamento com o inibidor da iNOS foi capaz de modular a expressão e/ou função do Mac-1 nos EO dos VS. A modulação da expressão e/ou função do Mac-1 e VLA-4 nos PRA foi observada na presença do inibidor da bNOS. Portanto, o aumento da adesão à fibronectina verificado nos eosinófilos dos pacientes alérgicos pode ser decorrente do aumento da função do VLA-4 e pode ser modulado pela bNOS.

**Apoio Financeiro:** FAPESP

**08.024**

**PRO-APOPTOTIC EFFECT OF ALL-TRANS RETINOIC ACID IN HUMAN NEUTROPHILS**

Luz, R. A.<sup>1</sup>; Jones, C. P.<sup>1</sup>; Elsas, M. I. C. G.<sup>2</sup>; Elsas, P. P. X.<sup>1</sup> - <sup>1</sup>UFRJ - Imunologia; <sup>2</sup>IFF-FIOCRUZ - Pediatria

**INTRODUCTION** Apoptosis is a central mechanism in the resolution of inflammatory processes. This study is concerned with the mechanisms through which apoptosis is modulated by exogenous agents, in human neutrophils. To test this hypothesis, we have initially evaluated the effects of all-trans Retinoic Acid (ATRA) and indomethacin on the apoptosis of mature neutrophils. **METHODS** Purified neutrophil populations from the blood of healthy donors were incubated for 20 h in medium alone or in the presence of ATRA or indomethacin, followed by cyto centrifugation in triplicate slides, coloration with eosin/hematoxilin and counting of 300 cells per slide. **RESULTS** ATRA strongly induced apoptosis in neutrophils (45,47±4,31 and 79,98±3,65 mean±SEM for controls(n=11) and 100nM ATRA(n=4) respectively, with p<0.001). Indomethacin was also capable of strongly inducing apoptosis in cultured neutrophils (47,37±3,31 and 87,26±1,22 mean±SEM for control (n=16) and 100µM indomethacin (n=5) respectively, with p<0.001). **CONCLUSION**

These findings document a proapoptotic effect of ATRA and indomethacin previously undescribed in human neutrophils.

**Apoio Financeiro:** CNPq; CAPES; INSERM-FIOCRUZ; FINEP; FAPERJ