

Conferências Plenas

CP 3

MODELLING THE RESPONSE OF THE ASTHMATIC AIRWAYS TO ADENOSINE: MECHANISMS AND RECEPTORS. John R. Fozard, Research Department, Novartis Pharma Ltd., CH 4002 Basel, Switzerland.

The mechanism of adenosine-induced bronchoconstriction in asthmatic patients has been well explored and an intermediary role for the mast cell is established. However, the reason for the striking up-regulation of the response in asthmatics remains unknown as does the receptor mediating the response. We here describe a new experimental animal model which mimics closely the bronchoconstrictor effects of adenosine seen in asthmatics. Brown Norway (BN) rats were sensitised to ovalbumin (OA). Subsequent challenge with OA induced a marked airway hyperresponsiveness to adenosine which was not seen with 5-hydroxytryptamine (5-HT). The augmented response to adenosine exhibited tachyphylaxis, was blocked selectively by disodium cromoglycate, methysergide, ketanserine or theophylline and associated with increases in the plasma concentrations of both histamine and 5-HT and degranulation of mast cells in the lung. Like adenosine, the broad-spectrum adenosine receptor agonist, NECA, induced dose-related bronchoconstriction in actively sensitised, OA-challenged animals. In contrast, CPA, CGS 21680 and 2-CI-IB-MECA, agonists selective for A_{2A} and A_3 receptors, respectively, induced minimal effects. Neither the selective A_1 receptor antagonist, DPCPX, nor the selective A_2A receptor antagonist, ZM 241385, blocked the bronchoconstrictor response to adenosine. MRS 1754, which has similar affinity for rat A_{2B} and A_1 receptors, failed to block the bronchoconstrictor response to adenosine; despite blockade of the A_1 receptor-mediated bradycardia induced by NECA. 8-SPT and CGS 15943, antagonists at A_1 , A_{2A} , and A_{2B} but not A_3 receptors, inhibited the bronchoconstrictor response to adenosine. However, the degree of blockade (approximately 3-fold) did not reflect the plasma concentrations, which were 139 and 21 times greater than the respective K_d values at the rat A_{2B} receptor. Adenosine and NECA, but not CPA, CGS 21680 or 2-CI-IB-MECA, induced contraction of parenchymal strip preparations from actively sensitised, OA-challenged animals which were augmented relative to responses on non-challenged strips and mast cell mediated. Responses to adenosine could not be antagonised by 8-SPT or MRS 1754 at concentrations > 50 times their affinities at the rat A_{2B} receptor. Up-regulation by allergic activation, mast cell dependency, tachyphylaxis and selective blockade by theophylline represent striking similarities between the bronchoconstrictor response to adenosine seen following allergen challenge in the BN rat and that on the airways of asthmatics. However, the adenosine receptor subtype which mediates activation of the human mast cell is generally considered to be the A_{2B} receptor. In contrast, our data appear to rule out a role for the A_{2B} receptor in the bronchoconstrictor response to adenosine augmented following allergen challenge in the BN rat. Indeed the site cannot be categorised as any one of the four recognised adenosine receptor subtypes. It remains a

challenge for the future to define this receptor further and to establish whether the receptor mediating the response to adenosine of the human asthmatic airways is the same.

CP 4

PHARMACOLOGY OF NOCICEPTIN/ORPHANIN FQ: THE USEFULNESS AND PROMISES OF SELECTIVE RECEPTOR LIGANDS. G. Calo' Dept. of Pharmacology, University of Ferrara, 44100 Ferrara, Italy.

Nociceptin/orphanin FQ (N/OFQ) is the endogenous ligand of the N/OFQ peptide receptor (NOP). The pharmacological profile of NOP receptors has been investigated in vitro and in vivo using the following ligands: i) the peptides N/OFQ(1-13)-NH₂ and [(pF)Phe⁴]N/OFQ(1-13)-NH₂ and the non peptide Ro 64-6198 that behave as selective and potent full agonists; ii) [F/G]N/OFQ(1-13)-NH₂ and Ac-RYRIK-NH₂ that behave as antagonists, partial agonists or even full agonists depending on the preparation under study; thus, they should be considered as partial agonists; iii) [Nphe¹]N/OFQ(1-13)-NH₂ and J-113397 that always behave as pure and selective antagonists. These antagonists show similar pA values in the various preparations (6.0–6.7 for the peptide, 7.7–8.3 for the non peptide) suggesting that a single receptor type (the NOP) mediates the different actions of N/OFQ. Recently [Arg⁴,Lys¹⁵]N/OFQ has been described as selective NOP agonist more potent than the natural ligand. By combining the chemical modification (Arg⁴,Lys¹⁵) which increases the potency the agonist with that which confers antagonist properties (Nphe¹), the peptide [Nphe¹,Arg⁴,Lys¹⁵]N/OFQ-NH₂ (UFP-101) was synthesized. This compound competitively antagonized N/OFQ effects in vitro (showing pA values in the range 7.3–7.7) and in vivo in mice. These NOP ligands allowed to establish a firm characterization of the receptor mediating N/OFQ effects and to foreseeing some possible therapeutic indications of NOP selective ligands: i) NOP agonists may be useful in diskinctic syndromes of the gastrointestinal and urinary systems, as antitussive agents, in anxiety, for the treatment of drug abuse and in some disturbances of feeding behaviour, such as stress-induced anorexia; ii) NOP antagonists could be indicated as analgesics, antidepressive and anorectic agents; iii) finally, recent studies indicate that NOP selective partial agonist are worthy of testing as novel diuretics (acquaretics).

CP 5

NON CONVENTIONAL STRATEGIES FOR THE SUPPRESSION OF ASTHMA LIKE RESPONSES IN DIFFERENT MOUSE STRAINS. Momtchilo Russo.

Over the past decades the incidence of asthma has risen dramatically worldwide, especially but not exclusively, in developed countries. My talk will focus on two non conventional strategies for the control of experimental asthma. First, I will show the effect of oral tolerance on the development of experimental asthma and sec-

ondly, I will present data on the effect of bacterial lipopolysaccharide on established airway eosinophilic inflammation.

Asthma is a chronic respiratory disease characterized by airway inflammation, intermittent airway obstruction, excessive mucus production, airway hyperreactivity (AHR) and elevated levels of IgE. The mechanisms that cause asthma are complex and vary among population groups and individuals but overall appear to result from an intrapulmonary allergen-driven Th2 response characterized by an increased production of type-2 cytokines (IL-4, IL-5, IL-9 and IL-13) secreted by CD4⁺ T lymphocytes.

As a result of this chronic inflammatory process, the airway tissue may suffer profound structural and functional changes referred as to airway remodeling (6)

Major advances in the understanding of the pathogenesis of asthma were provided by murine models which showed that IL-4, IL-5 and IL-13 cytokines secreted by Th2 lymphocytes, play a pivotal role in allergic airway inflammation. Thus, disruption of IL-4 production or suppression of its signaling pathway inhibit IgE production and attenuate airway eosinophilia and AHR. In addition, IL-5 deficiency or its over production may be associated to the suppression or induction of airway eosinophilia and bronchial hyperreactivity respectively. This is not surprising since IL-4 appears to be important for the development of Th2 cells. IL-4 and IL-13 are involved in IgE synthesis and mucus production whereas IL-5 regulates the growth, differentiation, and activation of eosinophils. However depending on the mouse strain one cytokine may preponderate over the other for the induction of experimental asthma. It was demonstrated that the BP2 selection of Biozzi mice, once immunized and challenged with ovalbumin became hyper-responsive to methacholine inhalation while BALB/c reacted less markedly. Differences among mouse strains in antigen-independent (inherent) airway responsiveness to methacholine were also reported. Interestingly, this inherent airway responsiveness is T-cell-dependent, since the passive transfer of naive T-cells from a strain that is hyper-reactive to an hypo-reactive strain confers enhanced airway reactivity. Collectively, these experiments highlight the fundamental role of T cells in airway inflammation and AHR. Indeed, asthma-like responses are absent in TCR β KO mice. In contrast to conventional T-cells, g δ T-cells appear to exert a negative regulation of airway responsiveness because g δ T-deficient animals present higher airway responsiveness to methacholine and diminished airway eosinophilia when compared with conventional mice from the same genetic background.

Current therapeutics are effective for asthma control but do not cure the disease. Data from murine models indicate that attenuation or suppression of asthma can be achieved by targeting Th2 development or Th-2 cytokines. However, continuous inhibition of Th2 cells or cytokines potentially may lead to immunosuppression, to exacerbated Th1 responses or to autoimmunity. Thus, is more desirable to suppress specifically the immune responses to a given allergen. Usually, mucosal administration of soluble proteins by nasal or oral routes results in the development of a state of peripheral immunological

tolerance. The mucosal tolerance approach has proven effective in the suppression of a variety of experimental organ-specific autoimmune diseases. However literature is scarce regarding the effect of oral tolerance on experimental asthma. Recently, Russo and colleagues have shown that oral tolerance can prevent the development of lung and bone marrow eosinophilia in B6 mice. Other studies using similar approaches, showed that high-dose oral tolerance was effective in preventing antigen-induced eosinophil infiltration in the trachea. However the effect of oral tolerance on airway reactivity or mucus production has not been addressed. Moreover, the effect of oral tolerance on asthma-like responses employing different mouse strains has not been studied.

We have selected BALB/c, BP2, CBA/Ca IL-5 transgenic and BALB/c g δ deficient mouse strains to study the effect of oral tolerance on the development of experimental asthma. Selection of these mouse strains was based on the following facts: BALB/c mice develop an IL-4-dependent asthma; BP2 animals present high AHR that is largely dependent on IL-5 production, IL-5 transgenic mice exhibit hyper-eosinophilia; and g δ deficient mice that appear to be hyper-reactive to methacholine and refractory to oral tolerance induction. It will be shown that a 5 day continuous oral Ag administration before immunization suppresses asthma-like responses in all mouse strains tested. Moreover, oral treatment starting after the primary immunization (day 0) or after the booster (day 7) was still effective in suppressing key phenotypes of asthma such as airway eosinophilia, Th2 cytokine production, anti-O α IgE synthesis, AHR and mucous production. However, OVA feeding after Ag challenge (day 14) enhanced the allergic responses.

These findings indicate that mucosal tolerance induction is related to timing and/or immunological status and may represent a two-edged sword. Thus, more studies are needed to define the conditions of safe procedure to treat asthma based on the tolerance concept.

We therefore were interested to develop an experimental protocol that could suppress established allergic lung inflammation. Because, an inverse correlation has been observed between microbial infections and allergic disorders, we used bacterial lipopolysaccharide (LPS), to study its effects on established asthma. Thus, we evaluated whether bacterial lipopolysaccharide (LPS), a prototypic cell wall component of gram-negative bacteria that activates immune cells via the transmembrane Toll-like receptor 4 (TLR4), can suppress asthma-like responses. LPS are ubiquitous in the environment and are often present in polluted air and in organic or household dusts. Exposure to airborne LPS can either protect against asthma or exacerbate it. The beneficial effects of LPS have been claimed to be mediated by the production of the type-1 cytokines IL-12 and IFN- γ that are known to down modulate allergic responses. Conversely airborne LPS might adversely affect asthmatics by enhancing an established airway inflammation and airway obstruction.

LPS is also a potent stimulator of nitric oxide (NO) production and a number of studies have demonstrated the involvement of NO in lung pathophysiology. In humans with normal airways, exhaled NO is derived from endothelial and neural constitutive nitric oxide synthases (NOS3 and NOS1, respectively), whereas the increased lev-

els of NO detected in asthmatics appear to be derived from inducible NOS (iNOS or NOS2), expressed by the inflamed airways. Whether NO production has a beneficial or deleterious effect in asthma is still controversial. Data from experimental asthma models, using gene inactivation of NOS isoforms, indicate that the induction of airway eosinophilic inflammation appears to be either dependent or independent of NOS2 activity, whereas NOS1, but not NOS2 expression, seems to be required for protection against AHR. In addition, drug-induced inhibition of NO production has been shown to either exacerbate or attenuate allergen-induced airway inflammation and AHR.

Given that engagement of TLR4 by LPS result in the production of IL-12 and IFN- γ which up regulate NOS2 expression and that NOS2-derived NO might positively or negatively regulate cell signaling, we investigated the effect of LPS on asthma-like responses in TLR4, IL-12 $^{-/-}$, or IFN $\gamma^{-/-}$, or NOS2 $^{-/-}$ mouse strains.

Given that NOS2 is up regulated by LPS, IL-12 or IFN- γ and that NOS2-derived NO might positively or negatively regulate cell signaling, we investigated the effect of LPS on established airway allergic inflammation in IL-12 $^{-/-}$, or IFN- $\gamma^{-/-}$, or NOS2-deficient mouse strains.

It will be reported that the systemic administration of LPS concomitantly with Ag challenge suppresses both early and late asthmatic responses in different mouse strains. The suppression of allergen-induced airway eosinophilic inflammation, mucus production and type-2 cytokine synthesis persisted in IL-12 $^{-/-}$ or IFN- $\gamma^{-/-}$ mice but was not observed in mice lacking nitric oxide synthase 2 (NOS2). Also, suppression of passive cutaneous anaphylaxis was not observed in TLR4 $^{-/-}$ mice. Our findings identify NOS2 as a key isoenzyme involved in the suppression of asthma-like responses by LPS and suggest that LPS-mimetic substances signaling through TLR4 and/or NO inducers may represent a therapeutic strategy for the treatment of asthma.

CP 6

PHARMACOGENETIC VARIATION IN CYP2A6: ROLE IN SMOKING, CANCER AND NOVEL TREATMENTS. Rachel F. Tyndale - CAMH, Dept of Pharmacology 1 Kings College Circle, University of Toronto, Toronto, Canada.

We have identified the hepatic enzyme, CYP2A6, that is responsible for their *in vivo* metabolic inactivation and removal of \approx 80% of nicotine, the drug responsible for dependent cigarette smoking. Individuals with genetically inactive CYP2A6 variants have decreased nicotine metabolism and we postulated that this might alter various aspects of smoking behaviour. For example, we have found that slow nicotine metabolizers (heterozygotes with one inactive allele) are \approx 2 times less likely to become dependent smokers. In addition we have shown that slow metabolizers who do become dependent cigarette smokers smoke 7-10 cigarettes less per day than metabolizers with normal rates of metabolism (homozygotes with two active alleles). We have also identified individuals who have multiple copies of the CYP2A6 gene; these people metabolize nicotine more rapidly and smoke more intensely. Other aspects altered by genetic variations in CYP2A6 include the

age at which people start smoking, the duration of smoking and the success of quitting smoking. Recently we have shown that imitating the protection offered by the gene defect, by inhibition of CYP2A6 activity *in vivo*, can decrease smoking and decrease the activation of CYP2A6 substrate tobacco smoke nitrosamines (rerouting them to NNAL glucuronide). Thus we believe that slower CYP2A6 may protect individuals from lung cancer by decreasing both smoking and the activation of carcinogens. We have also used CYP2A6 inhibitors to alter/improve existing nicotine replacement therapies by decreasing the removal of nicotine. We anticipate that genotyping for CYP2A6, or using CYP2A6 inhibitors, can result in a rationale for improving and individualizing nicotine replacement therapy dosing. We have also shown that using a CYP2A6 inhibitor with oral nicotine, to create an oral nicotine pill form of nicotine replacement therapies, is effective at getting nicotine into the body without gastrointestinal distress and in decreasing smoking. We propose that differences in CYP2A6 allele frequencies may also contribute to the ethnic differences observed in smoking and tobacco-related diseases; it may also alter the success and side-effect rates for those treated with nicotine replacement therapies. We identified and characterized novel alleles and created genotyping assays for them. The combined frequencies for established (*2, *4, *5) and novel (*6-*10) variant alleles were highest in Japanese (53.5%) and Chinese (30.3%) and much lower in Canadian Natives (14.6%), Caucasians (11.6%), and in African Americans (10.1%). The frequencies of the potentially detrimental (due to increased activity) duplication variant (*1x2) was low (\approx 1.5%) in all groups. These approaches together may provide a better understanding of smoking behaviour and provide some novel therapeutic approaches to smoking reduction and cessation.

Funded by CAMH, NIDA, CIHR, NCIC, and by a Canadian Research Chair in Pharmacogenetics.

CP 9

FARMACOLOGIA PRÉ-CLÍNICA DE PLANTAS MEDICINAIS BRASILEIRAS: UMA VISÃO PESSOAL DEPOIS DE 25 ANOS DE PESQUISA. B. Calixto. Departamento de Farmacologia, UFSC, 88015-420- Florianópolis –SC.

As atividades de pesquisa na área de produtos naturais voltadas para o estudo de plantas medicinais na UFSC, iniciaram por volta de 1977, tão logo a administração superior decidiu contratar jovens pesquisadores com pós-graduação em Farmacologia para desenvolver atividades de ensino e de pesquisa. Esforços foram também realizados para contratação de pesquisadores de outras áreas para auxiliar no estudo de produtos naturais. O primeiro projeto de pesquisa integrado, envolvendo pesquisadores das áreas de Botânica, Farmacologia e Química foi aprovado pela Central de Medicamentos (CEME) em 1979. Embora os pesquisadores, de uma maneira geral não tivessem formação específica na área de farmacologia de plantas medicinais, a formação mais abrangente característica dos cursos de pós-graduação naquela época, permitiu desenvolver e adaptar várias metodologias para o estudo "in vitro" e "in vivo" de extratos e de princípios ativos de plantas. O primeiro trabalho importante

do grupo foi publicado em 1984, no Brazilian Journal of Medical and Biological Research, onde foi demonstrado a existência no *Phyllanthus sellowianus* (quebra-pedra) de um alcalóide com ações anti-espasmódicas por bloquear canais de cálcio do tipo L. Mais tarde, com o apoio da própria CEME, estudamos um grande número de espécies de plantas pertencentes ao gênero *Phyllanthus* resultando esses estudos em várias publicações em revistas especializadas de farmacologia. No início da década de 80, com apoio da FINEP, estudamos uma planta até então desconhecida da população, utilizada em algumas regiões do estado de MG para o tratamento do envenenamento de picada de cobras, especialmente por *Bothrops jararaca* e também como antiinflamatória, conhecida como *Mandevilla velutina*. Demonstramos que seu extrato e alguns compostos pregnânicos presentes na mesma eram capazes de antagonizar de maneira competitiva e seletivamente através de estudos funcionais, as respostas mediadas pela bradicinina e demais cininas. Esses estudos resultaram em várias publicações em revistas internacionais, incluindo 4 artigos no British Journal of Pharmacology. A seguir extratos e princípios ativos isolados de diversas plantas como *Drimys winteri*, *Syphocampylus verticillatus*, *Hedyosmum brasiliense*, *Mandevilla illustris*, *Ocotea suaveolens*, etc foram estudados e os resultados publicados em diversas revistas científicas internacionais. O reconhecimento desses trabalhos pela comunidade científica pode ser atestado pelos diversos convites para publicação de artigos de revisões em revistas científicas. Um total de 9 revisões foram publicadas, além de um livro editado em 2001 e de artigos de divulgação na área de plantas medicinais. Além disso, passamos a interagir de maneira muito intensa com algumas indústrias farmacêuticas nacionais e internacionais interessadas no desenvolvimento de medicamentos a partir de plantas. Um total de 10 patentes foram depositadas oriundas dos projetos desenvolvidos, sendo duas delas aprovadas em diversos países. Finalmente, 13 teses de Mestrado e 4 de Doutorado foram defendidas na área de farmacologia pré-clínica de plantas medicinais e muitas outras estão em andamento.

tures of pathogenic *E. coli* caused fluid secretion in rabbit intestine, we have been aware that intestinal fluid secretion can be induced by enterotoxins. In 1978, one *E. coli* enterotoxin (STa) was shown to activate intestinal particulate guanylate cyclase and this activation led to intestinal fluid secretion. The human analogs of this enterotoxin guanylin and uroguanylin were described by Currie and Forte nearly 10 years ago. The roles for these human analogs are just being described. Evidence for some kind of fluid regulation has now been reported for nearly all organs of the GI tract as well as for the kidney. Preliminary data also suggest a role for these peptides in the brain and other organs. My laboratory has noted that, in both humans and in experimental animals, orally-administered NaCl loads can be excreted more rapidly than equivalent salt loads administered intravenously, suggesting that an enteric factor may be capable of acute regulation of renal function. Available evidence suggests that guanylin and uroguanylin may be the factors involved in this response. For example, human studies have demonstrated that plasma and urine levels of both peptides increase rapidly after oral NaCl treatment. In rats, we have recently shown that intestinal guanylin and uroguanylin mRNA levels increase rapidly after oro-gastric administration of NaCl. It has also been shown in specific gastrointestinal segments that salt-induced increases in protein levels correspond to the increased guanylin/uroguanylin mRNA levels. Intravenous infusion of guanylin or uroguanylin increase urine volume and NaCl excretion in both the anesthetized rats and mice, and in the isolated perfused rat kidney. Additionally, we have demonstrated that the putative guanylyl cyclase receptor for guanylin and uroguanylin is expressed by several renal tubules. These and other new findings have formed the basis for the introduction of two new natriuretic peptides as important human hormones.

CP 13

GUANYLINS: 10 YEARS DOWN THE ROAD.

Richard Greenberg, Belinda Mason Carden and Paul Mason - Department of Medicine, Division of Infectious Diseases, University of Kentucky Medical Center

Since De described in 1956 that whole broth cul-

Mini Conferências

MC 3

PAPEL DE AMINOÁCIDOS EXCITATÓRIOS E ÓXIDO NÍTRICO NA AVERSÃO.

Guimarães, F.S. Dep.
Farmacologia, Fac. Medicina de
Ribeirão Preto, USP, Ribeirão Preto,
SP.

A porção dorsal da substância cinzenta periaquedutal (SCPD) faz parte de um sistema hierárquico, que inclui o complexo amigdalóide e partes do hipotálamo, responsável pela elaboração de respostas defensivas frente a estímulos ameaçadores inatos e proximais. Microinjeções de aminoácidos excitatórios na SCPD de ratos levam a reações de fuga enquanto antagonistas de glutamato produzem efeitos ansiolíticos. Parte dos efeitos mediados por receptores NMDA de glutamato podem envolver um aumento na produção de óxido nítrico (NO). A administração de inibidores da enzima sintase do NO (NOS) na SCPD induzem efeitos ansiolíticos. Por outro lado, a injeção de doadores de NO, como o SIN-1, produzem reações de fuga semelhantes àquelas observadas após estimulação elétrica ou química do hipotálamo medial. Este tratamento também produziu intensa expressão da proteína c-Fos, utilizada como marcador de ativação neuronal, no próprio hipotálamo e em outras áreas relacionadas a reações defensivas, como o complexo amigdalóide e cíngulo. Como parte dos efeitos do NO envolve o aumento nos níveis de GMPc, nós mostramos que a administração na SCPD do 8-Br-GMPc, um análogo solúvel do GMPc, produz breve reação de fuga. Finalmente, verificamos que a exposição a episódios únicos ou repetidos de estresse de imobilização leva a aumento na expressão da NOS neuronal na própria SCPD e em outras regiões relacionadas a reações de defesa. No conjunto estes resultados sugerem que o NO pode participar na modulação de reações defensivas.
Apoyo Financeiro: FAPESP, CNPq

MC 5

MECANISMOS CELULARES DA EOSINOPOIESE EM MODELO ANIMAL DE HIPERREATIVIDADE BRONCOPULMONAR.

P. Xavier Elsas, Depto. Imunologia,
IMPPG-UFRJ

Recentemente demonstramos, em camundongos BALB/c (modelo experimental de hiperreatividade broncopulmonar), que a imunização com ovalbumina, seguida de provocação alérgica nas vias aéreas, aumenta seletivamente o número de eosinófilos ao nível da medula óssea (MO), assim como a capacidade de resposta às citocinas

eosinopoiéticas, GM-CSF, IL-3 e IL-5 em cultura de MO (1). Isto depende de mediadores circulantes liberados entre 2 h e 24 h após a provocação, evidenciados num protocolo de transferência de plasma. Em outros estudos sobre o efeito dos glucocorticóides (GC) em cultura de MO murina (2), a dexametasona (Dex) 10^{-7} - 10^{-8} M, aumentou: a) o número total de colônias mielóides, b) a fração destas culturas que efetivamente produz eosinófilos; c) o tamanho médio das colônias eosinofílicas puras. Dex (10^{-7} - 10^{-8} M) sozinha, ou Dex (10^{-12} M), na presença de GM-CSF, não tiveram efeito. Dex (10^{-6} - 10^{-10} M) aumentou a resposta in vitro dos precursores eosinofílicos à IL-5, em cultura líquida de MO. Dex in vivo (1-5 mg/kg, 2-24 h antes da coleta da MO) aumentou a formação de colônias em presença de GM-CSF, assim como a resposta dos precursores, em cultura líquida, à IL-5. O efeito potenciador in vivo de Dex foi abolido pelo pré-tratamento com o antagonista seletivo, RU486. Hidrocortisona, corticosterona e Dex apresentaram efeitos semelhantes. Visto as similaridades entre: a) a provocação alérgica; b) a exposição in vivo e in vitro à Dex; e c) a transferência de plasma de animais sensibilizados e provocados, avaliamos se GC liberados após a provocação alérgica preparam a MO para uma resposta aumentada à IL-5 em cultura. Os efeitos do plasma transferido de animais sensibilizados e provocados sobre a MO de animais normais foram bloqueados pelo RU486. O RU486 bloqueou também os efeitos da provocação alérgica na medula óssea dos doadores de plasma. Isto demonstra o envolvimento dos hormônios GC na modulação da MO pela provocação alérgica.

MC 6

AMP CÍCLICO COMO SINALIZADOR DA SINAPSE NEUROMUSCULAR ESQUELÉTICA. R. O. Godinho, Setor de Produtos Naturais, Escola Paulista de Medicina - UNIFESP, 04044-020, São Paulo, SP

Variações nas concentrações intracelulares do AMP cíclico são responsáveis pelo controle de diversos processos fisiológicos da fibra muscular esquelética, que incluem a modulação da contração, da expressão de proteínas sinápticas e do metabolismo celular. Dentre estes efeitos, estudos realizados em nosso laboratório mostraram a participação do AMP cíclico no aumento da expressão da enzima acetilcolinesterase (AChE), induzido pelo *peptídeo relacionado ao gene da calcitonina* (CGRP). A ativação dos receptores de CGRP promove o aumento transitório da AChE muscular mediado pelo aumento, também transitório, do AMP cíclico intracelular (da Costa Jr et al., Br J Pharmacol, 133:229, 2001). O acúmulo transiente do AMP cíclico também é obser-

vado após estimulação direta da AC, indicando que eventos posteriores à ativação do sistema receptor/Proteína Gs/AC seriam responsáveis pela redução do AMP cíclico intracelular. Esta redução do AMP cíclico intracelular, após a ativação direta ou indireta da AC, foi correlacionada ao aumento do AMP cíclico extracelular, indicando a existência de um mecanismo de extrusão do AMP cíclico na fibra muscular esquelética, que contribuiria para a regulação temporal da sinalização mediada por receptores acoplados à Proteína G/AC.

MC 7

ROLE OF P38 MAPK AND LEUKOCYTE SPECIFIC PROTEIN 1 (LSP1) IN CHEMOKINE-INDUCED EMIGRATION AND CHEMOTAXIS IN VIVO. Denise Carmona Cara. Departamento de Patologia Geral – ICB-UFMG

Leukocyte recruitment is a hallmark feature of the inflammatory response and involves a sequential series of molecular interactions between the leukocyte and endothelial cells. First leukocytes in the mainstream of blood flow come into contact with the endothelium and roll along the endothelial surface via a group of molecules termed the selectins. Next rolling leukocytes are activated by pro-inflammatory molecules presented on the endothelial surface to firmly adhere to the endothelium via integrins. Once adherent, leukocytes then emigrate out of the vasculature and respond to directional (chemotactic) stimuli that guide them to the inflammatory source. Selectins, integrins and chemotactic factors show a close relationship with cytoskeleton and exert an important role as signal-transducing receptors, activating different biochemical pathways, including the mitogen-activated protein kinase cascade. In the MAPK cascade, p38MAPK phosphorylates F-actin binding proteins including LSP1, which is involved in neutrophil cytoskeletal. Using intravital microscopy and a novel in vivo chemotaxis assay system, we were able to visualize the leukocyte rolling, adhesion, emigration and directional migration toward a source of chemotactic factor in the extravascular tissue of the cremaster muscle. In this lecture the results regarding to the reduction of emigration and directed movement induced by KC in p38 MAPK inhibitor treated mice and LSP1 ko mice will be presented..

MC 8

FARMACOLOGIA CELULAR E MOLECULAR DO METABOLISMO DE PEPTÍDEOS. Emerson S. Ferro, Departamento de Histologia e Embriologia, Programa Biologia Celular Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 05508-900, São Paulo, SP; eferro@usp.br

Peptídeos são produzidos pelas células a partir de proteínas sintetizadas especificamente para esta finalidade, ou como sub-produtos do metabolismo protéico. Muitos dos produtos formados

no primeiro caso são conhecidos agentes moduladores da comunicação celular (neuropeptídeos), e contribuem assim para a manutenção da homeostase de organismos vivos. No segundo caso, em compartimentos outros que não aqueles especializados em degradação proteica, mecanismos celulares específicos induzem proteínas a digestão limitada, gerando peptídeos intermediários, dos quais muitos são totalmente desconhecidos. As enzimas envolvidas na síntese e metabolismo de neuropeptídeos, bem como os locais onde esse processo ocorre, são bem conhecidas e sua manipulação tem importante impacto terapêutico. Por outro lado, pouco se conhece sobre os processos da digestão de sub-produtos protéicos, ou da possível função dos peptídeos intermediários formados nessa etapa do metabolismo. Em nosso laboratório temos nos empenhado na investigação de diferentes aspectos do metabolismo de peptídeos, como a distribuição subcelular e a rota de secreção não convencional das metalo-endooligopeptidases EC 3.4.24.15 e EC 3.4.24.16. Identificamos ainda, utilizando o *two hybrid system*, várias proteínas de potencial interação com a EC 3.4.24.15 no cérebro de ratos. Mais recentemente, utilizando enzimas inativadas por mutação sítio-dirigida, desenvolvemos uma metodologia que permitiu o isolamento e caracterização de novos peptídeos com potencial atividade farmacológica.

Apoio financeiro: FAPESP, CNPq e CAPES

MC 9

LIPID MEDIATORS REGULATE CYTOKINE RELEASE FROM EOSINOPHILS

Christianne Bandeira-Melo, PhD
Laboratório de Imunofarmacologia, Departamento de Fisiologia e Farmacodinâmica – FIOCRUZ/Rio de Janeiro, RJ – Brasil. (cbmelo@gene.dbbm.fiocruz.br)

We have recently reported that interleukin (IL)-16, eotaxin and RANTES stimulate vesicular transport-mediated release of preformed, granule-derived IL-4 and RANTES from eosinophils, as well as, the synthesis at intracellular lipid bodies of LTC₄, the dominant 5-lipoxygenase-derived eicosanoid in eosinophils. Then, we investigated whether cysteinyl leukotrienes (cysLTs – LTC₄/D₄/E₄) are intracrine signal transducers that regulate human eosinophil degranulation mechanisms of cytokine release. 5-Lipoxygenase inhibitors blocked IL-16-, eotaxin- and RANTES-induced IL-4 release; but neither exogenous LTC₄, LTD₄ nor LTE₄ elicited IL-4 release. Only after membrane permeabilization enabled cysLTs to enter eosinophils did LTC₄ and LTD₄ stimulate IL-4, but not RANTES, release. LTC₄-elicited IL-4 release was pertussis toxin inhibitable, but inhibitors of the two known G protein-coupled cysLT receptors (cysLT1, cysLT2) did not block LTC₄-

elicited IL-4 release. LTC₄ was 10 fold more potent than LTD₄ and at low concentrations (0.3-3 nM) elicited, and at higher concentrations (>3 nM) inhibited, IL-4 release from permeabilized eosinophils. Likewise with intact eosinophils, LTC₄ export inhibitors, that increased intracellular LTC₄, inhibited eotaxin-elicited IL-4 release. Thus, LTC₄ acts, via an intracellular cysLTR distinct from CysLT1 or CysLT2, as a signal-transducer to selectively regulate IL-4 release. These results demonstrate that LTC₄, well-recognized as a paracrine mediator, may also dynamically govern inflammatory and immune responses as an intracrine mediator of eosinophil cytokine secretion.

MC 10

CRITÉRIOS PARA APROVAÇÃO DE NOVOS MEDICAMENTOS. Regina Scivoleto; Prof. Titular Aposentada de Farmacologia ICB/USP; Coordenadora da Câmara de Assessoria Técnica em Medicamentos.

Os critérios para o registro de novos medicamentos englobam a análise de documentação técnico-científica completa do produto o que não ocorre com os medicamentos similares e genéricos. Nessa documentação devem constar dados das boas práticas de fabricação, ensaios pré-clínicos de farmacologia, a toxicologia e ensaios clínicos fases 1, 2 e 3 segundo as recomendações da Conferência Internacional de Harmonização (ICH). Os ensaios conduzidos no Brasil, mesmo que ainda em andamento, deverão ser anexados para a análise. Para produtos já comercializados por tempo suficiente, para a avaliação de risco/benefício na população (pós-comercialização) são solicitados, quando pertinentes, dados de atualização de segurança ou grandes ensaios. Os dados científicos devem ser acompanhados pelo maior número de crivos disponíveis que, na maioria dos casos, são representados por publicações científicas.

O processo de registro é analisado, inicialmente, pela equipe farmacotécnica da ANVISA e enviado para um ou mais especialistas na área (Assessores "ad-hoc") ou para a Sociedade Médica correspondente. Após essas etapas, o processo é analisado e discutido pela CTAME (Câmara Assessora Técnico-científica em Medicamentos) que é constituída por 8 membros especialistas escolhidos pelo Diretor Presidente da ANVISA. Embora, pela legislação brasileira, o produto só possa ser registrado após a aprovação e comercialização em seu país de origem, a sua análise poderá ocorrer simultaneamente aqui, no país de origem e em outros países. Em tempos de globalização discute-se o conceito de país de origem. Não há, ainda, medicamento novo desenvolvido no Brasil.

Simpósios

SP 01.3

MICRODIALYSIS AS A TOOL FOR PHARMACOKINETIC EVALUATION OF FREE DRUG LEVELS.

Teresa Dal-la Costa, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre - RS, Brazil.

Introduction Plasma concentrations of drugs are only indirectly related to their efficacy. The free concentrations in the interstitial space, at the site of action, are responsible for the effect. Microdialysis (MD), allows the determination of free drug levels without altering the physiology of the tissue under investigation and has been used to investigate drugs at various tissues and organs. Specifically, it was used to investigate tissue concentrations of antibiotics after administration to healthy and infected animals.

Methodology Free tissue levels of β -lactam antibiotics (piperacillin, ceftriaxone, cefaclor) and quinolones (norfloxacin) were investigated by MD in healthy rat thigh muscle after iv bolus or iv infusion. Free cefaclor was also determined in lung, simultaneously. Piperacillin free levels in muscle were investigated in immunocompromised *Escherichia coli* infected rats. Concentrations in plasma and tissues, measured simultaneously in the same animal and analyzed by HPLC, were correlated. MD probe recoveries were determined by the point of no net flux method or by retrodialysis.

Results A good agreement between measured and predicted free tissue levels based on plasma data was obtained for most drugs. For cefaclor, the results showed similar free drug profiles in lung and muscle, lower than the respective plasma levels. Lower free tissue levels were also observed for norfloxacin. For both drugs, a proportionality factor was used to fit plasma and tissue data simultaneously. Free piperacillin concentrations were lower at the infection site compared to the levels determined in healthy rats.

Conclusions MD is a helpful tool to investigate free antibiotic concentrations in tissues. The use of total plasma concentrations instead of the active free levels at the infection site overestimate the antibacterial potency of the drug.

SP 01.4

USE OF *IN VITRO* - *IN VIVO* CORRELATION FOR THE QUALITY CONTROL OF GENERIC DRUG PRODUCTS.

Nadia Maria Volpato

In vitro - *in vivo* correlations (IVIVC) refer to relationships between *in vitro* dissolution and *in vivo* input rate for solid oral dosage forms. Classically dissolution testing is considered as a powerful and useful method for determining product quality and sometimes to evaluate the clinical performance of dosage forms, mainly for extended release drug products.

The utility of *in vitro* dissolution as a surrogate for *in vivo* bioavailability is

very attractive, however, we have to be sure that the dissolution test effectively predicts the *in vivo* performance of drug products. Such validation is performed through the establishment of experimental conditions that allow a good IVIVC. For immediate release dosage forms containing class II drugs (low solubility and high permeability according to the Biopharmaceutics Classification Scheme) it should be possible to establish strong IVIVC, as dissolution is the rate-limiting step in absorption and appearance of the drug in systemic circulation. This case will be illustrated by a level A correlation between bioavailability and dissolution data for nimesulide immediate release tablets. Four categories of IVIVC have been described in the literature, namely levels A, B, C and multiple C, categorized in descending order of usefulness and of ability to describe the input of drug absorption.

Generally, IVIVC should be developed using two or more formulations with different release rates. A pilot bioavailability study should be conducted to determine the *in vivo* plasma concentration profile for each formulation. From these data the *in vivo* absorption profile is obtained and plotted against the *in vitro* dissolution profile in order to obtain a correlation. Important aspects of the quality assurance of a generic drug product include the ability to confirm that the correct manufacturing procedures have been followed for a given batch, that batch-to-batch reproducibility of the product meets regulatory requirements, and that the product performs adequately throughout its shelf-life. Brazilian government, through the policies of ANVISA/MS, proposed a guidance for IVIVC inside the generic products legislation, in an attempt to provide tools enabling the pharmaceutical industry to better control the quality of its medicines. If an IVIVC has been proven, simple *in vitro* dissolution tests can replace more complex biostudies when minor manufacturing changes are necessary.

SP 02.2

PARTICIPATION OF ENDOTHELINS IN THE MEDIATION OF IMMUNE PAIN.

Rae, G.A. Dept. of Pharmacology CCB, UFSC, Florianópolis, SC, Brazil.

Endothelins (ETs) cause nociception, hyperalgesia and oedema in mice via stimulation of local ETA receptors of the hindpaw. However, knockout of ETB receptors also reduces pain in some models. We have investigated if immunological stimulation can recruit endogenous ETs to cause pain. To this effect, we found that local ETA (but not ETB) receptor blockade reduced hyperalgesia, but not pain or oedema, triggered by hindpaw mast cell degranulation with compound 48/80 (C48). On the other hand, ET-1-induced pain, hyperalgesia to capsaicin and oedema were significantly inhibited by mast cell depletion by repeated C48, or pretreatment with dexamethasone, pyrilamine, cyproheptadine and indomethacin. In sensitised mice, challenge with ovalbumin (OVA) induced robust nociceptive responses in sensitised mice over the first 60 min after i.pl.

injection. This effect was reduced by bosentan (mixed ET_A/ET_B receptor antagonist) and A-127722 (selective ET_A receptor antagonist), whereas A-192621 (selective ET_B receptor blocker) actually potentiated nociception induced by antigen. OVA-induced hyperalgesia (i.e. potentiation of capsaicin-induced nociception) was also prevented by mixed ETA/ATB or ETA receptor blockade. Thus, mast cells play a major role in ET-1-induced nociception, hyperalgesia and oedema in the mouse paw. In addition, ET receptor activation contributes importantly towards nociception induced by immune mechanisms in sensitised animals and hyperalgesia (but not nociception or oedema) induced by C48 in non-sensitised mice. Supported by CNPq, FAPESP and CIHR-Canada.

SP 02.4

PERSISTENT HYPERALGESIA AND CYTOKINES.

Daniela Sachs

It has been previously described that daily intraplantar (i.pl.) injections of prostaglandin E2 (PGE2) and dopamine in rats for 14 days cause the development of a persistent hyperalgesia state lasting more than 30 days. During inflammation, the presence of foreign material in, or injury to, tissue induces an early response that can be envisaged as an "alarm reaction" in which resident cells appear to play a pivotal role in the development of inflammatory hyperalgesia. Although the "final" peripheral hyperalgesic mediators may be either a prostaglandin or sympathomimetic amine, the release of these hyperalgesic agents are mediated by cytokines. To provide further understanding about the mechanism involved in the induction of persistent hyperalgesia, during inflammation, we investigated whether interleukin-1 β (IL-1 β), IL-8 or tumour necrosis factor- α (TNF α) are able to induce persistent hyperalgesia. Daily i.pl. administration of TNF α , IL-1 β or IL-8 for 18 days led to persistent hyperalgesia, which lasted at least 30 days after the cessation of treatment. It was also observed that daily treatment of the animals with indomethacin and atenolol prevented the induction of persistent hyperalgesia by IL-1 β and IL-8, respectively. The daily co-treatment of TNF α with the combined treatment, indomethacin plus atenolol, abolished the induction of the persistent hyperalgesia by TNF α . In conclusion, our results suggest that IL-1 β - and IL-8-induced persistent hyperalgesia results from the endogenous release of eicosanoids and sympathomimetic amines, respectively. However, TNF α -induced persistent hyperalgesia results from the concomitant endogenous release of eicosanoids and sympathomimetic mediators.

SP 03.3

SUBCELLULAR TRAFFICKING OF THE CELLULAR PRION PROTEIN.

Marco A. M. Prado, Departamento de Farmacologia, UFMG.

The cellular prion protein (PrP^{Sc}) is a glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored membrane protein whose conformational altered forms (PrP^{Sc}) are known to cause neurodegenerative diseases. Trafficking of PrP^{Sc} is poorly understood, thus a green fluorescent protein (GFP)-tagged PrP^{Sc} was used to study PrP^{Sc} internalization in living cultured cells (SN56). The recombinant protein was functional and its distribution pattern was similar to that of endogenous PrP^{Sc}. Confocal microscopy and organelle specific markers suggest that the protein is found in both the Golgi and endosomal compartments. Comparison of the steady-state distribution of GFP-PrP^{Sc} and two N-terminal deletion mutants (Δ32-121 and Δ32-134) show that the mutant proteins accumulated in the plasma membrane at the expense of decreased labeling in the Golgi/recycling endosomal compartment. Moreover, GFP-PrP^{Sc}, but not the mutants, internalized from the plasma membrane in response to Cu²⁺ treatment and accumulated in this perinuclear region. Perturbation of endocytosis with a dynamin I-K44A dominant-negative mutant altered the steady-state distribution of the GFP-PrP^{Sc}, leading to the accumulation of fluorescence in unfissioned endocytic intermediates, and blocked Cu²⁺ induced internalization. These pre-endocytic intermediates did not accumulate GFP-GPI, a minimum GPI-anchored protein, suggesting that PrP^{Sc} trafficking does not depend solely on the GPI-anchor. Internalized GFP-PrP^{Sc} accumulates in Rab5 positive endosomes and a Rab5 mutant altered the steady-state distribution of GFP-PrP^{Sc}. Therefore, it is concluded that PrP^{Sc} internalizes via a dynamin-dependent endocytic pathway and that PrP^{Sc} is targeted to the recycling endosomal compartment via Rab5 positive early endosomes. These observations indicate that trafficking of GFP-PrP^{Sc} is not determined predominantly by its GPI-anchor.

SP 04.4

CARACTERIZAÇÃO DA ELASTASE-2 DE RATO: UMA ENZIMA FORMADORA DE ANGIOTENSINA II. Carlos Ferreira dos Santos*, Eduardo Brandt de Oliveira[#], Andrew Seth Greene**, Maria Cristina de Oliveira Salgado[†] * Faculdade de Odontologia de Bauru – Universidade de São Paulo -[#] Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo - ** Medical College of Wisconsin

Uma elastase-2 foi recentemente descrita como a principal enzima formadora de angiotensina (Ang) II no perfusato do leito arterial mesentérico (LAM) isolado de rato. Investigamos a interação dessa elastase-2 do perfusato do LAM isolado de rato (E-2LAMR) com alguns substratos e inibidores de elastases-2 e de quimases formadoras de Ang II. Os resultados confirmaram e estenderam as similaridades enzimológicas entre

elastases-2 pancreáticas e a E-2LAMR. Além disso, a interação até então desconhecida da E-2LAMR com [Pro D-Ala¹²]-Ang I e CH 5450, ambos considerados como reagentes seletivos para quimases, sugere que as evidências para a formação de Ang II *in vivo* por quimases podem ter sido superestimadas em investigações prévias sobre vias geradoras de Ang II. Experimentos realizados com o LAM isolado de rato analisando o efeito vasoconstritor de Ang II, Ang I, substrato tetradecapeptídeo da renina e [Pro¹¹-D-Ala¹²]-Ang I mostraram a existência de uma via independente da ECA, a qual é sensível à quimostatina e Ac-AAPL-CK. Entre os possíveis candidatos para essa via alternativa à enzima conversora de angiotensina (ECA) aparece a E-2LAMR, uma enzima que não é inibida por captopril e que é sensível à quimostatina e Ac-AAPL-CK, um inibidor seletivo de elastases-2. Esses dados em conjunto sugerem um possível papel para a E-2LAMR, mas não quimases, como uma via alternativa à ECA para a geração de Ang II no LAM isolado de rato. A clonagem e o seqüenciamento do cDNA para a E-2LAMR foram alcançados pela combinação de transcrição reversa e reação da polimerase em cadeia. A seqüência do cDNA mostrou-se idêntica à do cDNA para a elastase-2 pancreática de rato. O RNA_m para a E-2LAMR foi expresso em LAM, pâncreas, pulmão, coração, rim, fígado e baço, mas não em aorta de rato. Células endoteliais do LAM em cultura expressaram o RNA_m para a E-2LAMR e sintetizaram a enzima. Em conclusão, a localização intravascular dessa enzima e sua habilidade em formar Ang II e não clivar esse peptídeo indicam que ela poderia ter uma participação significativa como um agente formador de Ang II no sistema cardiovascular

SP 05.1

EQUIVALÊNCIA FARMACÊUTICA. Gerson Antônio Pianetti - Faculdade de Farmácia da UFMG

A Equivalência Farmacêutica é o produto de estudo aprofundado para determinar a semelhança mínima necessária entre dois medicamentos que pretendam ser intercambiáveis.

É o primeiro passo para o estudo de bioequivalência, pois confere ao pesquisador a certeza de que a farmacotécnica do medicamento não será o fator limitante de sua absorção pelo organismo.

O estudo de distribuição do fármaco no organismo humano deve ser precedido da certeza de que a forma farmacêutica atende em nível de qualidade todos os parâmetros farmacopeicos e que a reprodutibilidade de lotes esteja garantida. Os parâmetros a serem observados neste tipo de estudos trazem o rigor da pesquisa científica e determina não só a qualidade que se espera do produto comercializado, bem como define que o mesmo possa ser substituído pelo seu produto de referência.

SP 06.1

ROLE OF NONSPECIFIC DOPAMINE UPTAKE BY NOREPINEPHRINE TRANSPORTER: IMPLI-

CATIONS ON COCAINE REINFORCEMENT IN DAT-KO MICE AND DOPAMINE TRANSMISSION IN NAÏVE RATS.

Ezio Carboni Ph.D. - Department of Toxicology, University of Cagliari, Via Ospedale 72, 09124 Cagliari, Italy. ecarboni@unica.it

On the basis of behavioral and biochemical studies, dopamine (DA) has been attributed an important role in the reinforcing and addictive properties of drugs of abuse. In particular cocaine and amphetamine preferentially increase extracellular DA concentration in the nucleus accumbens (NAcc) as compared to the caudate putamen (CPu) when measured by brain microdialysis in freely moving rats. Recently the DA reinforcing hypothesis has been challenged on the basis of the report that mice genetically lacking the plasma membrane dopamine transporter (DAT-KO) still self-administer cocaine. In these mice cocaine does not produce any increase of extracellular DA concentration (DA output) in the CPu. We instead observed through "in vivo" microdialysis that cocaine and amphetamine increased significantly dialysate DA in the medial part of the NAcc of both DAT-KO and wild type mice. Cocaine did not increase dialysate DA in the CPu. In addition, reboxetine, a specific blocker of the norepinephrine transporter (NET), increased DA output in the NAcc of DAT-KO but not of wild mice while GBR 12909 a specific blocker of DAT increased dialysate DA in the NAcc of wild but not of DAT-KO mice. These observations provide an explanation for the persistence of cocaine reinforcement in DAT-KO mice and support the hypothesis of a primary role of NAcc DA in drug reinforcement. We investigated further the possibility that NET could reuptake DA in several rat brain areas. To this end we studied the effect of reboxetine on DA output in the NAcc shell, NAcc core, CPu, bed nucleus of stria terminalis (BNST) and prefrontal cortex (PFCx) after blockade of DAT by the preliminary administration of GBR 12909. Results show that the administration the above drug combination, produced an increase of DA output in the nucleus accumbens shell (+ 430 % above basal) greater than the one obtained by the administration of GBR 12909 alone (+ 300 % above basal). On the contrary reboxetine did not increase further the output produced by GBR in the NAcc core and in the CPu, areas lacking of a consistent noradrenergic innervation. A cumulative effect of DAT and NET blockade on extracellular DA was also observed in the BNST an area involved in the acquisition and expression of emotions where noradrenergic and dopaminergic innervations coexist. On the other hand in PFCx where similar innervation pattern is present, reboxetine but not GBR 12909 increased DA output, confirming a major role of NET in DA clearance from extracellular space. In conclusion this study shows that DA can be removed from synaptic space by NET even in areas where the DAT is predominant when the latter is pharmacologically blocked. This mechanism may have relevance in psychostimulant dependence as well as in antidepressant therapy

SP 06.2

IS MAZINDOL A MILD AND HARMLESS PSY-

CHOSTIMULANT? A VIEW FROM EXPERIMENTAL MODELS. Reinaldo N. Takahashi. Departamento de Farmacologia, CCB, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis SC.

Mazindol is an anorectic drug extensively used in Brazil. It is known to act primarily by inhibiting dopamine uptake by brain dopamine transporters (DAT). Although there is abundant evidence demonstrating behavioral effects of potent psychostimulants such as cocaine and amphetamine, there is a paucity of information regarding mazindol effects. This presentation will focus on some animal studies carried out in our laboratory. In rodents, acute administration of mazindol was found to increase the locomotor activity, to possess rewarding effects as measured in the place preference conditioning, to induce antinociceptive action in the formalin test and to facilitate a learning task in the elevated T-maze. Combined treatment of mazindol plus ethanol resulted in a greater increase in locomotor activity of mice than either drug alone. No such interactive effect was detected in the place preference and in the plus-maze test of anxiety. Recently, the effects of repeated administration of mazindol were examined in two rats lines bred for contrasting exploratory activities. Mazindol developed sensitization to its locomotor stimulatory effect, but no differences were detected between Floripa High and Floripa Low rat lines. The same drug and schedule of treatment failed to induce significant responses in the plus-maze test in both rat lines. Overall, most of these results appear to be similar to that induced by cocaine and related stimulants. However, studies examining mazindol self-administration have reported mixed findings. Thus, the determinants of mazindol misuse will be discussed in light of these findings.

SP 07.1

BIOLOGY OF EOSINOPHIL APOPTOSIS. Adriano G Rossi - Respiratory Medicine Unit, Centre for Inflammation Research, Department of Medicine, University of Edinburgh Medical School, Teviot Place, Edinburgh, EH8 9AG, UK

Although it is well established that eosinophilic granulocytes are key effector cells in host defence against invading parasites, over-recruitment, uncontrolled activation and defective removal of these cells play a prominent role in the initiation and propagation of chronic inflammatory conditions including asthma and allergic rhinitis. Eosinophil apoptosis occurs as part of the normal resolution process rendering these cells unresponsive to further stimulation and allowing recognition by phagocytes (e.g., macrophages) via a 'silent' mechanism that does not cause the release of pro-inflammatory mediators. Although there is little doubt that apoptosis plays a critical role in embryological morphogenesis and tissue remodelling, its precise role in eosinophilic inflammatory diseases has not been fully elucidated. Thus the involvement of eosinophil apoptosis in inflammatory disease will be discussed and the hypothesis that selective induction of eosinophil apoptosis and augmented non-phlogistic removal of apoptotic eosinophils by phagocytes as a potential therapeutic target is proposed. Evidence

showing that inflammatory mediators and pharmacological agents can specifically modulate eosinophil apoptosis together with potential mechanisms of action will be discussed. For example, evidence will be presented indicating a role for NF- κ B activation and specific arachidonate metabolites (e.g., PGD₂, D12PGJ₂ and 15dPGJ₂) in the regulation of eosinophil apoptosis. Thus we believe that by defining the mechanisms that selectively modulate eosinophil apoptosis together with those that promote phagocyte clearance of apoptotic eosinophils will provide the scientific foundation for innovative approaches to the therapy of human eosinophilic diseases.

SP 07.3

IgE/MAST CELL SYSTEM AND THE RECRUITMENT OF EOSINOPHILS IN ALLERGIC CONDITIONS. Lima, MCR; Silva, PMR and Martins MA. Departamento de Fisiologia e Farmacodinâmica, Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil.

Studies in animal models have contributed greatly to understanding the mechanisms of eosinophilic inflammation. In general, systems involving a single cycle of passive IgE sensitisation and antigen challenge failed to evoke eosinophil accumulation. In this study, we postulated that repeated cycles of IgE passive sensitisation and antigen challenge may play a role in up-regulating eosinophil response in allergic conditions. Antigen-mediated stimulation of the pleural cavity of rats passively sensitised with a single injection of IgE anti-DNP resulted in mast cell degranulation, increase in vascular permeability and mild neutrophilia, but no eosinophilia. In contrast, a 2nd cycle of sensitisation and challenge, performed within 7 days, showed a marked eosinophilia in parallel with a lower plasma leakage and comparable neutrophilia. We found an increase in eotaxin levels in animals subjected to two rather than one cycle of sensitisation and challenge. Furthermore, treatment with the PAF receptor antagonist BN 52021 or with the lipoxygenase inhibitor zileuton prevented allergen-evoked eosinophil accumulation in rechallenged animals. IgE-dependent eosinophilia was not reproduced when (i) IgE sensitisation or antigen challenge was omitted in the 1st cycle, or (ii) the 1st cycle was replaced by either a histamine and 5-HT dual challenge or PAF challenge. Interestingly, cells expressing IL-4 were detected after the 1st and 2nd challenges. Stimulation with IL-4, instead of the 1st cycle of sensitization and challenge, up-regulated eosinophil response caused by IgE plus DNP challenge 7 days later. Our results indicate that repeated cycles of IgE-driven inflammation may lead to eosinophil accumulation in a mechanism dependent on IL-4, eotaxin, PAF and leukotrienes. Support: CNPq and APERJ

SP 07.4

ALLERGIC SENSITIZATION PREVENTS UPREGULATION OF HAEMOPOIESIS BY CYCLO-OXY-

GENASE INHIBITORS IN MICE. ¹Lin-tomen, L., ¹Elsas, M.I.G., ²Maximiano, E.S., ¹Neto, H.A.P., ¹Garcia, K.M., ³Vargafitg, B.B., ²Elsas, P.X. ¹IFF/FIOCRUZ, ²Depto. de Imunologia,UFRJ, ³Unité de Pharmacologie Cellulaire, Institut Pasteur

Recent findings from our laboratory raise the possibility that eosinopoiesis is regulated by mechanisms involving endogenous prostanoid production, and therefore can be modulated by cyclooxygenase inhibitors. It is well-established that indomethacin (INDO) upregulates hemopoiesis and protects bone-marrow (BM) from radiation damage, while allergenic sensitization and challenge upregulate responses to hemopoietic cytokines in murine BM. So, we decided to investigate whether immunization affects BM responses to INDO and aspirin (ASP). Cultures were established from BM cells of: a) naive; b) ovalbumin (OVA)-sensitized, saline-challenged; or c) OVA-sensitized, OVA-challenged BALB/C mice. Semi-solid cultures with GM-CSF and liquid cultures with IL-5, were established alone or with INDO (10⁻⁷-10⁻¹¹M) or ASP (10⁻⁷-10⁻⁹M). Total myeloid colony numbers and numbers of EPO+ cells were determined after at day 7. INDO (10⁻⁷-10⁻⁹M) increased GM-CSF-stimulated myeloid colony formation and eosinophil precursor responses to IL-5 in naive mice. However, it had no effect on BM of ovalbumin-sensitized and challenged mice. ASP (10⁻⁷M) had similar effects, equally abolished by sensitization. INDO was effective on BM cells from sham-sensitized, ovalbumin-challenged, but not from sensitized, saline-challenged mice. The effect of INDO in naive mice was abolished by transfer of plasma or of spleen cells from immune donors, and was not prevented by removal of antibody from immune plasma. Upregulation of haemopoiesis by INDO required adherent cells from naive bone-marrow. These observations point to the immune status of the host as a critical determinant of the effectiveness of anti-inflammatory drugs. PAPES, FINEFCNPq/RHAE, INSERM, CAPESCO-FECUB, FIOCRUZ/APERJ and PIBIC-CNPq

SP 07.5

MOBILIZAÇÃO DE PROGENÓRES HEMATOPOIÉTICO PARA O PULMÃO EM UM MODELO EXPERIMENTAL DE IMPLANTE ECTÓPICO DE TECIDO PULMONAR. ¹Maximiano, E.S., ¹Elsas, M.I.G., ²Joseph, D., ³Elsas, P.X., ²Vargafitg, B.B. ¹IFF/FIOCRUZ, ²Unité de Pharmacologie Cellulaire, Institut Pasteur, ³Depto. de Imunologia,UFRJ,

A asma cursa com obstrução reversível das vias aéreas (VA), envolvendo mecanismos inflamatórios agudos que podem ser desencadeados por alérgenos inalados. Resultados de nosso laboratório, sugerem que a provocação alérgica das VA pela ovalbumina (OVA) tem efeitos marcados e rápidos sobre a linhagem eosinofílica na medula óssea (MO), por meio de um mediador circulante. Estudamos progenitores eosinofílicos não da MO, mas do tecido pulmonar (TP), de onde poderiam responder a estímulos alérgicos e farmacológicos que exercem ações importantes na MO. Tal estudo foi possível pelo desenvolvi-

mento, em nosso laboratório, de métodos para isolar e quantificar progenitores e precursores eosinofílicos no TP de animais alérgicos (Chest, in press). Para estudar uma possível função endócrina do TP, realizamos experimentos com implante ectópico de TP, no qual o tecido de doadores sensibilizados e provocados com OVA liberariam in vivo substâncias capazes de promover a migração de progenitores hematopoiéticos para o pulmão dos animais recipientes. Nossos resultados mostraram que o pulmão age como um tecido endócrino, produzindo mediadores que levam à acumulação intrapulmonar de progenitores hematopoiéticos no pulmão dos animais recipientes.

SP 08.1

ROLE OF ANGIOTENSIN II IN ENDOTHELIAL DYSFUNCTION. Vicente Lahera. Department of Physiology. Universidad Complutense. Madrid. Spain.

Hypertension is associated with functional and structural alterations of the arterial wall, which seem to be responsible for most of the vascular complications of hypertension. Endothelial dysfunction has been proposed as the most important vascular alteration in hypertension, which leads to the development of arteriosclerosis and organ damage. Hypertensive endothelial dysfunction has been mainly characterized by reduced endothelium-dependent relaxations and enhanced endothelium-dependent contractions. Diminished availability of nitric oxide (NO) seems to be a major cause for reduced endothelium-dependent relaxations. Enhanced vascular production of reactive oxygen species, specifically superoxide anions, has been reported to be an important mechanism responsible for NO inactivation in hypertensive conditions. Diminished eNOS mRNA and protein expression and activity have been proposed as other possible mechanisms accounting for reduced NO in experimental hypertension. In addition, exaggerated production of vasoconstrictor factors such as endothelin-1 and thromboxane A₂ could also account for reduced endothelium-dependent relaxations in hypertension.

Several studies in hypertensive animals and patients showed that antihypertensive treatment was able to enhance endothelium-dependent relaxations and reduced arterial wall thickness. However, the simple reduction of elevated arterial pressure seems not to be the only mechanism responsible for the beneficial effects of antihypertensive drugs. ACE inhibitors, angiotensin II receptor antagonists (ARA II), as well as certain calcium channel blockers, have been demonstrated as the most efficacious antihypertensive drugs in ameliorating endothelial dysfunction and vascular remodeling. The mechanisms responsible for the beneficial effects exerted by the mentioned antihypertensive drugs have been extensively investigated. Several studies, using a variety of experimental approaches, suggested an increased availability of NO produced by A₁ T₁

receptor antagonists in hypertensive rats as a major mechanism leading to the improvement of endothelial dysfunction. This could be consequence of either blockade of angiotensin II actions through AT₁ receptors or to activation of AT₂ receptors. We recently demonstrated an increase in eNOS mRNA expression in aorta from SHR treated with candesartan, which support the concept that the effect of ARA II is produced at gene level. Other studies showed that losartan was able to reduce both vascular generation of superoxide anions and elevated NAD(P)H expression. Moreover, treatment with candesartan increased hepatic GSH/GSSG ratio and reduced MDA levels, without affecting either GSHPx or GSHRed, further supporting the effects of AT₁ receptor antagonists on reactive oxygen species. Finally, an additional mechanism underlying the amelioration of endothelial dysfunction could also depend on the reduction of endothelium-dependent contraction produced by ARA II. In conclusion, many published data support the critical role of A II in the development and maintenance of endothelial dysfunction in hypertension and in the progression of arteriosclerosis.

SP 08.3

ENDOTHELIN RECEPTOR ANTAGONISTS: ANOTHER POTENTIAL ALTERNATIVE FOR CARDIOVASCULAR DISEASES Rita C.A. Ôstes Department of Pharmacology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo - São Paulo, SP, Brazil

Endothelin-1 (ET-1), the predominant isoform of the endothelin peptide family, has potent vasoconstrictor, mitogenic, proinflammatory and antidiuretic properties which have been implicated in the pathophysiology of a number of cardiovascular diseases. ET-1 effects are mediated through activation of ET A and ETB receptors, members of the G-protein-coupled receptors family, which are found in a variety of cells, including endothelial, vascular smooth muscle and mesangial cells. Overexpression of ET-1 has been consistently described in salt-sensitive models of hypertension and in models of renal failure and it has been associated with disease progression. The development of a range of peptidic and non-peptidic ET-1 receptor antagonists represents an exciting breakthrough in cardiovascular therapeutics and these drugs are currently used in pre-clinical and clinical trials. Endothelin antagonists improve endothelium-dependent relaxation, ameliorate vascular and cardiac hypertrophy as well as glomerulosclerosis. An interesting observation is that these beneficial effects of ET-1 antagonists seem to occur independent of a reduction in blood pressure levels. Comparison between selective ET A and combined ET A/ETB antagonists in experimental models of cardiovascular diseases reveal no differences in terms of their effects on blood pressure, LV hemodynamics or remodeling. On the other hand, in salt-sensitive

hypertension, ETA receptor blockade prevents vascular hypertrophy and ameliorates renal function; these effects involve ETB receptor, considering that concomitant blockade of ETB receptors prevents the beneficial effects of ETA antagonists. Collectively, these data indicate that ET-1 receptor antagonists might be of therapeutic interest to prevent hypertension induced end-organ damage; however, the efficacy of selective ETA vs dual ETA/ETB blockade to prevent target organ injuries in man still remains to be investigated.

SP 09.1

IMPORTÂNCIA DA HIPERGLICEMIA PÓS-PRANDIAL NAS COMPLICAÇÕES VASCULARES DO DIABETES MELLITUS- Marília de Brito Gomes - UERJ.

O diabetes mellitus (DM) pode ser considerado no momento atual um sério e crescente problema de saúde pública em países desenvolvidos e em desenvolvimento. De acordo com as projeções da Organização Mundial de Saúde, a população diabética aumentará universalmente duas vezes no próximo milênio, estimando-se que existirão aproximadamente 300 milhões de pacientes diabéticos. Enfatizamos que 75% destes pacientes viverá em países em desenvolvimento onde há maior dificuldade no acesso à centros especializados. A maioria destes indivíduos estará na faixa etária de 45 à 64 anos, portanto em fase de grande participação no mercado de trabalho com elevado custo social e para o Sistema de Saúde.

Estudo multicêntrico realizado em 1989 em diferentes cidades do Brasil mostrou uma prevalência de 7,6% no Brasil e de 7,1% no Rio de Janeiro, com cerca de 30 a 50% dos casos não diagnosticados. Estima-se que no neste milênio nosso país terá 11 milhões de diabéticos. O diabetes está entre as 7 doenças de maior mortalidade e morbidade em diferentes grupos populacionais devido às suas complicações crônicas. Das complicações crônicas, destacamos as doenças cardiovasculares que podem se manifestar como doença coronariana, vascular cerebral e vascular de membros inferiores e a nefropatia e retinopatia diabética, como as mais devastantes para o paciente diabético. A importância do controle glicêmico nas complicações crônicas microvasculares em pacientes com diabetes tipo 2 (DM2) já foi estabelecida na literatura pelo UKPDS, que demonstrou redução do risco de evolução para retinopatia, nefropatia e neuropatia com a terapia intensiva do diabetes. Este fato não foi observado em relação às complicações macrovasculares. Este dado ambivalente poderia ser decorrente de que no UKPDS o controle glicêmico foi avaliado em função da média ou mediana de múltiplas determinações da hemoglobina glicada (HbA_{1c}) e/ou glicemia de jejum, não havendo dados publicados sobre a variabilidade de ambas durante o estudo. A magnitude da flutuação glicêmica mesmo em um nível de HbA_{1c} considerado como de bom controle, seria um importante fator de risco para as complicações crônicas incluindo-se a do-

ença macrovascular. A Associação Européia de Diabetes têm sugerido que o paciente tenha um menor risco cardiovascular é necessário manter uma glicemia pós-prandial <135 mg/dl e HBA_{1c} = 6.5%. Diferentes distúrbios metabólicos pós-prandiais como os picos hiperglicêmicos, a hipertrigliceridemia com aumento de quilomicrons remanescíveis, determinariam uma série de reações com aumento do estresse oxidativo e de diferentes fatores pró-coagulantes desencadeando uma resposta inflamatória. Estes eventos resultariam em um processo de disfunção endotelial que pode evoluir para injúria endotelial e aterosclerose. Esta sucessão de eventos teria relevante importância na etiopatogenia das complicações crônicas da doença como demonstrado em vários estudos prospectivos. Estes estudos têm associado a doença macrovascular fatal e não fatal no paciente com DM2 com o nível da hiperglicemia pós-prandial recomendando sua avaliação periódica.

SP 09.2

HIPERGLICEMIA PÓS-PRANDIAL E REATIVIDADE VASCULAR

Introdução - O diabetes mellitus constitui um importante problema de saúde pública no Brasil. A doença e suas complicações crônicas micro e macrovasculares acarretam uma alta taxa de morbi-mortalidade. No presente trabalho, investigamos os efeitos agudos de concentrações elevadas de glicose, semelhantes àquelas encontradas em pacientes diabéticos no período pós-prandial, na reatividade vascular de rim isolado e perfundido assim como na aorta isolada de coelhos não diabéticos.

Metodologia - Os rins foram perfundidos com solução de Krebs-Henseleit com fluxo constante para registro da pressão de perfusão renal. Os segmentos de aorta foram instalados em banho de órgão isolado para registro da tensão isométrica. Foram utilizadas concentrações de glicose correspondem à média glicêmica (15 mM) ou valores máximos (25 mM) observados no período pós-prandial dos pacientes diabéticos acompanhados no Hospital Universitário da UERJ. Após três horas de perfusão (rim isolado) ou incubação (aorta isolada) com glicose normal (5.5 mM; grupo controle) ou com as concentrações elevadas de glicose, a reatividade vascular foi avaliada com substâncias vasodilatadoras dependentes (acetilcolina) e independentes (nitroprussiato de sódio) do endotélio. A influência isolada da hiperosmolaridade do meio foi analisada com soluções de manitol em concentrações equivalentes às de glicose.

Resultados - Houve redução significativa na vasodilatação dependente do endotélio, tanto na circulação renal quanto na aorta, em presença de glicose elevada. Não foram observadas alterações da vasodilatação independente de endotélio nos diferentes grupos. O aumento da osmolaridade do meio induzido por manitol, modifi-

cou apenas a vasodilatação máxima observada na circulação renal.

Conclusões - Níveis elevados de glicose semelhantes aos encontrados nos pacientes diabéticos no período pós-prandial, são capazes de provocar alterações agudas significativas na reatividade vascular da circulação renal assim como na aorta de coelhos não diabéticos.

SP 09.3

LEUCÓCITOS, MOLÉCULAS DE ADESÃO E HIPERGLICEMIA. Zuleica Bruno Fortes

A resposta inflamatória em resposta a diferentes estímulos está diminuída no diabetes mellitus. Isto pode explicar, em parte, a maior propensão de indivíduos e animais diabéticos a infecções. Os leucócitos, importantes componentes do processo inflamatório, tem seu comportamento alterado pelo diabetes mellitus, a migração leucocitária estando bastante diminuída. Esta redução pode ser explicada, pelo menos parcialmente, pela diminuição de expressão de moléculas de adesão como ICAM-1 e da P-selectina pelo endotélio vascular de animais diabéticos por aloxana. O tratamento com insulina é capaz de reverter essa alteração, restaurando a expressão da molécula de adesão ICAM-1 no endotélio. Isto indica papel importante da insulina e/ou da hiperglicemia na alteração. A hiperglicemia crônica pode levar a complicações tardias do diabetes mellitus e três mecanismos principais tem sido propostos para explicar o papel tóxico da glicose nessas complicações: a exacerbação da via dos polióis, a formação dos produtos de glicação (AGEs) e o aumento do estresse oxidativo. Pode-se interferir nesses processos com agentes como os inibidores da enzima aldose redutase envolvida na formação dos polióis, com a aminoguanidina que diminui a produção dos AGEs e com agentes antioxidantes como as vitaminas C e E. Animais diabéticos tratados com esses agentes tiveram o comportamento leucocitário corrigido, indicando assim a participação desses mecanismos no fenômeno estudado. Esses tratamentos parecem ter restaurado a resposta migratória diminuída nos animais diabéticos por restaurar a expressão de molécula de adesão ICAM-1 e P-selectina no endotélio sem interferir com a expressão de moléculas de adesão expressas nos leucócitos como a L-selectina e complexo CD18. Apoio financeiro: FAPESP/CNPq.

SP 11.1

ROLE OF MATRIX METALLOPROTEINASES IN MEDIATING ACUTE CARDIOVASCULAR DYSFUNCTION DURING PRO-INFLAMMATORY CYTOKINE CHALLENGE.

Cindy Qun Gao¹, Grzegorz Sawicki², Wilma L. Suarez-Pinzon³, Tamás Csont², Mięczyślaw Wozniak⁴, Péter Ferdinandy⁵ and Richard Schulz^{1,2} - Departments of

Pediatrics¹, Pharmacology² and Medicine³, Cardiovascular Research Group, University of Alberta, Edmonton, Alberta, Canada. Department of Clinical Chemistry⁴, Medical University of Wrocław, Wrocław, Poland. Department of Biochemistry⁵, Cardiovascular Research Group, University of Szeged, Szeged, Hungary.

Objective: Pro-inflammatory cytokines depress myocardial contractile function by enhancing peroxynitrite production, yet the mechanism by which peroxynitrite does this is unknown. As matrix metalloproteinases (MMPs) can be activated by peroxynitrite and can proteolytically cleave troponin I in hearts, we determined whether this occurs in cytokine-induced myocardial dysfunction.

Methods: Isolated working rat hearts were perfused with buffer containing interleukin-1 β , interferon- γ and tumor necrosis factor- α .

Results: Cytokines induced a marked decline in mechanical function during 60-120 min of perfusion. This decline was accompanied by increased myocardial inducible NO synthase activity and perfusate dihydroxyacetone phosphate (a marker of peroxynitrite), compared to control hearts. Before the decline in mechanical function there was enhanced MMP-2 activity in the perfusate. This was accompanied by decreased tissue levels of MMP-2, tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-4 and troponin I in cytokine-treated hearts. The collagen content of the heart was not affected by cytokine treatment. A neutralizing anti-MMP-2 antibody or the MMP inhibitors Ro31-9790 or PD166793 attenuated the decline in myocardial function. Moreover, the MMP-2 antibody prevented the decline in myocardial MMP-2 and troponin I levels.

Conclusions: Myocardial contractile dysfunction caused by pro-inflammatory cytokines results in MMP-2 activation and a decline in tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-4 in the heart. Troponin I is also a target for the proteolytic action of MMP-2 during acute heart failure triggered by pro-inflammatory cytokines. Inhibition of MMPs may be a novel pharmacological strategy for the treatment of acute inflammatory heart disease.

SP 11.2

PARADOXICAL EFFECT OF NITRIC OXIDE IN SEPSIS. Fernando Q. Cunha. Department of Pharmacology, Faculty of Medicine Ribeirão Preto, University of São Paulo, Avenida dos Bandeirantes, 3900, 14049-900- Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

Previous studies have demonstrated that intravenous administration of endotoxin decreases the migration of neutrophils into the inflammatory site. It seems that the neutrophil migration impairment is mediated by the circulating inflam-

matory cytokines, such TNF- α and IL-8 released by the host cells stimulated by endotoxin or other bacteria byproducts. This is supported by the fact that intravenous administration of these cytokines reduced the neutrophil migration induced by different inflammatory stimuli. We used the CLP (cecal ligation and puncture) model to investigate whether failure of neutrophil migration occurs in sepsis, and whether it correlates with the disease outcome. The severity of sepsis correlates with the number of puncture in cecum: 2 punctures (SL-CLP) present a peritonitis with intense neutrophil migration and 100% of animals survived, whereas 12 punctures (L-CLP) presented high number of bacteria in the peritoneal cavity and in the circulation and 90-100% of mortality. It was observed failure (90%) of neutrophil migration towards infectious focus in L-CLP group. This fact is due to a decrease in the rolling (97%) and consequently in the adhesion (86%) of neutrophil to endothelium cells, evaluated by intravital microscopy. In addition, it was observed significantly increase in concentration of TNF- α , IL-1 β and IL-10 in the exudates and sera obtained from L-CLP animals. The failure of neutrophil migration to infection focus is mediated by nitric oxide, since the neutrophil migration failure, the reduction in the rolling and adhesion were not observed in iNOS-/- mice and, aminoguanidine, a selective iNOS inhibitor, prevented the phenomena. Furthermore, it was also observed that circulating neutrophils obtained from septic patients present failure of neutrophil migration *in vitro*, which correlated with the severity of the disease. The neutrophils from septic patients presented reduction in the cytosolic levels of F-actin. In conclusion, we demonstrated that, in CLP sepsis, the failure of neutrophil migration is an important event in disease pathogenesis and that NO is involved in the process. Further, we suggest that NO reduces the neutrophil migration through modulating the rolling and the chemotaxis ability of neutrophil. Financial support: CNPq, FAPESP, PRONEX).

SP 11.3

LIPID BODIES IN LEUKOCYTES: IMPACT FOR INFLAMMATORY MEDIATOR PRODUCTION IN SEPSIS.¹P Pacheco,^{1,2}FA Bozza,¹R.N Gomes,³M Bozza,⁴PF Weller,¹HC Castro-Faria-Neto,¹PT Bozza.¹Lab Imunofarmacologia, Dep.Fisiologia Farmacodinâmica, IOC, FIOCRUZ; Centro de Terapia Intensiva, HUCFF and Dep. Imunologia, Instituto de Microbiologia, UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil;⁴Beth Israel Deaconess Medical Center Harvard Medical School, Boston, MA, USA.

Lipid bodies are rapidly inducible, specialized cytoplasmic domains for eicosanoid-forming en-

zyme localization, which we hypothesize, may have specific roles in enhanced inflammatory mediator production during pathological conditions, including sepsis. However, little is known about the origins, composition or functions of lipid bodies *in vivo*. We show that lipid body numbers were increased in leukocytes from septic patients in comparison to healthy subjects. Analogously the intrathoracic administration of LPS into mice induced a dose- and time-dependent increase in lipid body numbers. Pretreatment with anti-CD14 or anti-CD11b/CD18 mAb drastically inhibited LPS-induced lipid body formation. Moreover, LPS failed to form lipid bodies in C3H/HeJ (*TLR4* mutated) mice, demonstrating a requisite role for LPS receptors in lipid body formation. LPS-induced lipid body formation was also inhibited by the TLR4-receptor antagonists, suggesting a role for endogenous TLR4. The eicosanoid-forming enzymes 5-lipoxygenase and cyclooxygenase-2 were immunolocalized within both experimentally induced (LPS in mice) or naturally occurring (septic patients) lipid bodies. The pro-inflammatory cytokine involved in the pathogenesis of sepsis, TNF- α , was also shown to co-localize within lipid bodies. Prior stimulation of leukocytes with LPS *in vivo* to form lipid bodies enhanced the capacity of leukocytes to produce both leukotriene B₄ and prostaglandin E₂. In conclusion, our studies indicate that lipid bodies formed after LPS stimulation and sepsis are sites for eicosanoid forming enzymes and cytokine localization and may develop and function as structurally distinct, intracellular sites for paracrine eicosanoid synthesis during inflammatory conditions.

SP 11.4

ROLE OF POTASSIUM CHANNELS IN NITRIC OXIDE-INDUCED CHANGES OF VASCULAR REACTIVITY.Jamil Assreuy (UFSC).

NO is one of the main effectors in sepsis/septic shock, a condition which displays a progressive hypotension, resistant to vasoconstrictors, which ends in multiple organ failure and death. Several reports indicate that the mechanisms for this resistance to vasoconstrictors are more complex than simply a high and continuous production of NO by iNOS. We have shown that the infusion of NO donors (SNP or SNAP) into the rat circulation causes long-lasting reductions (40-80%; 24 h) in the response of several vasoconstrictors, concomitant with increases in the response to vasodilators. Similarly results were found in rat aorta rings. These results indicate that NO-induced changes on vascular responsiveness to vasoconstrictors and vasodilators are more profound and long-lasting than previously described. Our results also show that NO donors reproduce the change in vessel reactivity seen in septic shock. Treatment with LPS similarly reduced (~50%) pressor responses to phenylephrine. When given just before phenylephrine, L-NAME reversed the hyporesponsiveness at 8 but not at 24 h after LPS injection. The expression of iNOS was highest 8 h after LPS decreasing to almost none by 24 h. Guanylate cyclase inhibition reversed the hyporesponsiveness at 24 but not at 8 h, whereas tetraethylammonium reestablished normal responses to phenylephrine at both time points. Therefore, it appears

that iNOS-derived or donor-derived NO is important in initiating hyporesponsiveness to vasoconstrictors but not in maintaining it for long periods. Once NO has changed the vessel responsiveness, these changes seem to be maintained for long time periods by a complex interplay between guanylate cyclase and potassium channel activation, even when iNOS expression is minimal. Financial support: PRONEX, CAPES and CNPq.

SP 11.5

ALTERED INFLAMMATORY RESPONSE IN MICE OVEREXPRESSING TSG-14/PTX3.

Danielle G. Souza¹, Adriana C. Soares², Vanessa Pinho¹, Humberto Torloni², André Montagnini², Luiz F. L. Reis³, Mauro M. Teixeira¹, Adriana A. M. Dias³. ⁽¹⁾UFMG, Belo Horizonte, Brazil; ⁽²⁾Hospital do Câncer A.C. Carmago, São Paulo, Brazil and ⁽³⁾Ludwig Institute for Cancer Research, São Paulo, Brazil

TSG-14/PTX3 is a gene inducible by TNF- α , IL-1 β and LPS in fibroblasts, macrophages and endothelial cells. It encodes a 42kDa-secreted glycoprotein that belongs to the pentraxin family of acute phase proteins. Recently we demonstrated that TSG-14 transgenic mice (TSG-14tg) overexpressing the murine TSG-14 gene under control of its own promoter are more resistant to LPS-induced shock and to polymicrobial sepsis caused by cecal ligation and puncture (CLP). Here we compare the inflammatory response between Wt and TSG-14tg mice submitted to different models of experimental acute inflammation: ischemia and reperfusion (I/R) of the superior mesenteric artery (SMA) and cerulein-induced acute edematous pancreatitis. Following I/R of the SMA, TSG-14tg mice showed impaired survival rate which appeared secondary to a markedly increased inflammatory response, as assessed by the local (duodenum and ileum) and remote (lung) enhancement in vascular permeability, hemorrhage and neutrophil accumulation. Moreover, tissue concentrations of TNF- α , interleukin-1 β , KC and MCP-1 were higher in TSG-14tg as compared to Wt mice. Of note, elevated TNF- α concentrations in serum were only observed in TSG-14tg mice and blockage of TNF- α action prevented lethality of TSG-14tg mice. These results demonstrate that transgenic expression of TSG-14 induces an enhanced local and systemic injury and TNF- α -dependent lethality following I/R. When TSG-14tg and Wt mice were injected with cerulein, both lineages developed acute pancreatitis as indicated by increased serum levels of amylase. TSG-14tg mice have a significant augmentation of pancreatic edema in comparison with Wt mice (assessed by histological analysis) as well as higher tissue concentrations of TNF- α and IL-1 β (pancreas and lungs) and MIP-2 (pancreas). The levels of IL-10 in the tissues of TSG-14tg after cerulein induction are lower than in Wt mice. Taken together, the results obtained from these experiments suggest that TSG-14 plays a role in controlling inflammatory response *in vivo*, at least in part, via modulation of local and systemic TNF- α and IL-1 β production. Moreover, our results suggest that TSG-14 may be a relevant therapeutic target for the pharmacological treatment of acute

injuries in which IL-1 β and TNF α are thought to contribute to the severity of the disease.

SP 12.1

ROLE OF ENDOTHELIN IN CARDIOVASCULAR PHYSIOPATHOLOGY. Barton, Matthias - Medical Policlinic & Clinical Atherosclerosis Research Laboratory, Department of Internal Medicine, University Hospital, CH-8091 Zurich, Switzerland

Research in the past 20 years has greatly increased our understanding of the pro- and anti-atherosclerotic functions of endothelial cells. Shortly after the first description of endothelial cell-dependent relaxation by Furchgott and Zawadzki, a sustained peptidergic vasoconstrictor activity from supernatants of cultured endothelial cells was reported by Hickey and coworkers. Cloning of the genes encoding for the endothelin protein family by Yanagisawa and Masaki, the subsequent identification of receptors, and the availability of receptor-selective and non-selective antagonists have enabled numerous studies in experimental animals and human, which now recognize the endothelin system as one of the key systems involved in cardiovascular regulation. Although initially discovered as vasoconstrictor protein, ET has turned out to be a crucial factor contributing to many pathologies associated with abnormal function or structure in the cardiovascular system. These conditions include cardiac hypertrophy, heart failure, arterial and pulmonary hypertension, glomerulosclerosis, atherosclerosis, obesity and aging. Activation of the ET system mainly occurs at the cellular level and thus ET-1 acts as a local rather than a circulating factor. However, in severe cases of conditions like congestive heart failure plasma levels of the peptide also increase. In addition to the cardiovascular functions of ET-1 and its receptors, novel roles including angiogenesis/carcinogenesis, regulation of enzyme activity, and immunomodulation will be discussed.

SP 12.2

WHERE ARE INSERTED ENDOTHELINS IN FEVER PATHWAYS? Fabricio, A.S.C.; Zamprônio, A.R.; D'Orleans-Juste, R.A.E. G.A.; & Souza, G.E.P. Lab of Pharmacology FCFRP-USP Ribeirão Preto, SP

Aim: Blockade of central endothelin E_B receptor reduces and abolishes fevers induced by lipopolysaccharide (LPS) and endothelin (ET) in rats, respectively¹. ET triggers production of several cytokines², which participate in fever to LPS and stimulate ET-1 release from different cell types³. We have attempted to situate the ETs in the cascade of mediators underlying LPS-induced fever.

Methods/Results: Rectal/core temperature of male Wistar rats (200 g) were recorded for 6 h after pyrogen injections. The selective E_B receptor antagonist (BQ-788, icv) did not modify fevers caused by icv injections of IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-8, prostaglandins E₂ or F₂ α . BQ-788 abolished fever caused by icv CRF or by PFFP-pre-formed pyrogenic factor derived from LPS-stimulated

macrophages which pyrogenic activity depends on central release of CRF. Fever induced by icv ET-1 was unaffected by indomethacin, CRF-antagonist (α -helical CRF⁹⁻⁴¹) or soluble TNF receptor subtype I, but was blockade by dexamethasone or IL-1 receptor antagonist (IL-1ra). Fevers induced by PFFP and CRF were similarly inhibited by icv IL-1ra. **Conclusion:** These findings suggest that pyrogenic activity of LPS, PFFP and CRF share a common E_B receptor-mediated pathway which seems to depend on PGs. Furthermore, our finding that IL-1ra inhibits fever induced by ET-1 as well as by CRF or PFFP implicates IL-1 in the fever mechanisms situated downstream from endothelin E_B receptors

¹ Br. J. Pharmacol. 125:542, 1998; ² Med. Inflamm. 2:417, 1993; 3:155, 1994; ³ J. Cardiovasc. Pharmacol. 26:S56, 1995; ⁴ Inflamm. Res. 49: 473, 2000.

Support: APESP

SP 12.3

CONTRACTILE RESPONSE AND INCREASE OF CYTOPLASMIC CALCIUM INDUCED BY ENDOTHELIN-1 IN VASCULAR SMOOTH MUSCLE CELLS. Bendhack, L.M. & Lindé, A.E. - Lab Pharmacology FCFRP-USP Ribeirão Preto, SP

Endothelin-1 (ET-1), the most potent vasoconstrictor agonist produced by the endothelial cells, was described by Yanagisawa et al. (1988). We studied the effects of ET-1 in rat tail arteries from renal hypertensive (2K-1C) and normotensive rats (2K). The contractile response induced by ET-1 is lower in 2K-1C than in 2K arteries. The sensitivity and efficacy of ET-1 are not affected by endothelium removal in either group. ET-1 binds to its receptors on vascular smooth muscle cells and subsequently induces an increase in the [Ca²⁺]_i, which is essential for cell contraction. It is generally accepted that the most of the ET-1-induced sustained contractions and increases in [Ca²⁺]_c require the entry of extracellular Ca²⁺. In addition to promoting Ca²⁺ influx, ET-1 causes the release of intracellular Ca²⁺. ET-1 fails to induce contraction of 2K and 2K-1C arteries in Ca²⁺-free medium, indicating the extracellular Ca²⁺ as the main source. The contraction induced by ET-1 is similarly inhibited by nifedipine in arteries from 2K and 2K-1C rats. Since the increase in [Ca²⁺]_i is a primary event for vascular contraction, a modification of [Ca²⁺]_i regulation may contribute to the altered arterial smooth muscle reactivity in renal hypertension. ET-1 similarly increases the [Ca²⁺]_i in 2K and 2K-1C tail artery cells. All together, our results suggest that the depressed responsiveness to ET-1 in 2K-1C tail arteries is not due to endothelium dysfunction, or to altered contribution of the sources of Ca²⁺, but is related to a mechanism which is downstream from [Ca²⁺]_i mobilization.

Support: APESP, PRONEX.

SP 12.4

ENDOTHELINS IMPLICATED IN OLEIC ACID-INDUCED ACUTE LUNG INJURY IN THE MOUSE. Guimarães, C.L. and Rae, G.A. Depts.

of ¹Pharmaceutical Sciences, FURB, Blumenau, SC and ²Pharmacology, UFSC, Florianópolis, SC - clg@furb.br

Introduction and Goals: Dysfunctions in the production/actions of endothelins (ETs) might underlie several human respiratory diseases. Here we assess the effects of ET receptor antagonists on oleic acid(AO)-induced lung injury in mice.

Methods and Results: Under light ether anaesthesia, male Swiss mice (35-40g) were given Evans blue (EB, 50 mg/kg, i.v). After 1 h, they received i.v. either AO (80 mg/kg,) or vehicle (0.1% BSA), were killed 1 h later and perfused intracardially with saline. Lungs were removed and EB content extracted (48 h at 40°C in formamide) and evaluated, as an index of plasma extravasation, by photocolometry (at 620 nm). AO increased lung EB content, with a maximum at 1 h after injection (BSA 11.8 \pm 3.9; AO 98.7 \pm 4.2 mg/total tissue). Injected i.v. 30 min prior to AO, bosentan (mixed ETA/ETB receptor antagonist; 30 mg/kg), Ro-468443 and A-192621 (both selective ETB receptor antagonists; at 3 or 10 and 15 or 30 mg/kg) each significantly decreased lung EB content to 39.4 \pm 5.4; 64.4 \pm 2.1 and 33.7 \pm 1.5; 46.3 \pm 9.9 and 29.3 \pm 6.4, respectively, and reduced AO-induced leukocyte (and neutrophil) infiltration into BAL, without changing values/counts in BSA-treated control lungs. In contrast, the selective ETA receptor antagonist ABT-627 (5 or 10 mg/kg) was ineffective.

Conclusion: Acting through ETB receptors, endogenous ETs are important mediators of AO-induced acute lung injury.

Support: This study was supported by CAPES, PRONEX and CNPq. ET receptor antagonists were kindly provided by Actelion and Abbott.

SP 13

DESENVOLVIMENTO DE PROGRAMA INTEGRADO VISANDO A EXTRAÇÃO, PURIFICAÇÃO, IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FARMACOLÓGICA DE PRINCÍPIOS ATIVOS NATURAIS DE ORIGEM ANIMALA. P. Corrado - Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (FMRP/USP)

A presente Mesa Redonda, visa divulgar o papel da ciência brasileira em programa de particular importância, pois envolve o trabalho integrado de grupos multidisciplinares com o objetivo comum de obter novos instrumentos para a análise biológica de drogas. Para atingir esse objetivo, serão apresentados aspectos relevantes em estudos realizados por cada grupo, cujos representantes deverão enfatizar as diversificadas funções e a atividade integrada por cada um de seus componentes (químicos, bioquímicos, fisiólogos, farmacólogos, toxicólogos, histopatólogos etc) bem como assinalar os fatores que impedem o desenvolvimento adequado do programa que é de inegável relevância científica pois, além da constituição de grupos multidisciplinares cientificamente integrados, proporciona a formação de novos Recursos Humanos nessa área, reconhecidamente carente em nosso país que, paradoxalmente,

é considerado o de maior biodiversidade do planeta. Face ao exposto, a presente Mesa Redonda visa, outrossim, avaliar a possibilidades da ciência brasileira de fomentar e promulgar programas dessa natureza, além de estimular e intensificar o intercâmbio entre os diferentes grupos no sentido de minimizar os fatores que impedem o seu desenvolvimento didático-científico.

SP 13.1

TOXINAS EXTRAÍDAS DE VENENOS ANIMAIS COM ESTRUTURA DE FOSFOLIPASES A₂ COMO FERRAMENTA PARA O ESTUDO DE MECANISMOS BIOLÓGICOS. Yara Cury, Laboratório de Fisiopatologia, Instituto Butantan, São Paulo, Brasil

As fosfolipases A₂(FLA₂) apresentam grande ocorrência em venenos de serpentes, sendo responsáveis por ações neurotóxicas, cardiopatóxica, miotóxica e inflamatória. O estudo da atividade destas toxinas tem auxiliado na caracterização dos mecanismos fisiopatológicos dos envenenamentos ofídicos e favorecido a sua utilização como ferramenta científica importante para a compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na dor e inflamação. Estudos realizados pelo nosso grupo, em colaboração com o Instituto Clodomiro Picado da Costa Rica, utilizando enzimas com estrutura de FLA₂ isoladas de *Bothrops asper*, evidenciaram os mecanismos centrais e periféricos responsáveis pela ação nociceptiva destas toxinas, a importância da presença da atividade catalítica para a intensidade do efeito nociceptivo elicitado e o papel de sítios catiônicos presentes nestas moléculas para a indução deste efeito. Trabalhos recém-iniciados em colaboração (a) com o Instituto de Ciências Biomédicas/USP, estão possibilitando caracterizar a ação destas FLA₂ sobre o conteúdo neuronal de neurotransmissores envolvidos com a nociceção e (b) com a Universidade do Colorado/EUA, permitirão o avanço na compreensão da mediação central da dor acarretada por estas FLA₂ e de mecanismos para o seu controle. Pesquisadores do Laboratório de Farmacologia do Instituto Butantan têm caracterizado as propriedades e mecanismos pró-inflamatórios destas toxinas, evidenciando a ação estimulatória sobre a funcionalidade e o metabolismo de macrófagos. Ainda, como resultado de colaborações nacionais (intra- e inter-institucionais) e internacionais, estes pesquisadores isolaram e caracterizaram, em trabalho pioneiro, uma FLA₂ do veneno de *Micrurus lemniscatus*, com atividade coagulante, miotóxica e edematogênica. O intercâmbio entre os diversos grupos, além de favorecer o desenvolvimento científico, tem promovido a formação de recursos humanos nesta área.

SP 13.3

TOXINAS ANIMAIS COMO FERRAMENTAS PARA ESTUDO DA TRANSMISSÃO NEUROMUSCULAR ESQUELÉTICA. Souccar Depto.

de Farmacologia, Setor Produtos Naturais, Escola Paulista de Medicina, UNIFESP. 04044-020 São Paulo, SP.

Há mais de duas décadas, o grupo tem se dedicado ao estudo farmacológico de produtos naturais visando principalmente, a obtenção de moléculas líderes para a produção de medicamentos. Ao longo deste período, foram desenvolvidos também estudos com produtos de origem vegetal e animal, utilizados como ferramentas para a investigação de mecanismos pré- e pós-juncionais da transmissão neuromuscular esquelética. Assim, foram estudados os serjanosídeos A e B do falso timbó *Serjania caracasana* pseudohidrolato da *Lippia grata* e do timol; dos flavonóides da *Heliconia psittacorum*; dos alcalóides geissospermina e geissosquizolina do *Geissospermum leave* (pau-pereira), da l-beberina do *Chondrodendron platyphylum* e do derivado quaternário da l-hiosciamina, fentônio e análogos. O estudo de toxinas e venenos foram iniciados no exterior em colaboração com o grupo do Prof. E. X. Albuquerque, utilizando-se, por exemplo, a bungarotoxina da cobra *Bungarus multicinctus* na evidência de algumas propriedades dos receptores nicotínicos juncionais e extra-juncionais; a histriocotoxina e a gefirotoxina da rã colombiana *Dendrobates histrionicus*, na caracterização de sítios envolvidos no bloqueio não-competitivo da transmissão neuromuscular. Posteriormente, estudos realizados em colaboração com pesquisadores do Instituto Butantan, mostraram que a fração miorelaxante do veneno da aranha brasileira *Phoneutria nigriventer* (armadeira) reduziu a liberação do neurotransmissor por inibir o influxo de Ca²⁺ no terminal nervoso motor e inibir o processo de excitação. Também em colaboração com grupos do Instituto Butantan, foi observado que o veneno do peixe *Talassophryne nattereri* (niquim) não tem ação específica na transmissão neuromuscular e que os efeitos produzidos pelo veneno: dor intensa, eritema, edema e necrose, sabidamente resistentes aos anti-inflamatórios não-esteroidais, foram atenuados por um inibidor específico de caliceína tecidual. Mais recentemente, em colaboração com *Rodrigues-Simioni* e col. da UNICAMP, as ações pré-juncionais do veneno de *Bothrops neuwiedi pauloensis* e fração ativa foram comprovadas em preparações neuromusculares de mamíferos e aves. Os exemplos mencionados reforçam que a colaboração inter-institucional complementar é estratégia eficiente a ser estimulada no estudo da biodiversidade brasileira.

SP 13.4

MECANISMOS DE AÇÃO DE TOXINAS DE ORI-

GEM ANIMAL: CONTRIBUIÇÃO DO ESTUDO INTEGRADO DE BIOQUÍMICOS E ELETROFISIOLOGISTAS. P. S. L. Beirão, Depto. de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, 31270-901 Belo Horizonte, MG.

Inspirado no trabalho pioneiro do Prof. Carlos R. Diniz, um dos primeiros bioquímicos do mundo a se dedicar ao estudo da composição e do mecanismo de ação de venenos animais, formou-se em Belo Horizonte um grupo informal de pesquisadores interessados em realizar estudos abrangentes e integrados das toxinas peptídicas de venenos animais, especialmente de artrópodos. O grupo nucleou-se no departamento de Bioquímica e Imunologia da UFMG, mas logo se expandiu para a Fundação Ezequiel Dias (FUNED), para onde se transferiu o Prof. Diniz e onde foram trabalhar recém doutores formados na UFMG e em outras universidades brasileiras e estrangeiras. O grupo se organizou de forma matricial, onde cada componente passou a se especializar em uma ou mais abordagens, de forma complementar aos demais componentes do grupo, dando ao conjunto uma grande capacidade de enfrentamento dos problemas, e otimizando a utilização de recursos físicos e humanos no estudo das toxinas. De uma maneira geral, a FUNED se especializou na parte de purificação e de análise química das toxinas, enquanto a UFMG se especializou nos estudos farmacológicos e de mecanismos de ação, utilizando abordagens farmacológicas e eletrofisiológicas. Uma importante colaboração internacional com a Université de la Méditerranée, de Marselha, contribuiu para a agregação de mais competência ao grupo. Pode-se mencionar como exemplos do conhecimento gerado pelos trabalhos do grupo: (1) em relação ao veneno da *Phoneutria nigriventer*, foram estabelecidos métodos de purificação de vários dos seus peptídeos tóxicos, bem como a sequência total ou parcial das mesmas. Oito destes peptídeos foram clonados e tiveram seus cDNA sequenciados, revelando seu provável modo de processamento pós-traducional. Foram identificados os mecanismos de ação de toxinas que agem em canais de Na⁺ (PnTx2-6 e PnTx2-5), em canais de Ca²⁺ (?-PnTx3-3, PnTx3-2), inclusive identificando os subtipos de canais por elas afetados, e sobre canais de K (PnTx3-1). Foram identificadas toxinas que agem seletivamente em insetos, Tx4(1-6), bem como seu modo de ação. (2) em relação às toxinas de escorpião, prosseguindo o trabalho pioneiro de purificação e de caracterização da toxina do *Tityus serrulatus*, foi mostrado o mecanismo do seu efeito liberador

Cursos

de mediadores químicos, bem como o provável mecanismo molecular de sua ação sobre canais de Na⁺. O veneno do *Tityus bahiensis* teve sua composição peptídica caracterizada. Toxinas inseticidas foram identificadas nos venenos das duas espécies de escorpião. Este modelo de organização tem mostrado que a cooperação é mais produtiva do que a soma do trabalho isolado de cada pesquisador.

SP 15.3

DIFFERENTIATION OF DOPAMINERGIC PHENOTYPE IN CULTURED CNS NEURONS: ROLE OF NEUROACTIVE PEPTIDES AND cAMP Orba, J.M.C., Henze, I., Barreto, M. S. G., Gardino, P.F., de Mello, M.C.F., Hokoç, J.N., and de Mello, F.G. IBCCF; CCS BI-G UFRJ, 21949-900, Brasil

In the present study we examined whether the Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide (PACAP), a highly effective stimulator of adenylyl cyclase activity, might influence the differentiation of dopaminergic cells of the chick retina. PACAP (10nM) was able to induce greater than 10 fold cAMP accumulation in retinas obtained from 7-day-old embryos. This effect declined after embryonic day 15. Using cultured cells and tyrosine hydroxylase immunocytochemistry we observed that tyrosine hydroxylase (TH)-positive cells were detected in cultures prepared from retinas at embryonic day 8, 9 and 10, after 6 days of culture. Cultures treated with 10nM PACAP for 6 days showed a 2 to 3 fold increase in the number of TH-positive cells in cultures prepared from 9 and 10 day-old embryos. This effect was similar to that observed with cultures treated with forskolin (10 nM). Cultures treated with a specific antagonist of PAC-1 or VPAC receptors (Maxd4, 500nM and PACAP6-38, 300nM), displayed a 50% reduction of the spontaneous differentiation of TH-positive cell, as compared to untreated cultures. Our results indicate a narrow window during development when undifferentiated dopaminergic cells may be influenced by specific signals conveyed by PACAP, possibly via the production of cAMP. Support: CAPES; CNPq; FAPERJ and Pronex.

Curso 1.1

DEPENDÊNCIA DE ÁLCOOL Amarante Silva, F. - Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Dep. de Ciências Fisiológicas, Centro Regional de Estudos, Prevenção e Recuperação de Dependentes Químicos – Rio Grande – RS

Os objetivos são: 1. Caracterizar a dependência do álcool; 2. Apresentar possíveis mecanismos dessa dependência; 3. Apresentar possíveis tratamentos farmacológicos da abstinência dessa droga psicoativa; 4. Apresentar possíveis tratamentos farmacológicos da dependência dessa droga psicoativa e 5. Apresentar resultados de avaliação do grau de severidade da dependência do álcool. Para tal, apresentaremos estatísticas nacionais relacionadas ao uso na vida do álcool (acima de 75%), assim como os custos sociais do

consumo dessa bebida (acima de 5,4% do PIB). De imediato, caracterizaremos o mecanismo de tolerância via sistema gabaérgico, taurinérgico e glutamatérgico nos receptores NMDA. O mecanismo da dependência será caracterizado pela ação do álcool sobre o Circuito central da recompensa mediado pelos neurotransmissores: dopamina, serotonina, noradrenalina, endorfinas, taurinas e glutaminas. A síndrome da abstinência alcoólica será caracterizada e seu tratamento farmacológico será o consenso da Associação Brasileira de Álcool e outras Drogas, baseado no uso de tiamina, benzodiazepínicos e butirofenonas, tanto para tratamento domiciliar como ambulatorial ou hospitalar. O tratamento farmacológico da dependência sugerido por nós, já que não há consenso, será baseado em medicação aversiva tipo antabuse; medicamentos "anti-craving", como acamprosato e nalmefene; medicamentos contra o prazer da utilização do álcool mas não aversivos, como o naltrexone e outros medicamentos com potencial uso no tratamento da dependência ou em suas comorbidades. Ao final, será apresentado um resumo das condutas farmacológicas. Os slides da apresentação estarão disponibilizados na Home page do Centro: www.cenpre.furg.br.

Curso 1.2

DEPENDÊNCIA DE TABACO. Sinnott Silva, E. - Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Dep. de Ciências Fisiológicas, Centro Regional de Estudos, Prevenção e Recuperação de Dependentes Químicos – Rio Grande – RS

Os resultados do I Levantamento Domiciliar sobre o uso de drogas psicotrópicas no Brasil, realizado pelo CEBRID em 2001, mostrou que 41,1% da população brasileira já fez uso na vida de tabaco, sendo que 9% são dependentes. Das folhas da planta Nicotiana tabacum são extraídas mais de 4.000 substâncias químicas, mas é a nicotina a responsável pelos efeitos centrais do tabaco que levam à dependência. Os objetivos desta aula são: 1. caracterizar a dependência do tabaco; 2. apresentar possíveis mecanismos dessa dependência e discutir o consenso para o tratamento. Serão vistos a farmacocinética da nicotina, suas ações através de estimulação de neurônios colinérgicos; liberação aumentada dos neuro-hormônios acetilcolina e dopamina (circuito central da recompensa); do glutamato (aprendizado e a memória) e dos níveis de endorfinas no cérebro (euforia), as doenças associadas ao uso de tabaco, o que faz as pessoas se tornarem dependentes e como se estabelece a dependência com os componentes físico, psicológico e condicionamentos. Será apresentado o consenso sobre abordagem e tratamento do fumante do

Ministério da Saúde, com o apoio cognitivo-comportamental associado ao medicamentoso e as situações potenciais para o mesmo, com um papel bem definido de minimizar os sintomas da síndrome de abstinência, uma importante dificuldade para deixar de fumar. Medicamentos eficazes: terapia de reposição da nicotina (adesivo transdérmico e goma de mascar) e a bupropiona. (antidepressivo atípico). Será lançado um estímulo às pesquisas farmacológicas para melhor conhecimento das ações da nicotina e descoberta de substâncias para diminuir a síndrome de abstinência com eficácia terapêutica e mínimos efeitos colaterais. Os slides da apresentação estarão na Home page www.cenpre.furg.br.

Curso 2

ESTRESSE. Déborah S. da Mha

A significância fisiopatológica do estresse na hipertensão, aterosclerose, doenças em artérias coronárias, infarto do miocárdio e outros têm sido descritas. O efeito do estresse sobre o sistema cardiovascular depende de múltiplas variáveis. A literatura reporta uma subsensibilidade ao efeito cronotrópico da NA e uma diminuição da afinidade de adrenoceptores β_1 atriais ao metoprolol após estresse de imobilização; uma reestruturação do baroreflexo cardíaco após estresse de jato de ar em ratos; uma hiporreatividade à NA em aorta isolada de ratos submetidos ao estresse de imobilização e frio, e ainda, que uma exposição prévia ao estresse crônico de imobilização, seguido de exposição aguda ao estímulo estressogênico, não previne as alterações de reatividade vascular endotélio-dependentes, observado em aorta de ratos. O modelo de estresse de choque na pata aumenta a liberação de endotelina-1 no sistema nervoso central e modula a resposta simpática ao estresse, via estimulação de receptores ET_A. A participação do NO nas respostas adaptativas ao estresse é sugerida pelo aumento da atividade do sistema-NO observado em cultura de células endoteliais submetidas a tensões de cisalhamento (shear stress) e em vasos coronarianos de ratos após estresse de imobilização, bem como uma redução nos níveis plasmáticos de arginina observada em ratos submetidos ao estresse de imobilização e um aumento da expressão de RNAm-NOS no núcleo paraventricular de ratos estressados. Em experimentos *in vivo*, a semelhança do observado em aorta isolada, o estresse determinou uma diminuição na resposta pressora à NA e um aumento na resposta pressora à ACh, que foram abolidos pela administração de L-NAME. Em nosso laboratório, os animais submetidos ao estresse de imobilização, apresentaram pressão arterial basal significativamente maior, em relação àquela observada em animais normais. Esses resultados não apenas reforçam as evidências da literatura sobre a importância da liberação basal de NO na regulação do tono vascular e no controle da pressão sanguínea em condições normais, como sugere sua participação no

controle da pressão arterial após exposição ao estresse.

Curso 2.1

MECANISMOS GERAIS DA RESPOSTA ADAPTATIVA AO ESTRESSE: HABITUAÇÃO, SENSIBILIZAÇÃO E SISTEMA ÓXIDO NÍTRICO Profa. Dr Sandra Cordellini. Depto. de Farmacologia UNESP-Botucatu.

A resposta ao estresse é parte integrante do sistema biológico adaptativo. Respostas fisiológicas e comportamentais ao estresse são necessárias ao homem e animais dentro do meio ambiente dinâmico e freqüentemente desafiador em que vivem. Quando as situações tornam-se crônicas, as respostas ao estresse podem ser inadequadas e patológicas. O sistema de estresse é composto por estruturas centrais e periféricas, que após um estímulo estressor físico ou emocional, inicia uma resposta adaptativa ao estresse. Os componentes centrais são o núcleo paraventricular que libera o hormônio liberador de corticotrofina (CRH), paralelamente ao locus ceruleus e outros núcleos noradrenérgicos. A ativação dos componentes centrais do sistema de estresse determina a estimulação dos componentes periféricos, que são formados pelo eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e o sistema simpatoadrenal. Estes sistemas integram de forma complexa para manter a homeostase do organismo, em particular, durante a adaptação circulatória ao estresse. Dessa forma, a exposição a agentes estressores leva, freqüentemente, a um aumento simultâneo das atividades dos eixos simpático-adrenomedular e hipotálamo-hipófise-adrenocortical. A exposição repetida ao agente estressogênico, sem grandes conseqüências adversas, diminui o grau da resposta adaptativa ao estresse - habituação. Entretanto, experiências altamente aversivas aumentam a resposta adaptativa ao estresse repetido - sensibilização. O sistema limitante de estresse, que restringe a atividade do sistema de estresse e aumenta a resistência das estruturas celulares e órgãos à injúria, é composto por componentes centrais (GABA, dopamina, opióides, substância P) e periféricos (prostaglandinas, sistema antioxidante, proteínas do estresse). A exposição ao estresse determina ainda a ativação da síntese de óxido nítrico que atua tanto no sistema central, restringindo a atividade dos núcleos hipotalâmicos (PNV/LC) e bulbo, bem como nos sistemas locais, restringindo a liberação de hormônios do estresse (CRH, catecolaminas, ACTH, glicocorticóides) e inibindo o processo de injúria tecidual, respectivamente.

Curso 2.3

ESTRESSE: RESPOSTAS ADAPTATIVAS EM DIFERENTES SISTEMAS GESTÃO E DIERGISMO SEXUAL NA RESPOSTA VASCULAR ADAPTATIVA AO ESTRESSE. Ubrajara Lanza Júnior Pós-graduando em nível Doutorado do Programa de Farmacologia, ICB - USP - São Paulo.

Na vigência de gravidez, adaptações fisiológicas surgem em decorrência da necessidade da mãe garantir tanto a homeostasia própria quanto à de sua prole. O estresse de imobilização agudo

ou crônico perturba esta homeostasia determinando perda de peso corporal, aumento de peso da adrenal, diminuição da liberação dos fatores de relaxamento endoteliais, proteinúria e aumento da pressão arterial, sendo estes sintomas semelhantes ao quadro eclâmpico observado em humanos. Em humanos, o estresse materno durante a gravidez determina aumento nos níveis séricos de CRH, ACTH e cortisol, alterando o desenvolvimento fetal, fato que na vida adulta favorece a incidência de alterações cardiovasculares, desordens psiquiátricas e transtornos comportamentais como diminuição da interação social, aumento da ansiedade e aversão ao sono, sendo estes eventos também observados na esquizofrenia. O estresse também determina uma série de alterações vasculares e comportamentais no indivíduo adulto normal, que se fazem de maneira dependente de diferentes fatores, dentre eles o sexo. Dados anteriores obtidos em nosso laboratório demonstram não haver diérgismo sexual na resposta vascular adaptativa ao estresse, embora a literatura relate diérgismo sexual em diferentes sistemas. Assim, demonstrou-se que a hipotensão ortostática observada após exercício físico se faz de maneira mais expressiva na mulher adulta quando comparada aos homens na mesma idade, e que a exposição ao frio determina diminuição da freqüência cardíaca bem como aumento da temperatura da pele significativamente maiores em homens. A ativação do SNA simpático em resposta ao estresse mental, pode aumentar o hematócrito e a viscosidade sanguínea, levando à ocorrência de hemorragias. Estas alterações são mínimas no sexo feminino e de grande impacto no sexo masculino e se igualam no período pós-menopausa, alertando para a importância dos hormônios gonadais no diérgismo sexual observado nas respostas adaptativas ao estresse nos diferentes sistemas.

Curso 3.1

EXPRESSÃO GÊNICA E CARACTERÍSTICAS FARMACOLÓGICAS DOS RECEPTORES MUSCARÍNICOS. Maria Christina Verneck de Avellar, UNIFESP-EPM.

Os receptores muscarínicos, membros da super-família de receptores acoplados a proteína G, possuem papel importante na modulação de várias funções do sistema nervoso central e periférico quando ativados pela acetilcolina. A heterogeneidade dos receptores muscarínicos tem sido demonstrada por estudos funcionais, estudos com radioligantes e técnicas de biologia molecular. Nesta aula será apresentada uma visão atualizada da identificação e caracterização molecular dos subtipos destes receptores já descritos até o momento (M1, M2, M3, M4 e M5). A estrutura gênica e os domínios proteicos de cada subtipo de receptor muscarínico, importantes para a interação com drogas e estimulação de sinalização intracelular serão discutidos. Os novos conhecimentos, recentemente gerados pelos estudos de mutações gênicas e tecnologia de camundongo *knockout* para estes receptores, também serão revistos. Será dada ênfase às drogas, toxinas e anticorpos, atualmente

disponíveis e com seletividade diferencial para os subtipos de receptores muscarínicos, como importantes instrumentos na identificação e caracterização destes receptores em estudos farmacológicos funcionais e em ensaios de autoradiografia e imunohistoquímica.

Curso 3.2

SINALIZAÇÃO INTRACELULAR DOS RECEPTORES MUSCARÍNICOS. Rosely Oliveira Godinho, UNIFESP-EPM

Nesta aula será abordada a sinalização intracelular mediada pela ativação dos 5 subtipos de colinoceptores muscarínicos, membros da super-família de receptores acoplados à proteína G. As divergências no número e na seqüência de aminoácidos na 3ª alça intracelular do receptor são responsáveis pela interação seletiva destes receptores com diferentes proteínas G. Desta forma, os subtipos M1, M3 e M5 acoplam-se preferencialmente à proteína G_{q/11}, ativando a fosfolipase C α e estimulando a formação do trifosfato de inositol e diacilglicerol, subprodutos do bifosfato de inositol (IP3) e diacilglicerol (DAG). Por outro lado, os receptores M2 e M4 promovem a inibição da enzima adenilil ciclase, mediada pela ativação dos membros da família da proteína Gi/o. Apesar destas vias serem clássicas, os receptores M2 podem ainda acoplar-se a canais de K⁺ modular canais de Ca²⁺, assim como a fosfolipase A2, fosfolipase D e tirosinas quinases. A resposta biológica, desencadeada pela ativação dos colinoceptores muscarínicos, depende ainda da espécie animal, da idade, do tecido estudado e da concentração de agonista utilizado.

Curso 3.3

MECANISMO DE REGULAÇÃO DOS RECEPTORES MUSCARÍNICOS. Catarina Segreti Porto, UNIFESP-EPM.

Recentes estudos tem mostrado que os receptores muscarínicos podem formar homo- e heterodímeros ou ainda oligômeros. A dimerização dos subtipos M₂ e M₃ pode estar envolvida na amplificação da sinalização intracelular e/ou na ativação de uma via de transdução alternativa. Vários mecanismos estão envolvidos na regulação do número e função dos receptores muscarínicos. A dessensibilização destes receptores, induzida pelo agonista, geralmente envolve a fosforilação do receptor por PKC, PKA ou quinases de receptores acoplados à proteína G (GRKs) e a ligação da arrestina ao receptor fosforilado, inibindo sua ligação com a proteína G. Um segundo mecanismo de regulação é a internalização do receptor da superfície celular, que pode levar à degradação do receptor em lisossomas e, conseqüentemente, diminuição do número de receptores da superfície celular ou à desfosforilação em vesículas endocitóticas, por ação de fosfatases específicas, seguida por reciclagem para a membrana celular. Este último mecanismo é visto como um processo de resensibilização. Os subtipos de receptores muscarínicos podem utilizar diferentes vias de internalização, não retornando para a superfície celular ou sendo reciclados para a

membrana plasmática. O processo de internalização, além de regular o número e a sensibilidade do receptor ao agonista, pode ter um papel na ativação da via das MAPKs, como já mostrado para outros tipos de receptores. Além da própria degradação do receptor, a regulação do número de receptores na membrana celular pode ocorrer por mudanças na estabilidade ou taxa de transcrição do RNA mensageiro ou ainda por regulação heteróloga, por meio da interação com outros receptores acoplados à proteína G.

Curso 3.4

NEUROADAPTAÇÃO AO ESTRESSE. Estefânia Gastaldello Moreira

Qualquer estímulo, real ou subjetivo, que ameace a integridade fisiológica ou psicológica de um indivíduo, ativa o sistema de estresse no encéfalo, cujo principal objetivo é manter ou recuperar o equilíbrio do organismo. O encéfalo não somente é o local no qual a resposta ao estresse é iniciada e coordenada mas é também um alvo dos mediadores do estresse liberados durante esta resposta. Assim, neuroadaptações desencadeadas pelos mediadores do estresse (neurotransmissores, neuropeptídeos, hormônios) ocorrem com o objetivo de otimizar a capacidade adaptativa do organismo e aumentar sua chance de recuperar o equilíbrio. Essas neuroadaptações manifestam-se como modificação de comportamentos pré-existentes ou aquisição de novas estratégias comportamentais. Se as neuroadaptações ocorridas não forem suficientes para diminuir o estímulo estressor a resposta ao estresse persiste e há uma exposição prolongada aos mediadores do estresse, o que pode ter efeitos adversos em vários sistemas do organismo, levando a doenças. Assim, acredita-se que uma resposta ao estresse inadequada ou exacerbada levaria a um desequilíbrio de neurotransmissores, distúrbios nos ritmos circadianos e atrofia de estruturas cerebrais, fatores estes que estariam envolvidos em doenças como a ansiedade, depressão, agressividade, uso abusivo de drogas, estresse pós-traumático e esquizofrenia. Neste módulo, revisaremos as neuroadaptações desencadeadas pela resposta ao estresse, bem como o envolvimento dos corticosteróides e das monoaminas (noradrenalina, dopamina e serotonina) nestas neuroadaptações.

Curso 4.2

CHEMOKINES AND INTRACELULAR SIGNALING PATHWAYS INVOLVED IN THE CELL MIGRATION. Oliveira SHP Faculty of Dentistry, FOA, UNESP, Araçatuba.

Chemokines are a large family of cytokine play a highly important role in orchestrating the exquisitely organized and regulated movement of cells to specific locations within the body expressing a large repertoire of chemokine receptor in different cells type. In addition chemokines promote leukocyte migration, and are potent cellular activator. Because chemokines are able to elicit different cell-type, they have been shown to medi-

ate inflammatory tissue destruction in a wide variety of human diseases, such as rheumatoid arthritis, myocardial infarction, adult respiratory distress syndrome and asthma. Concerning to the structure, it has been demonstrated that chemokines are 8-12 kD heparin-binding proteins that are rich in basic amino acids and contain conserved cysteines motifs forming essential disulfide bonds between the first and thirds and the second and fourth cysteines located near the N-terminus of the protein defining four structural motifs: CXC, CC, C and CX3C. The chemokine receptor exerts most of their biological effects by binding to a large family of Gi-protein-coupled seven-transmembrane receptors leading to activation of multiple intracellular signalling pathways. The agonist-protein G receptors ligation involve activation of the heterotrimeric G complex that is responsible, when activated, for different cellular functions. For example, the stimulation of chemotaxis by a chemokine enquires functional coupling of the receptor to G α_i , because migration is completely inhibited by treatment of the cells with pertussis toxin. However, G α_i itself appears not to be necessary for cell migration. The essential step is the release of the heterotrimeric G protein $\beta\gamma$ subunits from G α_i and the G β protein-coupled receptor. It was shown that only $\beta\gamma$ subunits released from G β -coupled receptors, but not those released from G α_s - or G α_q -coupled receptors, could mediate cell migration.

Curso 4.6

THE ROLE OF MAPK IN THE EOSINOPHIL-INDUCED CHEMOKINE ACTIVATION AND MIGRATION. Oliveira SHP, Faculty of Dentistry, FOA, UNESP, Araçatuba.

The activation of eosinophils by cytokines or chemokines is a critical event in the allergic inflammatory response of the tissue. Because of this fact, a better understanding of the signal transduction pathways, which regulate eosinophil chemotaxis, activation and their sequestration to sites of inflammation in the tissue, is the considerable importance. The mitogen-activating protein kinase (MAPK) cascade is one of the most frequently studied signal transduction systems and is known to participate in variety of pathophysiological responses and multiple cellular functions, such as proliferation, differentiation, survival, activation and locomotion. Five distinct MAP kinase cascades have been described in mammalian cells, including the extracellular-regulated kinase 1 and 2 (ERK1/2)(p42/44), the c-jun N-terminal kinase (JNK), the p38 MAP kinase, ERK3 and ERK5. In recent studies, in eosinophils, eotaxin (CCL11), a CC chemokine that bind CCR3, induces degranulation and chemotaxis through the activation of ERK2 (a downstream from p42/44 MAPK) and p38 mitogen-activated protein kinases. However p38 MAP kinase plays a greater role than ERK2 in the eosinophil differentiation and MIP-1 α production by eosinophils. Eo-

taxin-2 (CCL24) is able to alter eosinophil integrin function via mitogen-activated protein kinases, suggesting that MAP kinases, may facilitate eosinophil recruitment at the sites of allergic inflammation by shifting their adhesion molecule usage away from VCAM-1-dominated to ICAM-1-dominated pathways. In summary, understanding the intracellular signalling pathways triggered by chemoattractants that govern eosinophil trafficking to sites of inflammation may offer additional molecular targets for antagonism of eosinophil-mediated allergic diseases.

Curso 5

Bases Celulares da Cronofarmacologia

O Curso tem por objetivo apresentar os últimos avanços no sistema cronobiológico e avaliar como este pode interferir na resposta do organismo à drogas. Os seres vivos adaptaram-se ao longo dos anos às variações rítmicas do ambiente de forma a estarem preparados para as oscilações e não somente terem ações reativas às mesmas. Para poder prever as mudanças ambientais, os organismos precisam marcar o tempo por si e compararem este tempo endógeno com as variações rítmicas da natureza. Desta forma foi desenvolvido um sistema para marcar o tempo endogenamente (relógio biológico), um mecanismo que permita o ajuste deste relógio às 24 horas do dia e vários mecanismos que informam aos órgãos e sistemas esta variação temporal. Na primeira aula a Profa. Regina P. Markus apresentará dados que demonstram a existência de um relógio endógeno, sua localização anatômica e o mecanismo de funcionamento em nível celular e nuclear. A segunda aula, ministrada pela Dra. Zulma Silva Ferreira versará sobre o funcionamento da glândula pineal, os mecanismos de produção e controle da melatonina, que é o hormônio conhecido como hormônio do escuro e que é produzido a partir de comandos do relógio central. Serão avaliados os neurotransmissores e neuromoduladores envolvidos no controle da produção de melatonina e as respectivas vias de sinalização. Na terceira aula, a doutoranda Celina Monteiro Lotufo apresentará os mecanismos periféricos de ação da melatonina, descrevendo ação via receptores de membrana e ação intracelular. Nesta aula também será dada ênfase aos efeitos da melatonina sobre a resposta inflamatória.

Curso 5.1

Ritmos biológicos: "clock genes" e relógios periféricos. Regina Pekelmann Markus (IB/USP)

Todas as células estudadas têm mostrado capacidade de gerar marca-dores de tempo. No entanto, em mamíferos células localizadas nos núcleos supraquiasmáticos do hipotálamo são capazes de gerar um ritmo robusto que, através de vias neurais e humorais é retransmitido para todo o organismo permitindo uma sincronização das diferentes funções. Além disso o relógio é sincronizado pelo ciclo claro-escuro ambiental às atividades diurnas e noturnas. Os genes do relógio funcionam de forma sincrônica transcrevendo proteínas que tem sua meia vida controlada por outros genes. Neste curso faremos um descrição do estado da arte deste tópico, bem como, da relação com os hormônios relacionados com atividade (glicocorticóides) e escuro (melatonina).

Curso 5.1

Glândula pineal e melatonina, hormônio sinalizador do escuro

Zulma

da Silva Ferreira (IB/USP)

A glândula pineal tem como principal função a sincronização dos vários ritmos biológicos ao ciclo de iluminação ambiental através da produção rítmica de melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina), hormônio mais conhecido da pineal, produzido e liberado por esta glândula na fase de escuro. A flutuação diária da síntese e secreção de melatonina (níveis altos no escuro e baixos, ou mesmo não mensuráveis, no período de claro) sinaliza para o meio interno do organismo se é noite ou dia no ambiente. Além disso, a duração da secreção de melatonina sinaliza a duração do escuro e, portanto, as estações do ano.

A informação luminosa alcança a pineal através de uma via polissináptica que envolve a retina, o núcleo supraquiasmático (NSQ), o núcleo paraventricular hipotalâmico (NPVH) e o gânglio cervical superior (GCS), de onde partem fibras simpáticas que inervam a glândula pineal. A produção de melatonina é iniciada pela estimulação de adrenoceptores beta e, é potenciada pela estimulação de purinoceptores P2Y₁. A ação deste neurotransmissores envolve transcrição dos genes das enzimas da via biossintética e potenciação da atividade das mesmas enzimas. Nesta aula, serão abordados diferentes aspectos da função pineal.

Curso 5.2

Cronofarmacologia e resposta inflamatória

Celina Monteiro da Cruz Lotufo (IB/USP)

aguda.

Nesta aula serão abordados os mecanismos para ação da melatonina assim como a forma com que a melatonina, agindo através de diferentes mecanismos, pode modular as respostas inflamatórias.

Existem três subtipos de receptores para melatonina conhecidos em mamíferos. Os receptores MT1 e MT2 são receptores de membrana já clonados e acoplados à proteína Gi. O receptor MT3 não possui estrutura molecular conhecida, tendo sido sugerido recentemente tratar-se de uma enzima, a quinona reductase 2. Por ser uma molécula lipofílica a melatonina pode atuar também sobre sítios intracelulares. A melatonina pode interagir com a molécula de calmodulina, inibindo a ativação de proteínas pelo complexo cálcio-calmodulina. A melatonina pode, também, regular a transcrição gênica no núcleo celular pois parece ser o ligante endógeno para uma família de receptores nucleares, os receptores retinóides Z ou receptores retinóides órfãos (RZR/ROR). Os mecanismos acima citados possivelmente são os responsáveis pelos efeitos da melatonina endógena, já que ocorrem em baixas concentrações de melatonina (pM a nM). Por outro lado, a administração de altas concentrações (mM a mM) de melatonina exógena resulta em uma série de efeitos que dependem da propriedade da molécula de melatonina como "scavenger" de radicais livres e como agente antioxidante. A administração de melatonina em altas concentrações resulta em efeito antiinflamatório, tendo sido observado diminuição de edema, migração de neutrófilos, formação de peroxinitrito e ativação da iNOS em diferentes modelos de inflamação. Estes efeitos são dependentes direta ou indiretamente das propriedades antioxidantes da melatonina. A diminuição da produção de espécies reativas do oxigênio resulta em diminuição da ativação do fator de transcrição NF-kappaB, responsável pela transcrição de diversos genes pró-inflamatórios. A inflamação crônica granulomatosa apresenta ritmo circadiano dependente da produção endógena de melatonina pela glândula pineal, sendo observada um edema menor na fase de escuro. Na inflamação aguda o aumento de permeabilidade vascular e a migração de neutrófilos são menores quando o estímulo inflamatório é administrado na fase de escuro. A melatonina e análogos que atuam sobre receptores de melatonina reduzem o processo de "rolling" e adesão de neutrófilos ao endotélio, sugerindo um efeito da melatonina endógena sobre a inflamação

HOT COMMUNICATIONS

HC 1

EFFECTS OF FRUTALIN, A GAL-BINDING LECTIN, ON NEUTROPHIL MIGRATION AND ACTIN CYTOSKELETON DYNAMICS: INVOLVEMENT OF TYROSINE KINASE AND PI3 KINASE.

Aline C.BrandoLima*, Roberta FS.Gama*, Cristiane R.Pereira, Ana C. O. Monteiro-Moreira, Renato A.Moreira* and Christina Barja-Fidalgo*
* Departamento de Farmacologia, Instituto de Biologia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, RJ. † Laboratório de Lectinas, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Centro de Ciências Universidade Federal do Ceará, CE, Brazil

INTRODUCTION: Several endogenous lectin-like molecules, as selectins, have been shown as potent activators of leukocytes. **OBJECTIVE AND GOALS:** We have investigated the effect of Frutalin, a D-galactose-binding plant lectin isolated from *Artocarpus incisa* seeds, on neutrophil migration in vivo and in vitro and the commitment of the actin cytoskeleton dynamics and of tyrosine kinase pathway in these actions. Frutalin injected into pleural cavity of mice (30 µg/cavity) induced an inflammatory response characterized by a dose-dependent cellular migration that peaks neutrophil at 4h and caused a significant accumulation of eosinophils after 24h and augment of mononuclear cells 72h after administration. The migratory effect was blocked by co-injection of Frutalin with D-galactose (100 x [M] lectin), but not by other sugars. In vitro, Frutalin was chemotactic for human neutrophils in Boyden chambers. Pre-incubation of human neutrophils with the lectin did not interfere with the chemotaxis induced by Frutalin itself or other chemotactic agent as fMLP. In parallel with the chemotaxis, interaction of Frutalin with human neutrophils induced a sharp increase in actin polymerization and in tyrosine phosphorylation. These effects were strongly inhibited by D-gal or fucoidan, a selectin inhibitor by genistein, a tyrosine kinase inhibitor or by LY290240, a PI3 kinase inhibitor. Interaction of FTL with PMN also induced Focal adhesion kinase (FAK) activation, suggesting a secondary activation of inside-out integrin-coupled signal. **CONCLUSIONS:** The data indicate that interaction of Frutalin with carbohydrate residues on human neutrophils activates these cells inducing migration through a tyrosine and PI3 kinase-dependent pathway (FAPERJ, CNPq, SR-2-UERJ)

HC 2

ANTAGONIST OF BRADYKININ B2 RECEPTOR POTENTIATES WHEREAS ANTAGONIST OF B1 RECEPTOR INHIBITS MICE ALLERGIC LUNG INFLAMMATION. Landgraf, R.G.1, Sirois, P. and Jancar, S.1. 1Dept. of Immunology/CB-USP and 2Dept. of Pharmacology/Univ of Sherbrooke, QC, Canada.

Introduction: Bradykinin B2 receptor is constitutively expressed in several tissues and B1 receptor expression is induced in some inflammatory conditions. The role of these receptors in asthma is poorly understood. We investigated the effect of bradykinin B1 and B2 receptors antagonists in a murine model of asthma focusing on airways cell infiltration, hyperreactivity and

mucus secretion. **Methods:** Mice C57Bl/6 were immunized with OVA/Alúmen (10µg/1.6mg), and challenged 14 and 21 days later by exposition to the aerosol of OVA (2,5%, 20min). Bradykinin B2, HOE-140, and B1, R-954, receptor antagonists were given i.p. 30 min before each challenge to ovalbumin sensitized mice. After 24 h, bronchoalveolar lavage (BAL) was performed for analysis of cells and lungs were removed for evaluation of airway hyperreactivity and histopathology. **Results:** Treatment with HOE-140 caused a significant increase in BAL fluid cell number: eosinophils (82%), neutrophils (98%), lymphocytes CD4+ (192%), CD8+ (236%), B220+ (84%), Tgd (194%) and NK1.1 (246%). Hyperreactivity and mucus secretion were not significantly affected by this antagonist. Treatment with R-954 significantly reduced eosinophil (79%) and neutrophil (83%) numbers but had no effect on the number of lymphocytes in BAL. Airways hyperreactivity and mucus secretion were reduced by this treatment (84% and 35% respectively). **Discussion/Conclusion:** Our data suggest that in this model of allergic lung inflammation activation of the constitutive B2 receptor will down-regulate the inflammation while activation of the inducible B1 receptor will have pro-inflammatory effects. **Financial support:** FAPESP and CNPq.

HC 3

ALTERNAGIN-C, A NEW PROTEIN WITH DISINTEGRIN DOMAIN ISOLATED FROM *Bothrops alternatus*, INDUCES HUMAN NEUTROPHILS CHEMOTAXIS BY ACTIVATION OF INTEGRIN-MEDIATED SIGNALING PATHWAYS. Mariano-Oliveira, A.1, Coelho, A.L.J.1, Selistredede-Araujo H. S.2, Barja-Fidalgo, C.1 & De Freitas, M.S. 1 1 Dept. Farmacologia, Instituto de Biologia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, RJ; 2 Depto. Ciências Fisiológicas, Universidade Federal de São Carlos, SBrazil.

Disintegrins, a family of disulfide-rich proteins isolated from snake venoms, are potent inhibitors of cell-matrix and cell-cell interactions mediated by integrins, including platelet aggregation, tumor cell metastasis and angiogenesis. Recently, a novel protein, alternagin-C, containing a disintegrin domain was purified from *Bothrops alternatus* venom. This protein showed to be a potent antagonist of $\alpha 2\beta 1$ integrin and inhibited cell adhesion to collagen type I. In this work, we studied the effects of alternagin-C on human neutrophil (PMN) functions: chemotaxis and the activation of integrin-mediated signaling pathways. Alternagin-C presented a potent chemotactic effect for PMN when compared to fMLP, a classic chemotactic. Moreover, incubation of PMN with alternagin-C induced heterologous and homologous inhibition of chemotaxis against fMLP and by itself, respectively. This disintegrin induced an increase in the content of polymerized actin filaments, which was inhibited by genistein, a tyrosine kinase inhibitor, suggesting an involvement of

tyrosine kinase pathways. The activation of focal adhesion kinase (FAK) in PMN was determined by its autophosphorylation, therefore a significant increase in the content of phosphotyrosine in FAK was induced by alternagin-C. Phosphoinositide 3-kinase (PI3-K), an important molecule involved in the leukocyte migration, can associate with FAK. We observed that this disintegrin was also able to induce an association of FAK to PI3-K. Our results suggest that alternagin-C directly interact with integrins, triggering intracellular signals characteristic of integrin-activation pathways and modulating human neutrophil functions. **Supported by:** CNPq, FAPERJ, IFS, SR2-UERJ.

HC 4

EFFECTS OF TACHYKININ ANTAGONISTS ON AIRWAY INFLAMMATION AND THE RELEASE OF REMODELING-ASSOCIATED MEDIATORS IN MICE EXPOSED TO LIPOPOLYSACCHARIDE.

V. Lagente¹, M. Véron¹, I. Guénon¹, S. Nénan¹, X. Emonds-Alt², C. Advenier³ and E. Boichot¹: 1: INSERM U456, IFR 97, Université de Rennes 1, Rennes, France. 2: Sanofi-Synthelabo recherche, Montpellier, France. 3: Université Paris V Paris, France.

Several observations suggest that tachykinins are involved in the pathogenesis of bronchopulmonary alterations and elicit several airway responses via interactions with specific receptors denoted NK1, NK2 and NK3. We have investigated the effect of antagonists for tachykinin NK1 (nolpitanium, SR 140333), NK2 (saredutant, SR 48968) or NK3 (osanetant, SR 142801) receptors on the inflammatory cell recruitment, TNF- α and IL-6 release and gelatinase B (MMP-9) activity in the bronchoalveolar lavage (BAL) fluid of mice exposed to lipopolysaccharide (LPS) of *E. Coli* (100 µg/ml aerosol for 30 min). Treatment of mice with a combination of SR 140333 and SR 48968 (10⁻⁶ M aerosol for 30 min or 3 mg/kg i.p.) significantly reduced the increase in total cells and neutrophils observed 2.5 h after LPS exposure. In contrast, no significant reduction was noted in the increase of TNF- α . Moreover, only the i.p. treatment with the tachykinin antagonists was able to significantly reduce MMP-9 activity in the BAL fluid. Treatment with the NK3 antagonist SR 142801 (10⁻⁶ M, aerosol) did not inhibit the influx of neutrophils, but markedly reduced the increased in TNF- α and IL-6 levels at 2.5 h and MMP-9 activity at 20 h in the BAL fluid of mice exposed to LPS. These results show that the three tachykinin antagonists may interfere with the development of airway inflammation, namely neutrophilia, TNF- α release or MMP-9 activity in the BAL fluid of mice exposed to LPS and suggest that NK1 and NK2, but also NK3 receptors are involved in the modulation of inflammatory response and airway remodeling.

HC 5

NA PRÉ-ECLÂMPSIA AS ALTERAÇÕES VASCULARES A ANGIOTENSINA II PODEM ESTAR

ASSOCIADAS AO AUMENTO DA EXPRESSÃO DE RECEPTORES AT1.

Rodrigues, Fábio Ulisses Sales ,
Ferreira, Karine Azevedo São Leão,
Takiuti, Nilton H., Kahhale, S., Zugaib,
Marcelo, Saldiva, Paulo Hilário do
Nascimento, Carvalho, Maria Helena
C., Tostes, Rita de Cássia Aleixo. Dep-
to. de Farmacologia – Instituto de
Ciências Biomédicas e Depto. de
Obstetrícia e Depto. de Patologia da
Faculdade de Medicina da Universida-
de de São Paulo – São Paulo/SP

Objetivos: A Pré-Eclâmpsia (PE) é uma doença sistêmica de etiologia desconhecida que acomete 7 a 10% das grávidas, sendo caracterizada por hipertensão arterial, proteinúria e resposta vasoconstritora exarcebada para Angiotensina II (Ang II). Utilizando Artéria Epigástrica Superficial (AES) de gestantes normotensas (N) e com PE avaliamos se o aumento de reatividade vascular a Ang II está associado a alterações na expressão gênica dos receptores AT1 e AT2 (rAT1 e rAT2) de Ang II. Métodos e Resultados: Anéis de AES foram utilizados para registros de tensão isométrica e estimulados com KCl (10 a 120mM), Nor (10⁻⁹ a 10⁻⁵M) e Ang II (10⁻¹⁰ a 10⁻⁶M). Expressão gênica (RNAm) dos rAT1 e rAT2 avaliou-se por RT-PCR. O RNA total extraído das AES usou-se na reação da transcriptase reversa para obtenção de cDNA, utilizado na reação de PCR com sondas para os rAT1 e rAT2. Gestantes PE apresentaram valores de P.A.(PAD=100,8 e PAS=156,2), ác. Úrico (6,3 mg/dl) e proteinúria (1,35 g/l) aumentados, o que não observou-se nas N. Não observou-se diferenças na reatividade vascular ao KCl (pD₂= 1,38 ± 0,04 PE vs. 1,42 ± 0,03 N) e Nor (pD₂= 7,21 ± 0,1 PE vs. 7,22 ± 0,2 N). Entretanto, AES de PE apresentaram maior sensibilidade à Ang II (pD₂= 8,45 ± 0,1 PE vs. 7,84 ± 0,3 N / p=0,0526). A expressão gênica de rAT1 (unidades arbitrárias 0,92 ± 0,2 PE vs. 0,58 ± 0,02 N) estava aumentada (p<0,05) em AES de PE, o que não observou-se para rAT2 (1,05 ± 0,08 PE vs. 0,94 ± 0,1 N). Na imunohistoquímica observamos presença de rAT1 em células do músculo liso (CML) da camada média do vaso e rAT2 em células endoteliais e CML. Conclusão: A sensibilidade a Ang II nas AES está aumentada nas gestantes com PE o que parece estar relacionada ao aumento na expressão gênica do rAT1. Apoio Financeiro: FAPESP