

Farmacologia Celular e Molecular

06.001

ROLES OF CHEMOKINES IN THE LUNG RESPONSE DURING SEVERE SEPSIS

Benjamin C. Hogaboam C, Lukacs N, Kunkel, S Department of Pathology, MSI, University of Michigan, Ann Arbor, MI, USA

The aim of this study is to assess the mechanism by which severe sepsis alters subsequent lung immune responses against a secondary fungal infection (*A. fumigatus*) in mice, focusing on the role of chemokines and their receptors in the outcome of the disease. C57Bl6 mice receiving cecal ligation and puncture (CLP-9Puncture) had a 90% reduction in neutrophil migration to peritoneal cavity at 18h and 100% mortality by 48h post-CLP. Overall survival was improved to 68%, 36% or 18% by antibiotic treatment every 12h for 3d when the first dose was given at 8, 12 or 18h post-CLP, respectively. Mice receiving antibiotic starting at 8h post-CLP had significant neutrophil accumulation at 1, 3 and 7d post-CLP. Bacteria were seen in the blood and peritoneum exudates at all time points, decreasing at day 3. In the BAL, we only detected bacteria in the 1st day. KC, JE, MIP-2, MIP-1 α , TNF α and IL-10 levels were increased in the peritoneal exudates, BAL and lung until 1d after CLP after which they were undetectable. Interestingly, high levels of IL-13, C10 and TCA-3 were present in these compartments until 7d. When mice were i.n. challenged with 1x10⁸ of *A. fumigatus* 1 or 3d post-CLP no differences in survival were observed. These data indicate that antibiotic treatment changes the immunological responses (survival, chemokine and cytokine production and neutrophil migration) observed in severe CLP due to infection reduction, and as a result, the mice are able to resolve a secondary lung infection following CLP. We suggest that IL-13, TCA-3 and C10 are restoring the immune response of the host against this secondary hit. Supports: CNPq, NIH

06.002

EFFECT OF ANGIOTENSIN II AT₁ RECEPTOR MUTANTS L265D AND L262D ON CELL GROWTH.

Corrêa, S.A.A., Shimuta, S.I., Biophysics Dept., UNIFESP

Introduction. Angiotensin II (All) causes a rapid increase in inositol phosphate (IP) production and stimulates the cell growth in CHO-K1 cells expressing All AT₁ receptor (CHO-AT₁). Two AT₁ receptor mutants, L265D and L262D, were stably expressed in CHO cells and the recombinant AT₁ receptors were functionally characterized. Since cAMP has an established role in cellular growth, our aim was to investigate the effect of the All on cAMP production and on cell growth in cells expressing these mutants. Methods. Binding assays, formation of ³H-IP and of cAMP (enzyme immunoassay). Results. The expression of the mutants L265D and L262D was similar to that of the wild type but the L265D induced reduction in affinity for All and in relative potency to induce IP production whereas L262D was not significantly different from the wild type, WT (IC₅₀ (nM), 81, 0.2 and 0.5; ED₅₀ (nM), 80, 0.5, 0.8,

respectively, for L265D, L262D and WT). In both cell lines, the level of basal production of cAMP (1300±181 and 1150±162 fmol/10⁶ cells, respectively for L265D and L262D) was higher than that in WT (500±50 fmol/10⁶ cells). Forskolin (1 nM) stimulated the cAMP formation in these cell lines (about 3 folds) whereas All (0.1 μM) had no effect even on the WT cells. By counting the cells after 48 h, the cell proliferation was: 3.0, 1.5 and 2.0 folds, respectively for WT, L265D and L262D. Conclusion. Our results suggest that the side chain of Leu in the positions 262 and 265 in the helix VI of the AT₁ receptor may be crucial for the conformation of the complex ligand/receptor and its coupling to the signal transduction pathways. Supported by: FAPESP; CNPq.

06.003

ROLE OF ANGIOTENSIN II AT₁ RECEPTOR 3'-UNTRANSLATED REGION IN REGULATING SIGNAL TRANSDUCTION PATHWAYS.

Shimuta, S.I., França, L.P Biophysics Dept. UNIFESP-EPM.

Introduction. The cellular mechanisms underlying many actions of angiotensin II (All) involve the activation of distinct signaling pathways and diminution of responsiveness, termed tachyphylaxis. Recently it was found that CHO cell line which was transfected with the cDNA fragment of 1.1 kb in length, containing the coding region of the All AT₁ receptor and 56 base pairs (bp) of its 3'-untranslated region (UTR) and 52 bp of its 5'-UTR, rendered tachyphylactic to All as expected but it occurred also with [Lys²]All-induced ⁴⁵Ca²⁺ responses, a non-tachyphylactic analog in smooth muscle cells. In order to assess a role for either 3'- or 5'-UTR of the AT₁ receptor, a cDNA fragment of 1.9 kb containing the entire 3'-UTR sequence (845 bp) and 52 bp of its 5'-UTR was stably expressed in CHO cells and the resulting recombinant AT₁ receptor was evaluated. Methods. Transfection and expression of the AT₁ receptor in CHO-K1 cells and ⁴⁵Ca²⁺ uptake assay. Results. In cells without 3'-UTR, the stimulated ⁴⁵Ca²⁺ uptakes by 0,1 nM All or 1 nM [Lys²]All (211 ±20 and 200 ±18 % over the basal value, respectively) were inhibited after three stimulations (30% and 20% inhibition, respectively). However in cells with 3'-UTR All but not [Lys²]All induced tachyphylaxis to ⁴⁵Ca²⁺ responses, 60% and 99% over the first response, which were 154 ±15% and 145 ±10% over the basal value, respectively. Conclusion. This finding suggests that the 3'-UTR in the AT₁ receptor may play a role in the activation and desensitization of intracellular signaling. Supported by: FAPESP, CNPq.

06.004

FUNCTIONAL ACTIVATION OF A DEFECTIVE AT₁ RECEPTOR AFTER CO-EXPRESSION WITH THE mas ONCOGENE

Edson L. Santos, Claudio M. Costa-Neto, João B. Pesquero e Antonio C. M. Paiva. Department of Biophysics, Escola Paulista de Medicina – UNIFESP

Introduction: The mas protooncogene is an or-

phan G protein-coupled receptor (GPCR), which was reported to enhance the effects of angiotensin II (AngII) in cells expressing AT₁ receptors, possibly due to a functional interaction between the two receptors. Since receptor dimerization is known to occur in members of the GPCR family including the AT₁ receptor, we investigated the possibility of a functional interaction between mas protooncogene and AT₁ receptors. Methods and Results: For this purpose, the AT₁ double-mutant C18F/K20A receptor obtained with the PCR overlap extension technique, the AT₁ wild-type and mas receptors were permanently transfected and co-transfected in CHO cells for subsequent functional analysis by inositol phosphate turnover and cytosensor assays. AngII had no effect on the mas or C18F/K20A double mutant, however the co-expression of both evoked a recovery of affinity and efficacy after AngII stimulation to a level similar to that of the wild-type receptor. Conclusion: These results suggest that AT₁ and mas receptors could be undergoing dimerization, and this phenomena could generate a functional entity. Financial support: CNPq and FAPESP.

06.005

EFFECT OF OVARIECTOMY ON MUSCARINIC RECEPTORS IN ADULT RAT HIPPOCAMPUS.

Souza, A.C.R. ¹; C.S., Porto ²; Abdalla, F.M.F. ¹. ¹Laboratory of Pharmacology, Instituto Butantan, ²Experimental Endocrinology Section, Department of Pharmacology UNIFESP-EPM, São Paulo, SP Brazil.

Introduction: Studies have shown that basal forebrain cholinergic neurons are significantly affected by physiological fluctuations in circulating levels of estrogen. Adult female rats, which are not controlled for their estrous cycle, showed greater variation in density and affinity of muscarinic acetylcholine receptors in cortical tissues than the male rats (Van Huizen, E. Eu. J. Neurosci., 6: 237, 1994). The mechanism underlying of estrogen on cholinergic function has not been well elucidated, may be related to changes at the muscarinic acetylcholine receptors levels. The present study was designed to investigate the effect of ovariectomy on muscarinic acetylcholine receptors (density, affinity and subtypes) in adult rat hippocampus. Methods: Hippocampus were obtained from rats in proestrus (control) and ovariectomized 15 days prior the experiments. In experiments of saturation, membrane preparations were incubated with [³H]Quinuclidinyl benzilate ([³H]QNB) (0.05-8,00 nM) in the absence and presence of atropine (1 nM) (30°C/1 h). In experiments of competition, membrane preparations were incubated with [³H]QNB (concentration near the K_d value), in the absence and presence of increasing concentrations of muscarinic antagonists (30°C/1 h). Results: The data analysis revealed one specific and saturable binding site, with K_d=0.53 ±0.10 nM and B_{max}=1839.61 ±270.57 fmol/mg protein (n=5) in ovariectomized, and with K_d=1.00 ±0.18 nM and B_{max}=725.77 ±117.84 fmol/mg protein (n=4) in hippocampus of control rats. The pK_i values were 9.17 ±0.13 and 8.88 ±0.09 (n=4) for atropine (non-selective antagonist), 7.18 ±0.05 and 6.61 ±0.03 (n=5) for pirenzepine (M₁-se-

lective), 9.79 ± 0.22 and 9.64 ± 0.13 (high binding site) and 7.42 ± 0.30 and 7.43 ± 0.11 (n=4) (low binding site) for 4-DAMP (M_2/M_3 -selective), 6.80 ± 0.14 and 6.56 ± 0.32 (n=4) for methoctramine (M_2 -selective), 6.87 ± 0.09 and 6.13 ± 0.05 (n=4) for pFHHSID (M_3 -selective) and 6.64 ± 0.14 and 6.45 ± 0.03 (n=4) for tropicamine (M_4 -selective) in ovariectomized and control rats, respectively. Conclusion: The results provide evidence that the ovariectomy increase the affinity and the number of muscarinic acetylcholine receptor in the rat hippocampus. Correlation analysis showed that M_1 muscarinic receptors are present in tissues of both animals. Supported by FAPESP

06.006

EFFECT OF ESTROGEN ON MUSCARINIC ACETYLCHOLINE RECEPTORS IN RAT HIPPOCAMPUS. Souza, A.C.R.; Koyama, C.A.; Porto, C.S.; Abdalla, F.M.F.¹. ¹Laboratory of Pharmacology, Instituto Butantan, ²Experimental Endocrinology Section, Department of Pharmacology UNIFESP-EPM, São Paulo, SFBrazil.

Introduction: Studies have shown that basal forebrain cholinergic neurons are significantly affected by physiological fluctuations in circulating levels of estrogen. Ovariectomy decreases choline acetyltransferase activity in the basal forebrain and this effect can be reversed by estrogen replacement (Luine, V.N., Exp. Neurol., 89: 484, 1985; Wu, X., Brain Res., 644: 305, 1999). Estrogen administration can also produce an up-regulation of choline acetyltransferase mRNA and protein (Gibbs, R.B., Exp. Neurol., 16: 23, 1992), as well as, an increase in high affinity choline uptake (O'Malley, C.A., Brain Res., 403: 389, 1987). Adult female rats, which are not controlled for their estrous cycle, showed greater variation in density and affinity of muscarinic acetylcholine receptors in cortical tissues than the male rats (Van Huizen, F., Eur. J. Neurosci., 6: 237, 1994). The mechanism underlying of estrogen on cholinergic function has not been well elucidated, may be related to enhances of choline acetyltransferase activity and or related to changes at the muscarinic acetylcholine receptors levels (number, affinity and subtypes) and/or in the intracellular signaling mechanisms. The present study was designed to investigate the effect of estrogen on muscarinic acetylcholine receptors (density and affinity) in adult rat hippocampus. Methods: Hippocampus were obtained from rats in proestrus (control), ovariectomized 15 days prior the experiments (C15), ovariectomized 15 days prior the experiments and treated with estrogen during 7 days (50 ng/Kg body weight/day) (C15+E7) and ovariectomized and chronic estrogen-treated during 21 days (50 ng/Kg body weight/day) (C+E21). In experiments of saturation, membrane preparations were incubated with [³H]Quinuclidinyl benzilate ([³H]QNB) ($0.05\text{--}8.00 \text{ nM}$) in the absence and presence of atropine (1 nM) ($30^\circ\text{C}/1 \text{ h}$). Results: The data analysis revealed one specific and saturable binding site, with $K_D=1.00 \pm 0.18 \text{ nM}$ and $B_{\text{max}}=725.77 \pm 117.84 \text{ fmol/mg protein}$ (n=4) in hippocampus of control rats, with $K_D=0.53 \pm 0.10 \text{ nM}$ and $B_{\text{max}}=1839.61 \pm 270.57 \text{ fmol/mg protein}$ (n=5) in C15 rats, with $K_D=0.55 \pm 0.06 \text{ nM}$ and

$B_{\text{max}}=1282.21 \pm 198.57 \text{ fmol/mg protein}$ (n=5) in C15+E7 rats and with $K_D=0.32 \pm 0.10 \text{ nM}$ and $B_{\text{max}}=851.24 \pm 145.06 \text{ fmol/mg protein}$ (n=5) in hippocampus of C+E21 animals. Conclusion: The results provide evidence that the estrogen decrease the number of muscarinic acetylcholine receptor in the rat hippocampus. Supported by FAPESP

06.007

EFFECTS OF MUSCARINIC ACETYLCHOLINE RECEPTOR ANTAGONISTS ON APO J SECRETION IN RAT EPIDIDYMIS. Maróstica, E.*; Avellar, M.C.W.; Porto, C.S.*; Morales, C.R.**. *Section of Experimental Endocrinology Department of Pharmacology UNIFESP-EPM, SFBrazil; **Department of Anatomy and Cell Biology, McGill University, Montreal, Canada.

Introduction: Autonomic neurotransmitters, such as noradrenaline, in addition to mediate neuromuscular events, may play a role in several functions of epithelial cells of the epididymis, including ionic exchange (Chan et al., Biol.Reprod. 51: 1040, 1994) and protein secretion (Ricker et al., J.Androl. 17: 117, 1996). Apolipoprotein J (Apo J) is one of the proteins secreted by the epididymis which may play an important role in the gamete maturation (Hermo et al., 1991; Sylvester et al., 1991). Apo J expression does not appear to be regulated by pituitary or testicular factors (Hermo et al., 2000). Furthermore, we have shown the presence of M_2 and M_3 muscarinic acetylcholine receptor (mAChR) subtypes in the rat epididymis (Maróstica et al., Biol.Reprod. 65: 1120, 2001). Thus, the purpose of this work was to investigate whether changes occur in the pattern of Apo J expression in rat epididymis after treatment with mAChR antagonists. Methods and Results: 50-day-old male Sprague-Dawley rats were anesthetized and treated with mAChR antagonists: atropine (non-selective antagonist, 480 ng/rat), methoctramine (M_2 -selective, 120 ng/rat), pFHHSID (M_3 -selective, 1200 ng/rat) and saline (control) through renal vein. After 2h of treatment, the epididymis were fixed by perfusion with 5% buffered formaldehyde solution through the abdominal aorta. Following perfusion, the epididymides were removed, dehydrated and embedded in paraffin. Light-microscopic immunostaining was carried out according to Hermo et al. (2000) by using anti-rat Apo J 6E9 monoclonal antibody. In untreated animals (control), principal cells of proximal initial segment did not display any reaction for Apo J; the distal initial segment and intermediate zone, with most of these cells reactive; and a characteristic checkerboard staining pattern in caput, corpus and cauda regions, with principal cells being intensely, moderately, or weakly or unreactive. Treatment of animals with atropine and mainly with methoctramine increased the Apo J expression at least in the cauda epididymis, while no significant difference in staining was noted after HHSID treatment. Conclusions: These data indicate that blockage of M_2 mAChR increase Apo J expression in the epididymis, suggesting that cholinergic neurotransmitter may play a role in male (in)fertility (Supported by CNPq and CIHR Canada).

06.008

EFFECTS OF ANDROGEN ON MUSCARINIC ACETYLCHOLINE RECEPTOR SUBTYPES IN RAT EPIDIDYMIS. Maróstica, E.; Avellar, M.C.W.; Porto, C.S. Section of Experimental Endocrinology Department of Pharmacology UNIFESP-EPM, SP Brazil.

Introduction: Androgens play a role in the organization and function of the autonomic nervous system (Gibson et al., J.Auton.Pharmac. 1: 331, 1981). We have shown the presence of muscarinic acetylcholine receptors (mAChR) in rat epididymis, with a predominance of M_3 receptor subtype in caput (CP) and cauda (CD) regions. Furthermore, $m3$ transcript was also detected in this tissue (Maróstica et al., Biol.Reprod. 65: 1 120, 2001). Radioligand binding studies showed that castration decreased mAChR density and affinity in both epididymal regions (Maróstica et al., FeSBE, 1999-p.105). The aim of this work was to further investigate the effects of castration and hormonal replacement on mAChR subtypes, at the protein and mRNA level, in rat epididymis. Methods and Results: [³H]Quinuclidinyl benzilate ($0.05\text{--}10 \text{ nM}$) binding studies were performed, in the absence and presence of atropine (1 mM) ($30^\circ\text{C}/1 \text{ h}$), with CP and CD epididymis membranes from 50-day old intact (control), castrated (10 days) and castrated (10 days) + testosterone (3 mg/kg , s.c., 10 days) male Wistar rats. The following K_D (nM) and B_{max} (fmol/mg protein) values were determined:

	Control	castrated	castrated + testosterone
CP K_D (nM)	$1.12 \pm 0.13^{**}$	$0.91 \pm 0.04^{**}$	$1.50 \pm 0.14^{**}$
CD K_D (nM)	$0.47 \pm 0.07^{**}$	$0.76 \pm 0.39^{**}$	$1.05 \pm 0.20^{**}$

Testosterone replacement avoided the reduction induced by castration on mAChR density. However, the effects of androgen on receptor affinity differed depending on the region of the epididymis analysed. Ribonuclease protection assays were also performed by using specific riboprobes for $m1\text{--}m4$ mAChR transcripts. $m2$ transcript was down-regulated by castration and maintained by hormonal replacement in CP and CD epididymis. On the other hand, androgen deprivation induced expression of $m3$ transcript in CP epididymis. Conclusions: These data indicate that androgen modulates density affinity and mRNA expression for mAChR subtypes in both epididymal regions. (Supported by CNPq, FAPESP, The Rockefeller Foundation)

06.009

AGONIST-INDUCED MUSCARINIC ACETYLCHOLINE RECEPTOR INTERNALIZATION AND RECYCLING IN RAT SERTOLI CELLS. Gameiro, T.F.; Avellar, M.C.W.; Porto, C.S. Section of Experimental Endocrinology, Department of Pharmacology UNIFESP-EPM, SFBrazil.

Introduction: The presence of muscarinic acetylcholine receptors (mAChR) was shown in rat Sertoli cells (Borges et al. Endocrinology 141:4701,2001). The activation of these receptors by carbachol induced an increase of Sertoli cells proliferation which decreased and reached level of unstimulated cells after 2h of carbachol incubation, indicating desensitization (Gameiro et

al. XVI Latinamerican Congress of Pharmacology p:252,2000). A reduction in cellular responsiveness to muscarinic agonists could be brought about by several mechanisms (see Maloteaux and Hermans, *Biochem. Pharmacol.* 47:77, 1994 for review). We now report the internalization and recycling of mAChR induced by carbachol in rat Sertoli cells.

Methods and Results: Primary cultures of Sertoli cells were obtained from 15-day-old male Wistar rats. Sertoli cells were incubated in the absence and presence of carbachol (10^{-4} M) at 35°C and 4°C for 30sec up to 1h. Cells were then washed with ice-cold PBS to remove carbachol and the specific binding was measured in cells with 1nM [^3H]-*N*-methylscopolamine at 4°C for 2h. The incubation of carbachol at 35°C for 30sec induced rapid decrease of the [^3H]-*N*-methylscopolamine specific binding to cells ($71.85 \pm 6.96\%$, $n=5$, of the control values). The reduction of specific binding was dependent on the duration of the incubation and reached a steady state within 2min. The effect was also temperature dependent, the rapid disappearance of the cell surface receptors was observed when incubation with muscarinic agonist was performed at 35°C but not at 4°C ; indeed, the binding experiment with labeled ligand was always performed at 4°C (for 2h) to avoid receptor reappearance during that phase of experiment. In another series of experiments, Sertoli cells were incubated in the absence and presence of carbachol (10^{-4} M/ 35°C /2min), washed with ice-cold PBS to remove carbachol and further incubated in culture medium at 35°C or 4°C for 30min up to 4h. The specific binding was measured in cells with 1nM [^3H]-*N*-methylscopolamine (4°C /2h). The reduction of specific binding induced by carbachol (10^{-4} M/ 35°C /2min) was reversible to $93.65 \pm 1.08\%$, $n=5$, of the control values within 2h of incubation at 35°C but not at 4°C , after the agonist had been washed away.

Conclusions: Carbachol induced mAChR internalization and recycling, these processes may contribute to complex intracellular regulatory mechanisms and may be involved in some of long-term effects of neurotransmitters. Internalized receptors might have some physiological roles in the cells including down-regulation, retrograde axonal transport or specific modulation of mRNA levels.

(Supported by FAPESP, FADA, CAPES and CNPq).

06.010

EXPRESSION OF ALPHA-1A ADRENOCEPTOR SPLICE VARIANTS IN HUMAN EPIDIDYMISS. Patrão, M.T.C.C., Porto, C.S., A vellar, M.C.W., Department of Pharmacology Section of Experimental Endocrinology UNIFESP, São Paulo, Brasil.

Introduction and aim: A systematic analysis of cloned human epididymis complementary DNAs (cDNAs) has been a good experimental strategy to identify and study specific genes involved in human epididymal function. Recent data from our laboratory have shown that transcripts encoding alpha-1 adrenoceptor subtypes (alpha-1a and alpha-1b) are present in human caput and cauda epididymis (Guaze E.F., Anais XVI Latinamerican Congress Pharmacol, pg254, 2000). Several alpha-1a splice variants (alpha-1a-1, 2, 3

and 4) have been identified in different tissues of several species (Chang D.J., FEBS Lett 422: 279, 1998), differing in their carboxy-terminal regions. Their role in physiological and pathological conditions remains unknown. The aim of the present work was to further evaluate the presence of alpha-1a splice variants in the cauda region of human epididymis. **Methods:** Lambda-ZAP cDNA library from cauda epididymis (1.8×10^{10} pfu/ml) was screened by polymerase chain reactions (PCR) with primers designed to amplify specific regions involved with alpha-1a-1, alpha-1a-2, alpha-1a-3 and alpha-1a-4 splice variants. DNA products were confirmed by direct nucleotide sequencing performed with an automated sequencer. Sequences were analysed by BLAST searches to scan gene similarities. **Results:** Three alpha-1a splice variants were amplified by PCR, using human cauda epididymis cDNA library as template. Each product was of the predicted size. When compared to the original mRNA sequence, products corresponded to nt 1238-1837 of the alpha-1a-1 variant (total size 600 bp), nt 1238-2067 of the alpha-1a-2 variant (total size 830 bp) and nt 1238-1963 of the alpha-1a-3 variant (total size 726 bp). **Discussion:** Alpha-1a adrenoceptor is the predominant alpha-1 adrenoceptor in different tissues from the male reproductive tract. Our results present for the first time evidence for the existence of different alpha-1a splice variants in the human epididymis. The interaction among these variants might constitute a mechanism regulating the biological properties of alpha-1a adrenoceptor on epididymal function. **Financial Support:** FAPESP, CNPq, TW. Fogarty International.

06.011

RESPOSTA alfa1 ADRENÉRGICA EM DUCTO DEFERENTE ISOLADO DE RÔS TRATADOS COM UM ANABOLIZANTE ESTERÓIDE E SUBMETIDOS AO EXERCÍCIO FÍSICO Astor L.R.G., Pereira, O.C.M. Depto de Farmacologia, IB, UNESP - Botucatu, SP/Brasil.

Introdução: Alterações nos níveis fisiológicos de hormônios da reprodução podem modular receptores autonômicos em diversos órgãos. Estas alterações podem ser induzidas por hormônios esteróides (1) e exercício físico (2). O objetivo deste trabalho foi o estudo das respostas autonômicas do ducto deferente de ratos (DDR) expostos ao exercício físico (natação), na ausência e presença de anabolizante esteróide (AE). **Material e Métodos:** Ratos Albinos Wistar, machos, 75 dias de idade, foram submetidos a 10 sessões de natação (Nat) 1h/dia/15 dias, tratados ou não com $7,5\text{mg/kg}$ de decanoato de nandrolona, no 1 $^{\circ}$, 5 $^{\circ}$, 9 $^{\circ}$ e 13 $^{\circ}$ dias. Animais sedentários (Sed) tratados ou não com AE foram utilizados como controle. Para o estudo da sensibilidade do DDR isolado, às drogas adrenérgicas noradrenalina (NA) e fenilefrina (FE) foi utilizado o método funcional. **Resultados:** PD2 NA NA + Timolol FE Sed 4.66 ± 0.09 4.50 ± 0.06 4.51 ± 0.12 Sed +AE 4.63 ± 0.06 4.41 ± 0.05 4.52 ± 0.13 Nat $4.95 \pm 0.09^*$ 4.64 ± 0.05 4.67 ± 0.11 Nat+AE $4.90 \pm 0.06^*$ 4.50 ± 0.07 $4.60 \pm 0.09^*$ $p < 0.05$, teste "t" de Student **Discussão:** Ofrificou-se que houve um aumento na sensibilidade à NA nos grupos Nat e Nat + AE em relação ao controle. Este aumento não foi devido ao receptor $\alpha 1$. Na

presença de timolol essa diferença desapareceu. Provavelmente receptores β , evidenciados somente após exercício físico (3) tenham sido responsáveis por esse aumento de sensibilidade. **Bibliografia:** 1-Bailarin, Int J Sports Med 7:302,1986; 2-Elias, Hum Reprod 8:1747,1993; 3-Chies, Pharmacol Res 32:123,1995 Apoio Financieiro: Capes

06.012

EFFECT OF 2-METHOXY-3,8,9-TRIHYDROXY COUMESTAN, AN ORIGINAL SYNTHETIC MOLECULE, ON Na⁺/K⁺-ATPase ACTIVITY Pôças, E.S.C.1**, Noël, F. 1, Silva, A.J.M.2; Costa, P.R.R.2. 1Departamento de Farmacologia Básica e Clínica-ICB, Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ, Brasil; 2Laboratório de Química Bioorgânica, NPPN, Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

INTRODUCTION: In a multidisciplinary project for the development of new drugs (Pronex n0 0888), we described for the first time that wedelolactone, a naturally occurring coumestan, and synthetic homologues inhibit Na⁺/K⁺-ATPase (Silva et al., 2001). The objective of this work is to characterize the mechanism of this interaction using 2-methoxy-3,8,9-trihydroxy coumestan. **METHODS:** Rat brain (mainly alpha 2 e3 Na⁺/K⁺-ATPase isoforms) and kidney (alpha 1 isoform) fractions enriched with Na⁺/K⁺-ATPase were utilized to measure inhibition of the enzymatic activity by the coumestan using Fiske and Subbarow method. The effect of different concentrations of the coumestan on the binding of [^3H]ouabain was also studied, using the rapid filtration method. **RESULTS AND DISCUSSION:** Analysis of inhibition curves revealed that unlike ouabain, which is 1000 times more potent to inhibit brain isoforms than kidney isoform, the coumestan has a similar affinity for kidney (IC₅₀ = 12 μM) and brain (IC₅₀ = 4 μM) isoforms. Different from ouabain, the inhibitory effect of the coumestan is not diminished by increasing concentrations of K⁺. Comparing with another classical inhibitor, vanadate, the coumestan exhibited a similar affinity for both enzyme conformations (E1 and E2), indicating a different mechanism of action. The coumestan did not affect the KD but decreases the Bmax of [^3H]ouabain to rat brain microsomes, indicating a non competitive (or irreversible competitive) interaction. As a conclusion, biochemical and binding assays demonstrated that this new synthetic coumestan inhibit the Na⁺/K⁺-ATPase by a mechanism different from the classical inhibitors such as ouabain and vanadate. **Financial support:** CAPES, CNPq, FAPERJ and Pronex (n0 0888).

06.013

EFFECT OF PCALC21, A NEW SYNTHETIC QUINONE, ON GABAA RECEPTOR. Lopes, D. V S.1**, Noël, F.1, Silva, A.J.M.2; Costa, P.R.R.2. 1Departamento de Farmacologia Básica e Clínica-ICB; 2Laboratório de Química Bioorgânica, NPPN, Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

INTRODUCTION: Benzodiazepines (BZP) are therapeutic agents widely used as anxiolytics, seda-

tive/hypnotics and anticonvulsants. They exert their effect by binding to an allosteric site on the GABAA receptor increasing the ability of the main inhibitory neurotransmitter of the central nervous system (GABA) to open the chloride channel and to hyperpolarize the neuron. The inverse agonists, on the other hand, are convulsants. OBJECTIVE: To investigate the interaction of PCALC21, an original 1,4-naphthoquinone synthesized in a program aimed to develop new drugs, with the BZP site at the rat brain GABAA receptor/channel. METHODS AND RESULTS: PCALC21 inhibited the binding of 0.2 nM [³H]-flunitrazepam to crude synaptosomes in a concentration-dependent manner (IC₅₀=3μM). As the rate constant for [³H]-flunitrazepam dissociation induced by addition of an excess of either cold flunitrazepam or PCALC21 was identical, we conclude that PCALC21 is probably competing at the BZP site. Interestingly, PCALC21 had a lower affinity when increasing the temperature from 40°C to 37°C. Analysis of Van't Hoff plot indicates that PCALC21 binding is enthalpy-driven, likewise the binding of classical BZP. Addition of GABA to the assay shifted the competition curve of PCALC21 to the right, just as for DMCM, an inverse agonist at the BZP site. CONCLUSIONS: The inhibition of flunitrazepam binding by PCALC21, representative of a new class of 1,4-naphthoquinone, is probably due to a direct interaction at the BZP site, although leading to a different drug-receptor complex than observed with classical BZP. Congeners of PCALC21 could exhibit a different pattern of efficacy leading to agonists or antagonists that could be useful therapeutically. Financial support: CAPES, CNPq, FAPERJ and Pronex(no0888).

06.014

SUBCELLULAR DISTRIBUTION OF (Ca²⁺-Mg²⁺) ATPase ISOFORMS IN RAT VAS DEFERENS. Costa, T.M.F.*, Cunha, V.M.N., Quintas, L.E.M., Noël, F. Dep. de Farmacologia Básica e Clínica, ICB, UFRJ.

Introduction: Previous data showed the presence of a thapsigargin-sensitive (Ca²⁺-Mg²⁺) ATPase activity among subcellular fractions of rat vas deferens (RVD) that is probably related to SERCA isoforms. The aim of the present work was to identify the Ca²⁺ pump isoforms in RVD using specific monoclonal anti-SERCA ATPases antibodies. Methods: Samples of nuclear (N), mitochondrial (Mit) and microsomal (Ms) subcellular fractions of RVD ran on 6% polyacrylamide gel and were transferred to nitrocellulose filter papers and sequentially incubated for 1 h in 5% non-fat dry milk, 1 h with monoclonal mouse IgG anti-canine SERCA2 ATPase or anti-rabbit SERCA1 ATPase and 1 h with anti-mouse antibodies horseradish peroxidase-conjugated. Immunoreactivity was detected using enhanced chemiluminescence by exposure to Kodak film-ECL. Results: There was a band of protein immunolabelled with anti-SERCA2 ATPase antibody in all subcellular fractions (n=5) that co-migrated with the band of CEG (chicken cerebellum microsomes) used in all assays as a reference for quantification by densitometry and standard for SERCA2b isoform. The relative optical density was higher for the Ms fraction (OD*mm= 2.48 +/- 0.66) than for N (1.13 +/- 0.33) but not for Mit (2.21 +/- 0.94). The monoclonal anti-SERCA1 antibody did not label

any RVD subcellular fraction but labelled Heavy microsomes (HSR) used as a standard preparation for SERCA1 ATPase. Discussion: This work shows for the first time the presence of the Ca²⁺ pump SERCA2 isoform in RVD. Although this protein co-migrate with SERCA2b isoform standard preparation (CEG) we can not exclude by now the presence of the SERCA2a isoform in this tissue. Financial support: FAPERJ

06.015

THE ISOFORM OF (Ca²⁺-Mg²⁺) ATPase PRESENT IN RAT VAS DEFERENS IS PROBABLY SERCA2b. Rodriguez, J.R.B.*, Cunha, M.N., Noël, F. Dep. de Farmacologia Básica e Clínica, ICB, UFRJ.

Introduction: The rat vas deferens (RVD) is a smooth muscle that exhibits thapsigargin (Tg) – sensitive and –resistant (Ca²⁺-Mg²⁺) ATPase activity. However the isoforms of SERCA or PMCA pumps have not been identified yet in this tissue. The aim of the present work was to study the Ca²⁺ and vanadate sensibility and evaluate the type of SERCA pumps present in RVD measuring the ATPase activity in hydrolytic assays. Methods: The tissue was homogenized and centrifuged to obtain nuclear (N), mitochondrial (Mit) and microsomal (Ms) fractions. The ATPase activity was performed with or without 3μM Tg, at 37°C for 2 h, in a mixture containing: 5mM ATPNa₂; 0.3mM EGT A; 10mM Na₃N; 4mM MgCl₂; 100mM KCl; 50mM A23187 and 50mM HEPES-Tris buffer, pH 7.4, with or without 10μM of free Ca²⁺ and traces of ³²P[ATP]. Results: The addition of Ca²⁺ to the reaction medium stimulated by 49.7 +/- 3.9% the basal ATPase activity (measured in the absence of Ca²⁺) with a K_{0.5} value of 0.1 +/- 0.03 μM. The K_{0.5} value for Ca²⁺ stimulation of Tg –sensitive (Ca²⁺-Mg²⁺) ATPase activity was 0.08 +/- 0.03 μM and the IC₅₀ value for vanadate inhibition was 27 +/- 10 μM. Discussion: The data show that the SERCA isoform present in RVD exhibits high sensibility to Ca²⁺ (K_{0.5} was 0.08 +/- 0.03 μM) and low affinity to vanadate (27 +/- 10 μM) as is the case of the SERCA2b isoform, mainly localized in smooth muscle and brain tissue. Phosphorylation assays are in course to investigate the modulation of the RVD SERCA activity. Financial support: FAPERJ.

06.016

MUSCARINIC ACETYLCHOLINE RECEPTORS IN RAT SEMINAL VESICLE AND EFFECTS OF SEXUAL MATURATION. Hamamura, M., Avelar, M.C.W.; Porto, C.S. Section of Experimental Endocrinology, Department of Pharmacology, UNIFESP-EPM, São Paulo, Brazil.

Introduction: The primary function of the autonomic innervation within the seminal vesicle is to mediate contraction (Silva et al. *Eur. J. Pharmacol.* 381 :141,1999) and protein secretion (Sjöstrand & Hammarström *Acta Physiol. Scand.* 153:189,1995). Furthermore, the organization and functions of this innervation in the male reproductive tract are modulated by androgen and sexual maturation (Anderson et al. *Pharmacol. Rev.* 45 :254,1993; Silva et al. *J. Androl.*

23:374,2002). The present study was, therefore, designed to characterize the muscarinic acetylcholine receptor (mAChR) subtypes expressed in rat seminal vesicle and its possible modulation by sexual maturation.

Methods and Results: Seminal vesicle were isolated from 30- (immature) and 120-day-old (adult) male Wistar rats. Concentration-effect curves to carbachol were obtained in the absence and presence of mAChR antagonists: pirenzepine (M₁ selective), methoctramine (M₂:M₄ selective), pf-HHSiD (M₃:M₁ selective) (see Caulfield and Birdsall *Pharmacol. Rev.* 50:279, 1998 for review). The EC₅₀ and the contractile maximum response to carbachol were determined. The antagonist potency was expressed as pK_B values, i.e., the negative log of the dissociation constant K_B. The sexual maturation shifted concentration-effect curves to carbachol to the right and reduced 89% the maximal contractions induced by carbachol in the seminal vesicle. The EC₅₀ values for carbachol were 7 ± 1 nM, n=7 and 13 ± 4 nM, n=6 in the seminal vesicle from 30- and 120-day old rats, respectively. The mAChR antagonists produced concentration-dependent parallel rightward shifts of the concentration-effect curves to carbachol in seminal vesicle from 120-day-old rat. The calculated pK_B values for pirenzepine, methoctramine and pf-HHSiD were 6.68 ± 0.30, n=6; 7.81 ± 0.12, n=5 and 8.99 ± 0.48, n=4, respectively. The order of potency for mAChR antagonists was pf-HHSiD >> methoctramine > pirenzepine, suggesting at least in the tissue from adult rat that M₃ mAChR is present. In fact, Western blotting experiments were also performed using anti-M₃ mAChR antibody and membrane preparations of seminal vesicle isolated from adult rat. This antibody reacted with a protein of approximately 75kDa. The reaction was blocked when the antibody was pre-absorbed with the blocking peptide.

Conclusions: These data indicate that mAChR are involved in the rat seminal vesicle contraction and are modulated by sexual maturation. (Supported by FAPESP, CAPES and CNPq)

06.017

INVESTIGATION OF RYANODINE AND ALPHA-ADRENERGIC RECEPTORS EXPRESSION AFTER DENERVATION OF RAT VAS DEFERENS. Paulo, F.O., Silva, C.L.M. and Noël, F. Departamento de Farmacologia Básica e Clínica, ICB, Universidade Federal do Rio de Janeiro

Introduction: Functional studies have shown that surgical denervation of rat vas deferens (RVD) influences intracellular Ca²⁺ homeostasis. The development of a postjunctional supersensitivity to noradrenaline has also been reported. The present work focus on the investigation of the expression of ryanodine and alpha-adrenergic receptors after denervation of rat vas deferens. Methods: Denervation was performed according to Jurkiewicz et al (*Eur. J. Pharmacol.*, 256:329, 1994). RVD membrane suspension (150 μg) were incubated for 2 h in the presence of 0.3 nM [³H]-ryanodine, KCl 1.5 M, ATP 10 mM, hepes 10 mM and CaCl₂ 0.8 mM (pH 7.4, 37 °C). Incubations were terminated by dilution (4 x 5 ml of ice-cold buffer) and rapid filtration under vacuum. Non-specific binding was defined in the presence of 10 μM ryanodine. Alternatively, 150 μg of the

membrane suspension were incubated for 45 min in the presence of 0.1 nM [³H]-prazosin, tris-HCl 50 mM, EDTA 1 mM (pH 7.4). Nonspecific binding was defined in the presence of 1 μM prazosin. B_{max} and K_d values were calculated individually by nonlinear regression (GraphPad Prism software).

Results and Discussion: The denervation of VD for 14 days reduced the number of ryanodine receptors as revealed by a decrease of B_{max} value from 142.4 ± 35 (C) to 77.3 ± 14.3 fmol/mg of protein (D) ($P = 0.025$ Paired t test; $n = 9$). However no alteration of dissociation constant (K_d) was observed. On the other hand, the same period of denervation didn't alter the density or affinity of alpha-adrenergic receptors. Taken together, these results suggest that an increase in the expression of intracellular Ca^{2+} channels (ryanodine receptor) and alpha-adrenergic receptors are not related to the postjunctional supersensitivity phenomenon.

Supported by Faperj, CNPq.

06.018

AUTOREGULATION OF MUSCARINIC ACETYLCHOLINE RECEPTOR IN DEVELOPING SKELETAL MUSCLE FIBER

Furlan, I., Lapa, A. J., Godinho, R.O., Depto. de Farmacologia, UNIFESP/SP

Introduction: Muscarinic acetylcholine receptors (mAChRs) were described in avian (Godinho & Rotundo, Mol Biol Cell 6: 1447, 1995) and rat (Reyes & Jaimovich, Arch. Biochem. Biophys., 331:41, 1996) skeletal muscle cultures. These receptors are also expressed in skeletal muscle from newborn rats (Furlan & Godinho, FESBE, 2001), which suggests that the expression of mAChR in skeletal muscle fibers is not an artefact of *in vitro* preparation. In this study we analyzed the regulation of mAChR in rat cultured skeletal muscle by the non-selective cholinergic agonist carbamylcholine (CCh) and the muscarinic agonist oxotremorine-M (oxo-M).

Methods and Results: The expression of mAChR was evaluated using ³H-mQNB binding assay in membrane fractions from differentiated myotubes. The influence of nicotinic (nAChR) or muscarinic receptor stimulation on the number of ³H-mQNB binding sites was analyzed by treating the cells with 10 F M CCh or 10 F M oxo-M, for 1h to 24 h. Treatment of rat myotubes with CCh for 3, 6 or 24 h reduced the mAChR sites (9.6 ± 1.2 fmol/mg protein, $n=3$) by 58%, 73% and 81%, respectively. The CCh effect was mimicked by oxo-M, which caused 37%, 49% and 59% reduction in the mAChRs after 1, 3 or 24h, respectively. The oxo-M-induced decrease in mAChR number was prevented by pre-incubation of cells with the mAChR antagonist scopolamine (30 nM). Moreover, the number of mAChRs was not modified after 24 h stimulation of nAChRs with nicotine 10 F M.

Discussion: Our data showed that non-innervated developing muscle fibers express mAChRs that are down-regulated after long-term stimulation. Since activation of nAChR did not modify the expression of mAChR, this study suggests that the *in vivo* release of the neurotransmitter acetylcholine, initiated after the establishment of nerve-muscle contact, may be responsible for the repression of mAChRs in the adult skeletal muscle. Supported by: APESP (00/01841-9; 01/01417-5).

06.019

ELECTRON SPIN RESONANCE (ESR) STUDY OF MEMBRANE FLUIDITY IN ARTERIAL SMOOTH MUSCLE CELLS OF SPONTANEOUSLY HYPERTENSIVE RATS (SHR).

Paula1, U.M., Straus2, A.H., Lamy-Freund3, M.T., Oliveira3, T.R., Paiva1, T.B., Depts. Biophysics1 and Biochemistry2, UNIFESP, Inst. Physics3, USP

Introduction: The SHR is an interesting model to study the correlation between cell membrane fluidity and the activity of transport systems, such as Na⁺/K⁺ ATPase and different K⁺ channels, since it has been shown that the activity of these systems are different in conductance and in resistance arteries. In this work we have employed the spin labeling method in a comparative study of the fluidity of lipid membranes from SHR, normotensive Wistar (NWR), Wistar Kyoto (WKY) rats and bilayers of synthetic lipids. **Methods:** The biological lipids were extracted from aorta and mesenteric arteries. Other lipids used were egg lecithin, and the synthetic phospholipids DMPC, DMPG, DPPG and DPPC. The paramagnetic probes were phospholipids labeled at different hydrocarbon chain positions. **Results and Conclusion:** Bilayers formed by the lipids extracted from the aorta and mesenteric arteries of SHR, NWR and WKY did not show significant differences in their fluidity. The ESR spectra of the probes incorporated in the lipid bilayers were typical of a homogeneous environment, and no temperature phase transition was detected between 5 and 55°C. The aorta and mesenteric lipid bilayers were found to be more rigid than that produced by egg lecithin. Compared with synthetic saturated lipids, which undergo thermal gel-fluid phase transition, the natural lipids formed a bilayer that was less packed than the gel phase and more packed than the fluid phase of the saturated lipids. Supported by: APESP, CNPq, CAPES and CEFET AM.

06.020

PHARMACOLOGICAL CHARACTERIZATION OF [3H]MK-801 BINDING IN SUBCELLULAR FRACTIONS OF Schistosoma mansoni

Renata F. Pessôa, Dayde L. Mendonça-Silva and François Noël - Depto. de Farmacologia Básica e Clínica-UFRJ.

Introduction: Several studies have suggested that glutamate, the major neurotransmitter of the central nervous system, has also this role in helminths. In *S. mansoni*, a physiological role for glutamate is suggested by the existence of glutamate transporter in isolated muscle cells from adult worms and also by the detection of low affinity binding sites for [³H]-kainic acid in subcellular fractions of the adult worm. The aim of this work was to investigate the presence of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors in *S. mansoni*, with MK-801, a non-competitive antagonist of the NMDA receptors, which is classically used in binding assays to label this glutamatergic receptor. **Methods:** The homogenate obtained from adult male worms was homogenized and differentially centrifuged to obtain four subcellular fractions. About 100 μg protein was incubated for 25 min at 25°C in the presence of 10 nM [³H]MK-801 and 5 mM Tris-HCl (pH 7.4). The reaction was terminated by filtration under vac-

uum. **Results and Discussion:** Specific binding sites for [³H]MK-801 were observed in all subcellular fractions, but 72 ± 12 % of them were recovered in the heterogeneous P1 fraction. Nevertheless, no modulation of the MK-801 binding was observed for classical ligands of the glutamatergic receptors, except for ketamine 10 μM, which was able to inhibit 20 % of the binding. The lack of stereoselectivity for the (+) and (-) isomers of MK-801 and the inhibitory effect of 30 μM nicotine, suggested that the binding of MK-801 could occur to a nicotinic receptor. The evidence that MK-801 binds to nicotinic receptors in mammals and the identification of cholinergic receptors in the tegument of *S. mansoni* are compatible with this hypothesis. Financial support: CNPq, Faperj.

06.021

SUBCELLULAR DISTRIBUTION OF INOSITOL 1, 4, 5-TRISPHOSPHATE RECEPTORS IN Schistosoma mansoni.

Scaramello, C.B.V**, Cunha, V.M.N., Noël, F. Departamento de Farmacologia Básica e Clínica, ICB, UFRJ.

Introduction: As for mammals, the control of low cytosolic Ca²⁺ concentrations appears to be very important in *Schistosoma mansoni* physiology. The aim of the present work was to determine the presence and the distribution profile of inositol 1,4,5-trisphosphate (IP₃) receptors among subcellular fractions of *S. mansoni* through [³H]-IP₃ binding assays. **Methods:** Adult male worms were homogenized and submitted to differential centrifugation to obtain P1, P2, P3 and P4 fractions. The *S. mansoni* fractions were incubated for 10 min at 4°C in a medium containing 50 mM Tris-HCl, pH 8.4, 1 mM EGT A, 2 mM DTT and 2.2 nM [³H]-IP₃. Non-specific binding was determined in the presence of 300 μg/ml low molecular weight heparin. The proteins were then precipitated with 0.5% gamma-globulin and 61% ice-cold PEG. After 10 min, the samples were centrifuged and the pellets solubilized with 1% SDS before radioactivity counting by liquid scintillation. **Results:** There were not statistical differences ($P > 0.05$, One-way ANOVA) in specific binding of [³H]-IP₃ among P1-P4 fractions ($n=3$). However, the recovery of IP₃ receptors was higher in P1 (35.7 ± 3.5%) and P3 fractions (30.5 ± 10.5%) than in P2 (17.6 ± 5.7%) and P4 (16.3 ± 5.1%) fractions. **Discussion:** The results indicate that P1 is the best fraction to be used in IP₃ receptors studies. Thus we will be able to characterize pharmacological parameters of IP₃ receptors expressed in this worm and evaluate the effect of Praziquantel (drug used in schistosomiasis treatment) which mechanism is still unknown. Financial support: CNPq, FAPERJ, CAPES.

06.022

DECURSO TEMPORAL DA REDUÇÃO DE COLINOCEPTORES NICOTÍNICOS INDUZIDO POR MELATONINA EM CULTURAS DE MIOTUBOS DE RATOS.

Lidiana D Almeida(1), Rosely O. Godinho (2) & Regina P. Markus (1) – (1) Dep. Fisiologia – IB – USPDep. Farmacologia, UNIFESP-EPM.

A melatonina (MEL), hormônio liberado no período de escuro pela glândula pineal, é capaz de

modular a reatividade e o número de receptores nicotínicos em diferentes modelos biológicos. Em diferentes modelos experimentais testados (ducto deferente, cerebelo, músculo esquelético de ratos e retina de pinto) a MEL interfere com número e/ou função de receptores sensíveis à alfa-bungarotoxina (α -BTX). OBJETIVO: Caracterizar o tempo necessário para que a melatonina reduza o número de sítios de ligação para o α -BTX em miotubos de ratos em cultura. MÉTODOS: Cultura primária de miotubos (60 dias) foram incubadas com MEL por diferentes tempos e o número de sítios medido através da ligação de 2nM de [125I]- α -BTX (1h.). Ligação não específica medida por incubação com α -BTX (100 nM). Os dados estão expressos em fmol/mg proteína. RESULTADOS: Melatonina reduziu de maneira dose-dependente (0,1-100nM) o número de receptores. A redução máxima da melatonina 100nM foi de 25% e 30% após 48 e 10 horas de incubação, respectivamente (controle = 78 +/- 0,0219, n=8). Incubando-se melatonina 10 nM por 4 horas e deixando completar as 10 horas também não foi observado redução no número de receptores. CONCLUSÃO – Os dados permitem concluir que o efeito da melatonina sobre o número de receptores nicotínicos depende de uma longa cadeia de eventos que leva no mínimo 10 horas para ocorrer. Financiamento - FAPESP, CNPq.

06.023

EXPRESSÃO FUNCIONAL DO RECEPTOR DE FSH DA SERPENTE BOTHROPS JARARACA.

1Mesquita, B.M.; 1Bluhm, A.R.; 2Ribela, M.C.P. e 1,3Lázari, M.F.M. – 1Lab. Farmacologia, Inst. Butantan; 2Depto. Bioengenharia, IPEN; e 3Depto. Farmacologia, UNIFESP São Paulo, SP

Introdução: O estudo comparado entre receptores de diferentes espécies animais tem sido uma ferramenta importante para esclarecer a função de receptores acoplados à proteína G. Recentemente clonamos um receptor de FSH da serpente *B. jararaca* (sFSHR), que possui uma deleção de aminoácidos na região aminoterminal (responsável pela ligação do hormônio), não encontrada em aves ou mamíferos, mas sim em lagarto. Foi, então, construída uma quimera, substituindo-se a região aminoterminal do sFSHR pela do rato (rssFSHR) (Bluhm et al. Anais da FESBE 2001 p.322). O objetivo da presente etapa é verificar a expressão do sFSHR e da quimera rssFSHR em células HEK-293 e estudar a sua capacidade de estimular a produção de AMPc, em resposta a FSH humano (hFSH).

Métodos e resultados: Células HEK-293 foram transfectadas com o vetor vazio (pcDNA3), vetor com cDNA para o receptor de FSH de rato (rFSHR), para o sFSHR ou para rssFSHR. O Northern blot revelou a expressão dos transcritos esperados para o sFSHR e rssFSHR. A determinação da produção de AMPc por ensaio imunoenzimático, após estímulo com 0, 0,1, 1 e 10ng de hFSH, revelou a seguinte ordem de sensibilidade ao hFSH: rFSHR > rssFSHR > sFSHR.

Discussão: A substituição da região aminoterminal do receptor de serpente pela do rato restaurou parcialmente a capacidade desse receptor em responder ao hFSH, sugerindo que as regiões transmembrana e/ou carboxiterminal do FSHR também são importantes para a ligação do hor-

mônio e ativação da sinalização intracelular. Auxílio: FAPESP, Fundação Butantan.

06.024

NITRATION OF CYTOSKELETON PROTEINS IN HUMAN PLATELETS.

Marcondes, S.1, Cardoso, M.H.1, Turko, I.V.2, De Nucci, G.1, Antunes, E.1, Murad, F.2. 1Department of Pharmacology Faculty of Medical Sciences, UNICAMPBrazil; 2Department of Integrative Biology and Pharmacology, Houston Medical School, University of Texas, USA.

Objective: Nitration of tyrosine (Tyr) residues modifies the protein function. Peroxynitrite (ONOO-) is a potent nitrating and oxidising agent that is formed by a rapid reaction of nitric oxide (NO) with O₂-. Since platelets generate O₂- and NO during activation, the aim of this study was investigate the presence of nitrated protein in human platelets. Methods and Results: Washed human platelets were activated with thrombin (100 mU/mL) and after 120 sec the platelets were collected, sonicated in presence of protease inhibitors and centrifuged at 100,000g for 60 min (4°C). The supernatant was analysed by Western Blot (WB) using anti-nitrotyrosine. Nitrated proteins were purified by precipitation with ammonium sulfate 60% followed by gel filtration and Hydroxyapatite column. The fractions were resolved by SDS-PAGE and the nitrated bands were excised and the peptide sequence was analysed. WB analysis of resting and activated platelets revealed 3 nitrated bands with 250, 105 and 42 kDa. The bands corresponding to 250 and 105 kDa protein were more evident in thrombin-activated platelets. 250-kDa protein was identified as filamin through 4 peptides sequences (amino acid residues 286-296, 485-494, 685-696 and 1235-1246). Likewise, the sequence of 4 peptides of the 105-kDa protein revealed a high homology to α -actinin (amino acid residues 186-197, 215-220, 436-446, 841-850). The lower band was analysed through 1 peptide sequence (amino acid residues 361-372) that was enough to identify the actin. Conclusions: The cytoskeleton proteins filamin, α -actinin and actin are nitrated in both resting and activated human platelets. Tyrosine nitration could account to the NO-mediated inhibitory actions on platelet aggregation and adhesion. Financial Support: FAPESP.

06.025

FRUTALIN, A GAL-BINDING LECTIN, INDUCED CYTOSKELETON REORGANIZATION AND β AK ACTIVATION IN HUMAN NEUTROPHILS.

Bran-do Lima, A.C. Saldanha Gama R.F, Pereira, C.R., Moreira A. R., Barja-Fidalgo C. Depto Farmacologia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Brazil.

Endogenous lectins are recognized as mediators in a variety of biological processes involved in the innate immune responses. We demonstrated previously that Frutalin (FTL), a gal-binding lectin isolated from *Artocarpus incisa*, induces neutrophil (PMN) migration in vivo and in vitro. This lectin also acts as potent immunomodulator inducing lymphocyte proliferation. In the present study, we investigated FTL effect on actin mobili-

zation and PMN activation. Human PMNs isolated from peripheral blood by Percoll gradient were incubated with Frutalin and chemotaxis in Boyden Chamber, immunoprecipitation, western blotting and citochemistry were performed. FTL (3-200 nM) showed chemotactic activity for hPMNs in vitro. This effect was blocked by D-galactose (Gal), suggesting a lectin-dependent activity. Genistein, a tyrosine kinase protein inhibitor and LY294002, a PI3K inhibitor blocked lectin mediated PMN chemotaxis. Furthermore, we also demonstrated that interaction of FTL with PMNs induced actin mobilization, increasing F-actin content, as evaluated by citochemistry and Western Blotting. Genistein, but not Gal was able to inhibit actin polymerization. In addition, FTL (10 μ g/mL) induced an increase of tyrosine residues phosphorylation in PMNs, an effect blocked by treatment of PMN with Gal or Fuccoidan, a selectin inhibitor. FTL was also able to induce Focal adhesion Kinase (FAK) activation, other effect inhibited by Gal. In summary, we show that FTL induced PMN activation with cytoskeleton alterations. The chemotactic response and FAK activation induced by FTL are related to the lectin activity, although its effect on cytoskeleton seems to be independent lectin activity. Data suggest that FTL is able to activate hPMN, probably through an inside-out activation of integrin mediated pathways. Financial Support: CNPq, Faperj, SR-2.

06.026

HEME, A PRO-INFLAMMATORY MOLECULE, IS ABLE TO PROTECT HUMAN POLYMORPHONUCLEAR NEUTROPHILS AGAINST APOPTOSIS - INVOLVEMENT OF PI-3 KINASE ERK PATHWAYS. Arruda, MA, Oliveira, PL, Barja-Fidalgo, C & Graça-Souza, V. Dept. de Bioquímica Médica, ICB / CCS, UFRJ & Dept. de Farmacologia, IBRAG, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, RJ, 20551-030, Brazil

Hemolytic diseases (HD) such as malaria, hemolysis elevated liver levels and low platelet-count (HELLP) and sickle cell disease as well as ischemia-reperfusion episodes are characterized by a systemic increase in free heme, which is released from hemeproteins. A common feature shared by HD patients is the development of chronic inflammation. We have recently reported that free heme is able to induce polymorphonuclear neutrophil (PMN) activation both in vivo and in vitro (Graca-Souza et al., 2002). In the present study we investigate the effect of free heme on spontaneous apoptosis on PMN. Micromolar concentrations of heme (1 - 10 micromolar) are able to inhibit PMN apoptosis elicited after 5h (12% to 3% of apoptotic PMN) and 18h (75% to 42% of apoptotic PMN), as assessed by light microscopy DNA electrophoresis and annexin V binding assay. This inhibitory effect was completely abolished when cells were pre-incubated with PI-3 kinase pathway inhibitor LY294002 (3 micromolar) and ERK pathway inhibitor PD98059 (10 micromolar). Co-treatment with Sn-protoporphirin IX, competitive inhibitor of the inducible heme oxygenase isoform (HO-1) evoked a drastic augmentation on PMN apoptosis (98%) after 5 hours of incubation. Caspase-3 specific assays are being performed. These data suggest that free heme is able to retard spontaneous apoptosis on hu-

man PMN, via PI3 kinase and ERK pathways, just like other pro-inflammatory agents (i.e. IL-8, GM-CSF). It is likely that HO-1 also plays a critical role on this process. The understanding of this phenomenon may corroborate to the development of new strategies to control inflammation often associated with HD. Supported by UERJ/SR-2, FAPERJ, CNPq, CAPES, PRONEX

06.027

ASPIRIN-TRIGGERED LIPOXIN A4 INHIBITION OF VEGF-INDUCED ENDOTHELIAL CELL PROLIFERATION INVOLVES TYROSINE PHOSPHORYLATION. Nascimento-da-Silva, V. * & Fierro I.M.; Departamento de Farmacologia, IBRAG, UERJ, RJ.

Proliferative states such as chronic inflammation and cancer are often accompanied by intense angiogenesis, a highly orchestrated process involving endothelial cell migration, proliferation and maturation. A wide array of factors can impact on this process, including vascular endothelial growth factor (VEGF). VEGF is an endothelial cell-specific mitogen and chemotactic agent that plays a significant role in the physiology of normal vasculature. An aspirin-triggered lipoxin A4 stable analog (ATL) inhibited VEGF-stimulated proliferation of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) (IC50 ~ 3nM). To characterize how ATL might affect VEGF signal transduction, we tested its effect on the ability of VEGF to induce tyrosine phosphorylations in HUVEC. The cells were pre-treated with ATL (1-100 nM) and then stimulated with vehicle or 1nM VEGF for 5 min. A Western blot of immunoprecipitated proteins was probed with antibody to phosphotyrosine. A TL inhibition of VEGF-induced tyrosine phosphorylation was dose-dependent and suggests a negative regulation of VEGF signaling events that might be transduced through VEGFR-2/KDR. Financial Support: Faperj; CNPq and SR-2/UERJ

06.028

DESNUTRIÇÃO PÓS-NATAL DETERMINA AUMENTO NA SENSIBILIDADE À INSULINA: ENVOLVIMENTO DO SISTEMA IRS-1 E PI3-KINASE ASSOCIADA A AKT. Kaezer AR, De Souza EP, Da Silva SY* Moura AS, Barja-Fidalgo C & De Freitas MS Depto. Farmacologia, Depto. Ciências Fisiológicas, Inst. Biologia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.

Tem sido descrito que os estados nutricionais durante os períodos pré e pós-natal podem determinar alterações na secreção e sensibilidade à insulina na fase adulta e que a restrição calórica pode determinar uma alteração na sinalização da insulina através de um aumento na expressão de genes que medeiam a sensibilidade à insulina. Neste trabalho foram utilizados ratos Wistar cujas mães receberam dieta com 0% de proteína (D) nos dez primeiros dias de lactação e ratos controle (C) amamentados por fêmeas submetidas à uma dieta contendo 25% de proteína. Determinou-se a glicemia e a insulinemia dos grupos C e D durante o desenvolvimento, por métodos colorimétricos e RIA. Foram também avaliados os mecanismos moleculares envolvidos com a rota sinalizante mediada pela insulina, como

as atividades do IRS-1, PI3-kinase, AKT e a translocação do transportador de glicose GLUT-4 em tecido muscular, por Western blotting. Foi observado que o grupo D, aos 60 dias de idade, apresentou normoglicemia (C: 113 ± 13; D: 120 ± 17 mg/dl) acompanhada de hipoinsulinemia (C: 159,9 ± 9; D: 112,9 ± 23,7 microU/ml), caracterizando um aumento na sensibilidade à insulina. Paralelamente, o tecido muscular isolado do grupo experimental apresentou um aumento na ativação da PI3-kinase associada ao IRS-1 acompanhada pelo aumento da atividade da AKT em condições basais. O estímulo pela insulina induziu um aumento significativo (90%) das atividades do IRS-1, PI3-kinase e Akt no grupo D. Além disso, a translocação do GLUT-4 atingiu níveis superiores aos do grupo C após estímulo pela insulina. Os dados sugerem que os animais submetidos à desnutrição materna no início da lactação desenvolvem um mecanismo adaptativo na homeostase glicêmica. Suporte financeiro: CNPq, FAPERJ, SR2-UERJ.

06.029

REPEATED PREDICABLE OR UNPREDICABLE STRESS EFFECTS ON NF-KB IN CENTRAL NERVOUS SYSTEM (CNS) Munhoz, C.D., Glezer I., Kawamoto, E.M., Avellar, M.C.W., DeLucia, R.; 2Da Silva, C. P.; 1Scavone, C. 1Department of Pharmacology - Institute of Biomedical Science, University of Sao Paulo, São Paulo, Brazil, 05508-900. 2Dept. of Pharmacology UNESP-Araçuaçara, 3Dept. of Pharmacology - Section of Experimental Endocrinology UNIFESP-EPM, Sao Paulo.

Several studies propose a role for NF-kB as a signal in the brain during neurodegeneration. In addition, recent evidences suggest that this nuclear factor has a role in glial and neuronal function, including synaptic transmission, development, and plasticity. The aim of this study was to investigate whether acute stress or chronic stress (14 days) can regulate the NF-kappaB activation in the CNS. Adult male Wistar rats were allocated into four groups: control (no-stress), acute stress, predictable stress and unpredictable stress. To evaluate the influence of the glucocorticoids in these experiments, another 4 groups of animals were treated with metyrapone (200mg/kg/day) during the stress period. Cerebellum, hippocampus, and striatum were isolated from animals killed 24h after the last stress. Gel mobility shift assay was used to measure changes in NF-kB activation with treatments. The unpredictable stress induced a decrease in NF-kB activity in all brain regions analyzed. Metyrapone treatment blocked this response only in the cerebellum, suggesting that other intracellular pathways may be involved in this adaptive process. UNIFESP CNPq and Bunka grant/Sumitomo Bank

06.030

EFEITO CITOTÓXICO DO ÓXIDO NÍTRICO E DO TAXOL SOBRE CÉLULAS LINFOBLÁSTICAS LEUCÊMICAS DE ORIGEM HUMANA: ENVOLVIMENTO DO FATOR DE TRANSCRIÇÃO NF-KB E DA GLUTATIONA. Silva, M.C*, Freitas, M.S.** & Assreuy J.*** - Departamentos de * Análises Clínicas, CCS/UFSCar, 13081-970, Aracaju, Sergipe; ** Farmacologia e Psicobiologia ICB/UERJ e ***Farmacologia, CCB/UFSC.

Introdução: Demonstramos que o óxido nítrico (NO) é citotóxico para células leucêmicas de origem humana (CEM) e murina (L-1210) e que, quando associado ao quimioterápico taxol, ocorre um sinergismo de ação. **Nosso objetivo** foi investigar o mecanismo de citotoxicidade envolvido. **Métodos e Resultados:** Células leucêmicas foram incubadas (24 h) com S-nitroso-acetil-DL-penicilamina (SNAP; 100-1000 µM; um doador de NO) ou com taxol (1-30 µM; um agente fixador de microtúbulos) na presença ou na ausência de colchicina (3-30 µM, um despolimerizante de microtúbulos), citocalasina B (0,1-10 µM, um despolimerizante de microfilamentos), L-butionina-[S,R]-sulfoximina (1 a 100 µM, um inibidor de síntese de glutatona, pré-incubado 12 horas antes da adição de SNAP ou de taxol) ou pirrolidina ditiocarbamato (0,1 a 1 µM, um inibidor da atividade do fator de transcrição NF-kB). A viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT, a atividade de NF-kB foi avaliada por imunoblotting e a glutatona foi dosada pelo método de Tetze. **Nossos resultados** demonstram que NO e o taxol: 1) não tiveram seus efeitos alterados pelos compostos que interferem com o citoesqueleto (SNAP 1 mM, 60 ± 9% e 78 ± 5%; taxol 10 µM, 60 ± 5% e 55 ± 2% de viabilidade celular na presença ou ausência de colchicina ou citocalasina; 2) causaram inibição na atividade do NF-kB (83 ± 1 e 79 ± 2%, respectivamente e 3) causaram depleção nos níveis de GSH (95 ± 1 e 30 ± 2 %, respectivamente). **Conclusões:** Os resultados indicam que os efeitos citotóxicos do NO e do taxol: i) são independentes do citoesqueleto; ii) envolvem diminuição dos níveis de GSH, sensibilizando as células a danos oxidativos e nitrosativos e iii) também dependem da inibição da síntese de GSH, efetuada através da inibição do NF-kB. Suporte: CNPq e PRONEX

06.031

LPS-INDUCED ACTIVATION OF NUCLEAR FACTOR NF-KB IN THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM: ATTENUATION BY A NMDA RECEPTOR ANTAGONIST AND A NEURONAL NITRIC OXIDE SYNTHASE (NOS) INHIBITOR. Glezer, I., Munhoz, C.D., Kawamoto, E.M., Marcourakis, T., Avellar, M.C.W., Scavone, C. 1Dept. Pharmacology, Institute of Biomedical Science, University of Sao Paulo, São Paulo, Brazil, 05508-900. 2Dept. Neurology, University of Sao Paulo, 3Dept. Pharmacology, Section of Experimental Endocrinology UNIFESP-EPM, São Paulo.

It has been shown that inflammatory stimulus in the brain increase excitatory glutamatergic transmission especially at the level of NMDA receptors. These receptors have an important role in glutamate neurotoxicity and are in general coupled with the generation of NO through the activation of nNOS. Our aim was to test whether NMDA-NO pathway is involved in LPS activation of NF-kB in different areas of the brain. Cerebellum, hypothalamus, hippocampus, pre-frontal cortex, and striatum were isolated from male Wistar rats treated previously for 2-24 h with LPS (1 µg/kg, i.v.) or saline. Gel shift assays showed that LPS activated NF-kB in all structures tested. Supershift assays indicated that the major DNA-protein complex altered by LPS corresponded to p50/p65 heterodimer. MK-801 (0.3-3 mg/kg) or 7-Ni (5-25 mg/Kg), injected i.p. 20 min before

LPS, partially reduced LPS effects. This reduction were not further potentiated in rats treated with both compounds, suggesting that glutamate acts on NMDA-nNOS pathway to activate NF- κ B in response to LPS. Supported by FAPESP, CNPq and *Bunka grant /Sumitomo Bank.

06.032

ROLE OF NITRIC OXIDE ON MODULATION OF EOSINOPOIESIS BY PROSTAGLANDIN E2 IN MURINE BONE MARROW CULTURE 1,3 Jones, C., 2Lintomen, L., 1Areal, M.F.T., 5Assrey, J., 1Elsas, P.X., 2Elsas, M.I.C. 1Depto. de Imunologia, Inst. de Microbiologia, UFRJ, 2IFF/FIOCRUZ, 3Depto. de Genética, Inst. de Biologia, UFRJ, 4Depto de Farmacologia, UFSC.

INTRODUCTION: We have shown that Prostaglandin E2 (PgE2) downmodulates the response of eosinophil precursors to IL-5 in bone-marrow culture. In some cells, nitric oxide (NO) promotes apoptosis or acts as a second messenger. We evaluated the ability of NO donors, s-nitroso methyl penicillamine (SNAP) and sodium nitroprusside (SNP), to modulate the response to IL-5 in murine bone-marrow culture. We further studied the effect of NO synthase inhibitors on downmodulation of responses to IL-5 by PgE2. **METHODS AND RESULTS:** Liquid bone marrow cultures were established with IL-5, alone or in association with PgE2, SNAP, SNP or Aminoguanidine (AmGua) and the frequency of eosinophils was determined at day 7. Apoptosis was evaluated by the Annexin method, using an Apoptag Kit, at day 5 of culture. SNAP and SNP downmodulated eosinophil precursors responses to IL5 in BALB/c mice ($p < 0,001$ for both NO donors). Besides, SNAP induced apoptosis at day 5 when compared to cultures established with IL5 alone ($p < 0,001$). PgE2 downmodulated the response to IL-5 ($p < 0,001$) while AmGua blocked the effect of PgE2. **CONCLUSIONS:** These findings show that NO downmodulates the culture response to IL-5 on eosinophil precursor cultures and also induces apoptosis on these cells. They also suggest the effect of PgE2 is mediated by NO. **FINANCIAL SUPPORT:** PAPER-FIOCRUZ, FINEP/CNPq and CAPES

06.033

PARTICIPAÇÃO DO CÁLCIO MITOCONDRIAL NA MORTE CELULAR DE MODELOS ANIMAIS DE DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS. Rosentock, T.R., Okuno, C.S., Jurkiewicz, A., Smaili, S.S. - Departamento de Farmacologia, UNIFESP/EPM, SP

Introdução: A homeostase de Ca^{+2} é um dos mecanismos relacionados com doenças neurodegenerativas como a Doença de Huntington (DH). Disfunções no Ca^{+2} mitocondrial (Ca^{+2}_m) podem acarretar estresse oxidativo, transição de permeabilidade mitocondrial (TPM) e apoptose. Esse trabalho tem como objetivo estudar as disfunções mitocondriais e os processos relacionados ao Ca^{+2} e a morte celular em um dos modelos da DH: o induzido por ácido 3-nitropropiónico (3NP).

Métodos: A liberação de Ca^{+2}_m foi investigada em cultura primária de astrócitos de camundongos da cepa B6CBA/F1. As células foram incubadas com Fura-2 e estudadas em espectrofluorímetro e microscopia de fluorescência, na presença do 3NP, de inibidores da TPM como a CSA e de antioxidantes.

Resultados: Os resultados mostram que o 3NP foi capaz de induzir uma liberação de Ca^{+2}_m de 35% em relação ao valor basal. Essa liberação foi reduzida de 61,1% a 95,2% na presença da CSA e de antioxidantes. Em células tratadas com 3NP por 24 h foi observado um aumento na morte celular de 60% em relação as células controle.

Conclusão: Os resultados sugerem que o 3NP libera Ca^{+2}_m provavelmente via TPM e aumento do estresse oxidativo, já que tanto a CSA como os antioxidantes foram capazes de inibir essa liberação. Com base nestes resultados podemos sugerir que as alterações comportamentais compatíveis com a DH induzidas por 3NP estão relacionadas com a inibição mitocondrial e liberação de Ca^{+2} para o citosol. Efeitos tóxicos decorrentes desta liberação podem levar a um aumento da morte celular.

Apoio Financeiro: FAPESP e CNPq

06.034

RELAÇÃO ESTRUTURA-ATIVIDADE DA PROTEÍNA BAX NA LIBERAÇÃO DE Ca^{+2} MITOCONDRIAL. Carvalho, A.C.P.(1), Rosentock, T.R.(1), Youle, R.J.(2), and Smaili, S.S.(1). (1) Departamento de Farmacologia, UNIFESP; (2) National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA.

INTRODUÇÃO: A proteína pró-apoptótica Bax encontra-se normalmente solúvel no citosol. Após estímulo apoptótico, ela transloca e se insere na membrana mitocondrial. A Bax é capaz de promover uma liberação de fatores apoptóticos como citocromo c e o Ca^{+2} mitocondrial (Ca^{+2}_m).

Não se sabe se este é um efeito específico da Bax e dependente da sua estrutura. **OBJETIVO:** Estudar a relação estrutura e atividade da Bax na liberação do Ca^{+2}_m pela utilização de diferentes proteínas Bax contendo mutações específicas. **MATERIAIS e MÉTODOS:** Experimentos foram realizados em cultura primária de astrócitos de ratos. No dia do experimento as células foram ressuspendidas em tampão intracelular e permeabilizadas. Em seguida foram incubadas com o Fura-2-FF ácido, indicador de baixa afinidade, para a medida do Ca^{+2} em espectrofluorímetro. **RESULTADOS:** Foi avaliado o efeito de duas proteínas Bax mutantes (Bax W107 e Bax W139) na liberação de Ca^{+2}_m (na presença de Tapsigargina – inibidora da Ca^{+2} -ATPase do Reticulo Endoplasmático). A Bax W107 (1ug/ml) promoveu um aumento na fluorescência basal de 1,7% chegando ao máximo de 9,7% com concentrações máximas (acima de 4ug/ml). A Bax W139 promoveu aumento da fluorescência que variou em média de 10-23% em relação ao basal. Na presença de ciclosporina A (CSA), um inibidor mitocondrial, o efeito das duas proteínas foi inibido. As mutantes apresentam uma potência inferior à Bax pura. **CONCLUSÕES:** Os resultados indicam que as Bax mutantes são capazes de promover liberação de Ca^{+2}_m . Porém, a W139 apresentou-se mais potente do que a W107, o que sugere que Bax apresenta um efeito específico e dependente da estrutura para a liberação de Ca^{+2}_m . **APOIO FINANCEIRO:** FAPESP e CNPq.

06.035

INIBIDORES MITOCONDRIAIS E DROGAS QUE MOBILIZAM ESTOQUES INTRACELULARES DE CÁLCIO CAUSAM APOPTOSE. Okuno, C. S., Machado, L.S., Kato, L. M., Smaili, S.S. Departamento de Farmacologia, UNIFESP-EPM.

Introdução: O ciclo celular envolve processos de morte celular programada que tem grande importância fisiológica. A Apoptose é um tipo de morte celular programada que está presente não só em processos fisiológicos, mas também na gênese de várias patologias. Estudos recentes mostram que o cálcio intracelular pode ser um dos mediadores da apoptose.

Objetivo: Estudar a indução da apoptose por drogas que mobilizam estoques intracelulares de cálcio como o retículo endoplasmático (ER) e mitocôndria.

Materiais e métodos: Astrócitos do córtex de rato com 4 dias foram cultivados. Após confluência (8-10 dias), as células foram tratadas com drogas que mobilizam cálcio do ER como a Tapsigargina (Tap) e a Cafeína (Caf), ou da mitocôndria como o FCCP e Oligomicina (Oli). Estas foram adicionadas isoladamente ou em combinação. Após 6, 12 e 24 horas do tratamento, foi adicionado o corante Hoersch 33342 e os núcleos apoptóticos contados em um microscópio de fluorescência.

Resultados: Observou-se que o FCCP é capaz de aumentar a taxa de apoptose, ficando esta em torno de 30-35% após 12 horas do tratamento. As drogas que mobilizam estoques do RE como a Caf e a Tap, apresentaram taxas de apoptose semelhantes após 12 e 24 horas do tratamento, mas seus efeitos foram potenciados na presença de inibidores mitocondriais (45%).

Conclusão: Associação de inibidores mitocondriais com drogas que mobilizam estoques intracelulares de cálcio aumenta as taxas de apoptose, o que indica que a mitocôndria e o cálcio são importantes mediadores da morte celular

Apoio: FAPESP e CNPq.

06.036

EFEITO DO 4-CLORO-m-CRESOL NA CONCENTRAÇÃO DO CÁLCIO INTRACELULAR EM MÚSCULO DEPENDENTE DE TESTOSTERONA DE CAMUNDONGOS DISTRÓFICOS. Vallin A.C.C.***, Cardoso, E.M.***, Bossolani, M.P.**, Gonçalo, M.C., Lima-Landman, M.T.R., Lapa, A.J. e Soucar, C. Setor Produtos Naturais, Depto. Farmacologia, Escola Paulista de Medicina, UNIFESP, 04044-020, SP-Brasil.

Objetivos: Na distrofia muscular Duchenne (DMD) e no camundongo distrófico (*mdx*), a necrose muscular associada à falta de expressão da distrofina é atribuída principalmente a alterações da homeostase do cálcio intracelular. Este trabalho analisou as contraturas musculares produzidas por 4-cloro-m-cresol (4-CmC), um liberador de cálcio do retículo sarcoplasmático, em músculos sensível (elevador do ânus, EA) e menos sensível (diafragma, DF) à testosterona, de camundongos *mdx* em 3 fases críticas da miopatia. O efeito do 4-CmC na concentração de cálcio intracelular ($[Ca^{2+}]_i$) foi também avaliado em culturas celulares e em fibras musculares dissociadas de animais adultos e senis.

Métodos e Resultados: Músculos EA e DF de camundongos normais *emdx* pré-púberes (1 mês), adultos jovens (3-4 meses) e senis (15-18 meses) foram submetidos a registros de contração isométrica e das contraturas produzidas por 4-CmC (0,1 a 5 mM), a 30 °C. A $[Ca^{2+}]_i$ foi determinada por fluorimetria com o indicador fura-2/AM, em culturas de células da musculatura da coxa de camundongos recém nascidos e em fibras musculares dissociadas agudamente com colagenase (0,2%, 30 min, 35°C) de animais adultos jovens e senis, normais *emdx*. As contraturas máximas produzidas por 4-CmC (5 mM) nos EA dos animais normais pré-púberes ($60 \pm 18\%$ da tensão de tétano, TT) foi maior que a dos adultos ($21,0\% \pm 2,3\%$ TT) e senis ($33 \pm 7\%$ TT). Resultados semelhantes foram obtidos nos EA dos correspondentes grupos *mdx*. Em todos os grupos, a Cl_{50} do 4-CmC variou de 2 a 5 mM. As contraturas produzidas por 4-CmC no DF foram semelhantes nas 3 idades e não diferiram entre as linhagens normal e *mdx*. A $[Ca^{2+}]_i$ de células em cultura (71 ± 3 nM) e de fibras dissociadas do EA de animais adultos jovens (88 ± 6 nM) e senis (72 ± 12 nM) normais não diferiu dos valores obtidos nos mesmos grupos *mdx*. As células em cultura dos *mdx* foram mais sensíveis que as culturas normais ao 4-CmC (10-300 nM), aumentando a $[Ca^{2+}]_i$ de $116 \pm 2\%$ a $154 \pm 10\%$ do basal. Entretanto, a sensibilidade das fibras dissociadas dos grupos adulto jovem e senil ao 4-CmC não diferiu entre as duas linhagens.

Conclusão: Os resultados não revelaram alterações da $[Ca^{2+}]_i$ basal nas células musculares dos grupos adulto jovem e senil ao 4-CmC, mas sugerem alterações da mobilização intracelular do Ca^{2+} nas fibras distróficas.
Apoio Financeiro: CAPES, CNPq, FAPESP, FADA.

06.037

PARTICIPAÇÃO DA PROTEÍNA ANTIAPOPTÓTICA Bcl-2 NA HOMEOSTASE DE Ca^{2+} DE CÉLULAS TUMORAIS. Hirata, H.; Machado, L.S.; Jurkiewicz, A. e Smaili, S.S.. Departamento de Farmacologia/ Unifesp/EPM, SP

Introdução- O papel da Bcl-2, proteína antiapoptótica, na homeostase de cálcio citoplasmático tem sido pouco estudado. Foyouzi e cols (PNAS, 97, 5723, 2000) e Pinton e cols (JCB, 148, 857, 2000) observaram que células transfectadas com o gene da Bcl-2 apresentavam uma diminuição na concentração de cálcio livre do retículo endoplasmático. No entanto, a Bcl-2 está também na mitocôndria que participa da sinalização de cálcio. O objetivo deste trabalho foi estudar o efeito da Bcl-2 na homeostase de cálcio intracelular. **Métodos-** Os estudos foram realizados utilizando células PC12 transfectadas permanentemente com o gene da Bcl-2. As células foram carregadas com Fura-2AM, e as imagens e fluorescência foram obtidas através de uma câmera digital de alta resolução em tempo e espaços reais.

Resultados- Observamos que Acetilcolina (ACh: 5, 10 e 15 nM) produz um aumento dose dependente no cálcio citoplasmático (Ca^{2+}_i) de maneira transiente. O aumento foi maior no grupo controle do que Bcl-2+, enquanto que a queda do Ca^{2+}_i não apresentou diferenças. A tapsigargina (TAP: 1 nM) promove um pequeno aumento no Ca^{2+}_i : controle (4%) e Bcl-2+ (5,5%). Na

presença de TAP o aumento no Ca^{2+}_i induzido por ACh não difere entre o controle e Bcl-2+. No entanto, o decaimento no Ca^{2+}_i foi mais acentuado para a Bcl-2+ (46,8%) do que nas células controle (18%). **Conclusão-** A Bcl-2 parece diminuir a disponibilidade de cálcio mobilizado para a resposta da ACh e facilita a retirada do Ca^{2+}_i , o que pode proteger as células da apoptose. Apoio financeiro: Fapesp e CNPq.

06.038

EFEITOS DO ÁCIDO ARAQUIDÔNICO E 2-APB NO INFLUXO DE CÁLCIO OPERADO PELOS ESTOQUES EM CÉLULAS CULTIVADAS DA MUSCULATURA LISA INTESTINAL. Maria Et-suko Miyamoto Oshiro, Rogerio Neri E Alice Ferreira.

Na maioria das células, a depleção do estoque de cálcio intracelular ativa o influxo de cálcio extracelular pela membrana plasmática, conhecido como influxo de cálcio operado pelos estoques (SOCs). Anteriormente, verificamos que as células da musculatura longitudinal de íleo de cobaia (CMLIC) sinalizam a abertura destes SOCs e dados da literatura sugerem que os IP3-Rs estão fisicamente acoplados a estes. Nosso intuito foi verificar se o aminoetoxifenilborato (2-APB), um inibidor do IP3-R, inibiria a ativação dos SOCs, induzida por depleção quer pela remoção de cálcio do meio ou pela aplicação de 1 μ M de Tapsigargina (TG) em células da musculatura longitudinal de íleo de cobaia. Também estudamos o efeito do ácido araquidônico (AA), pois Gamberucci e cols., 1997 (Cell Calcium v. 21, 5, 375-385, 1997) reportaram que ácidos graxos insaturados inibem este mecanismo. Utilizamos o fluoróforo fura-2-AM (2 μ M) e suspensões celulares de culturas primárias. A adição de AA (5 μ M) na ausência de cálcio mobilizou uma pequena quantidade de cálcio intracelular e quando readicionamos 1,36 mM de cloreto de cálcio, ocorreu potenciação da entrada de cálcio, tanto na presença da TG como no meio sem cálcio. O 2-APB não inibiu os SOCs, nas mesmas condições de depleção e induziu aumentos na $[Ca^{2+}]_i$ por si. Sugerimos que as suspensões das CMLIC expressam os SOCs, mas que o acoplamento físico destes com o citoesqueleto e as condições de cultivo alteram as propriedades farmacológicas. Uma permeabilização inespecífica da membrana plasmática pode ocorrer na presença dos ácidos graxos pois estes facilmente particionam e intercalam na mesma, alterando sua estrutura/fluidez e mobilizando cálcio do pool de Ca^{2+} sigargina-sensível, levando a um influxo de cálcio pelos SOCs e/ou outras vias. Suporte financeiro: FAPESP, CNPq, FADA)

06.039

CAPACITATIVE CALCIUM ENTRY VS SMOOTH MUSCLE CONTRACTIBILITY ON GUINEA PIG ILEUM: IP3R ROLE. Neri, R.; Ferreira, A.; Oshiro, M. E. M.. Depto de Biofísica, UNIFESP - EPM, SP, Brasil.

Calcium ion (Ca^{2+}) a known important second messenger, participates in numberless cellular phenomena and its intracellular levels $[Ca^{2+}]_i$ are controlled by several and interconnected

mechanisms that maintain its basal levels around 100 nM. In guinea pig intestinal smooth muscle where, intracellular Ca^{2+} stocks (ICS) aren't so big when compared with the vascular smooth muscle, the $[Ca^{2+}]_i$ changes are consequence of outside Ca^{2+} incoming. This calcium influx occurs by several ways, including receptor operated ionic channels (ROCs), voltage operated ionic channels (VOCs), across ionic exchanger (like Na/Ca) and through the channels operated by filling state of the intracellular calcium stores (SOCs) so called capacitative calcium entry (CCE). CCE has been widely demonstrated in several kinds of cells, excitable or not, and several animals species. The most important question is the physiologic SOCs role of CCE in the cells. In order to study this capacitative entry, we made experiments evolving the smooth muscle contraction of guinea pig ileum registration with simultaneous determination of intracellular calcium levels using the Ca^{2+} fluorophores Fura-2. We verify that exists a large correlation between the levels of $[Ca^{2+}]_i$ and the contraction, and confirm the presence of CCE on this preparation. It was observed however that Ca^{2+} entry across SOCs directly to ICS to refill it. We observe that the depolarization with 40 mM KCl has the ability to liberate Ca^{2+} from ICS, after their refilling state across SOC, in a time dependent manner. We confirm the participation of Inositol-thrisphosphate-3,4,5 receptor (IP3R) in CCE using the IP3R blocking 2APB. These data suggests that the role of CCE re-complete the ICS levels to normal values. Financial Support: CNPq, FAPESP

06.040

MELANONINA E ANÁLOGOS PROMOVE REDUÇÃO DE AMPc EM MIOTUBOS DE RATOS EM CULTURAS ESTIMULADAS POR FORSKOLIN E RECEPTORES ACOPLADOS À PROTEÍNA G α . Regina P. Markus (1), Amanda E. G. Monteiro (1) & Roseli O. Godinho (2) – (1) Departamento de Fisiologia – IB – USP, (2) Departamento de Farmacologia – UNIFESP – EPM.

Melatonina (MEL) é capaz de reduzir o número de sítios de ligação para alfa-bungarotoxina e a produção de AMPc induzida por forskolin em miotubos de ratos em cultura (FESBE 13.096, 2001). Ambos efeitos podem ser bloqueados por luzindole, um bloqueador competitivo de receptores de melatonina. Neste trabalho foi avaliada a capacidade da melatonina e análogos reduzirem a produção de AMPc induzida por agonistas que estimulam receptores acoplados à proteína G α . **MÉTODOS:** Cultura primária de miotubos (dia 6) foram incubadas com forskolin (0,01 mM), isoprenalina (0,01 mM), CGRP (10 nM) e adenosina (0,1 mM), na presença ou ausência de MEL (0,1 – 1 nM) por 5 min. A concentração de AMPc intracelular foi medida por RIA (Amersham) e expressa como pmol/106 células plaqueadas. **RESULTADOS E CONCLUSÃO:** Melatonina reduziu de maneira dose-dependente (0,1 – 3 nM) o aumento de AMPc induzido por forskolin ($8,6 \pm 0,7$, n=12), sendo o efeito máximo de 30% de redução. Efeito semelhante foi observado com CGRP (10 nM, n=4). A redução do aumento de AMPc gerado por ADO (0,1 mM, n=6) e isoprenalina (0,01 mM, n=3) foi obtido apenas com a dose de 3 nM de melatonina. Em todos os casos a redução da produção de AMPc foi da ordem

de 30%. Os análogos da melatonina, N-acetilserotonina (0,1 nM, n=4) e 4PPDOT (100 nM, n=4) também foram capazes de reduzir o aumento de AMPc induzido por forskolin. Os dados mostram claramente que a MEL em miotubos de ratos reduz a produção de AMPc induzida por ativação direta da adenilciclase e de receptores acoplados à proteína Gs. No entanto, a resposta aos análogos de melatonina não segue a clássica farmacologia dos receptores acoplados à proteína Gi. Financiado por APESP AEGM (PIBIC)

06.041

RELAXING EFFECTS OF BAY 41-2272 IN RABBIT CORPUS CAVERNOSUM. Barakat, JS; Teixeira, CE; Antunes, E and De Nucci, G. Dept. Pharmacol. UNICAMP, Campinas/SP

OBJECTIVE: BAY 41-2272 was recently identified as a potent soluble guanylate cyclase (sGC) stimulator in a nitric oxide (NO)-independent manner. This study aimed to investigate the effects of BAY 41-2272 in the rabbit corpus cavernosum (RbCC). **METHODS:** Strips of RbCC were mounted in organ baths and connected to isometric transducers. Data were recorded in a PowerLab system. **RESULTS:** BAY 41-2272 (10 nM-10 μM) relaxed the RbCC in a concentration-dependent manner (n=38), with a pEC50 value of 6.80 + 0.07. The sGC inhibitor ODQ (10 μM) caused a rightward shift in the concentration-response curve (CRC) to BAY 41-2272 (pEC50 of 6.75 + 0.04 in absence and 6.08 + 0.21 in presence of ODQ) and virtually abolished glyceryl trinitrate (GTN)-induced relaxations. Similarly, the NO synthesis inhibitor L-NAME (100 μM) caused a rightward shift in the CRC to BAY 41-2272 (pEC50 of 6.86 + 0.06 in absence and 6.22 + 0.09 in presence of L-NAME). The PDE5 inhibitor sildenafil (100 nM) did not significantly affect the relaxation induced by BAY 41-2272 (pEC50 of 6.58 + 0.12 in absence and 6.95 + 0.11 in presence of sildenafil), but caused a leftward shift in the CRC to GTN (pEC50 of 6.55 + 0.07 in absence and 7.06 + 0.07 in presence of sildenafil). In tissues pretreated with L-NAME, addition of ODQ did not cause a further rightward shift in the CRC to BAY 41-2272 (pEC50 of 6.02 + 0.09 in presence of L-NAME and 5.78 + 0.16 in presence of L-NAME/ODQ). **CONCLUSION:** These findings suggest that besides stimulating sGC directly, BAY 41-2272 releases NO, which contributes to the relaxing activity of this compound in the RbCC. Financial Support: APESP.

06.042

ROLE OF NITRIC OXIDE IN THE RABBIT AORTA RELAXATION INDUCED BY BAY 41-2272. Priviero, FBM; Teixeira, CE; Antunes, E and De Nucci, G. Dept. Pharmacol. UNICAMP, Campinas/SP

OBJECTIVE: BAY 41-2272 was recently identified as a potent soluble guanylate cyclase (sGC) stimulator in a nitric oxide (NO)-independent manner. This study aimed to investigate the effects of BAY 41-2272 in the rabbit aorta (RbA). **METHODS:** Aortic rings were mounted in organ baths and connected to isometric transducers. Data were recorded in a PowerLab system. **RESULTS:**

In endothelium-intact RbA, BAY 41-2272 (10 nM-10 μM) relaxed the preparations in a concentration-dependent manner (n=7), with a pEC50 value of 6.41 + 0.07. The sGC inhibitor ODQ (10 μM; n=4) caused a rightward shift in the concentration-response curve (CRC) to BAY 41-2272 (pEC50 of 6.44 + 0.07 in absence and 5.87 + 0.08 in presence of ODQ). The NO synthesis inhibitor L-NAME (100 μM; n=3) significantly reduced the relaxations induced by BAY 41-2272 at low concentrations (10-100 nM). In endothelium-denuded rings, the CRC to BAY 41-2272 was shifted to the right in comparison to endothelium-intact preparations (pEC50 values of 6.41 + 0.07 and 5.99 + 0.06 in endothelium intact and denuded rings, respectively; n=5). The addition of ODQ (n=4) did not significantly alter the CRC to BAY 41-2272 in endothelium-denuded rings (pEC50 of 6.06 + 0.07 in absence and 5.99 + 0.09 in presence of ODQ). In addition, L-NAME (n=3) had no effect in the CRC to BAY 41-2272 in endothelium-denuded rings (pEC50 of 5.85 + 0.06 in absence and 5.86 + 0.08 in presence of L-NAME). **CONCLUSION:** These findings suggest that NO released from endothelial cells in response to BAY 41-2272 contributes to the relaxing activity of this compound in the RbA. Financial Support: APESP.

06.043

INVESTIGATION OF CELLULAR MECHANISMS INVOLVED IN THE INCREASED VASOCONSTRICTION RESPONSE OF VESSELS FROM SCHISTOSOMA MANSONI INFECTED MICE. Gontijo, L.S., Silva, F.M., Noël, Fe Silva, C.L.M., Dep. Farmacologia Básica e Clínica, ICB, Universidade Federal do Rio de Janeiro

Introduction: The presence of male *S. mansoni* in mice portal veins increases the contraction in response to 5-hydroxytryptamine (5-HT), and release soluble antigens that act out of mesenteric vessels. Here we investigate the reactivity of mice aorta (AO) and the cellular mechanisms responsible for the enhanced response to 5-HT of portal veins (PV) from infected mice. **Methods:** PV and AO contractions were recorded isometrically (control and *S. mansoni* infected mice). 5-HT (PV) or noradrenaline (AO) cumulative curves (0.01 – 10 μM) were performed, in the absence and presence of 100 nM thapsigargin (TG), 10 μM ryanodine (R YA), 10 μM niflumic acid (NFA) (PV) or 100 μM L-NAME (30 min) (AO). **Results:** TG reduced (~30%) the maximal response of PV to 5-HT equally in both groups. However, a reduction of the Emax value for 5-HT was observed only in the infected group after addition of R YA (from 1.0 ± 0.1 to 0.7 ± 0.1 mN), as well as after the inhibition of Ca_v channels with niflumic acid. Aorta contractions in response to noradrenaline (Emax) were higher in infected than in control group (9.6 ± 0.6 mN and 6.2 ± 0.5, respectively). NO synthesis inhibition by L-NAME increased Emax value of noradrenaline in both groups (12.2 ± 0.6 and 9.5 ± 0.7 mN). **Discussion:** The finding that SERCA inhibition reduces similarly the Emax of 5-HT in both groups suggest that the pump efficacy is preserved. However an increased dependence on SR Ca²⁺ mobilization (R YA receptors) and influx (L-type Ca²⁺

channels) in PV from infected group seems to occur, and may contribute to the increased response to 5-HT. An enhanced contraction to noradrenaline of murine AO (infected group) indicate that male *S. mansoni* also alter vascular reactivity outside the splanchnic system, independently of NO pathway. Supported by Faperj, CNPq.

06.044

ESTUDO COMPARATIVO DOS EFEITOS DE UM ANÁLOGO NÃO AROMÁTICO DA NEOSTIGMINA EM SUA FORMA METILADA OU NÃO EM PREPARAÇÕES NERVO FRÊNICO DIAFRAGMA ISOLADO DE RATOS. Ramos, E. R. P.; Wietzycoski, F; Santos, D. C. L.; Bolonheis, S. M.; Basso, E. A.; Santos, I. L.; Campesatto-Mella, E. A.; Alves-Do-Prado, W. Universidade Estadual de Maringá (UEM).

Objetivo: O agente *cis* e *trans*-1-(((dimetilamino) carbonil) oxi) 2-N-N-dimetilaminociclo-hexano (NC), sintetizado no laboratório de Química Orgânica do Departamento de Química da Universidade Estadual de Maringá, apresenta estrutura química semelhante ao agente anticolinesterásico neostigmina (N). Conforme demonstrado em estudos prévios (Anais da FeSBE, 2001), NC (*trans*) atua na transmissão neuromuscular de ratos, entretanto, seus efeitos não decorrem de uma atividade anticolinesterásica. Recentemente, o mesmo laboratório tem sintetizado NC na forma de um sal metilado de iodeto (NC_{sal}). O presente estudo tem por objetivo investigar se essa modificação na estrutura de NC altera seus efeitos sobre a transmissão neuromuscular de ratos.

Metodos: Utilizou-se a clássica preparação nervo frênico-diafragma isolado de ratos cujas contrações foram registradas em polígrafo Ugo Basile. Os resultados foram analisados pelo teste *t* de Student (P < 0.05). **Resultados:** NC (760 nM) e NC_{sal} (760 nM) produziram fadiga (NC = -47.1% ± 6.28 e NC_{sal} = -25.9% ± 5.8) de transmissão quando as preparações foram indiretamente estimuladas com pulsos de 100 Hz. A 0,2 Hz, NC (3,0 mM) induziu aumento de 79,3% ± 4,3 na amplitude das contrações musculares (ACM), mas NC_{sal} na mesma concentração, não produziu nenhum efeito sobre a ACM. **Conclusão:** Estes resultados sugerem que NC na forma de sal parece atuar através de mecanismo diferente de NC. Apoio financeiro CNPq.

06.045

EFEITOS DE UM ANÁLOGO DA NEOSTIGMINA NA TRANSMISSÃO NEUROMUSCULAR DE RATOS. Ramos, E. R.; Wietzycoski, F; Basso E. A.; Santos, I. L.; Campesatto-Mella, E. A.; Alves-Do-Prado, W. Universidade Estadual de Maringá (UEM).

Objetivo: No Departamento de Química da Universidade Estadual de Maringá foi sintetizado o agente *cis* e *trans*-1-(((dimetilamino) carbonil) oxi) 2-N-N-dimetilaminociclohexano (NC), um análogo não aromático da neostigmina (N). Estudos prévios mostraram que NC (*trans*) e N au-

mentam a amplitude das contrações musculares (AMC) de preparações neuromusculares estimuladas com pulsos de 0,2 Hz, mas induzem fadiga de transmissão quando os pulsos são elevados para 100 Hz. Por outro lado, NC, ao contrário de N, não reverteu o bloqueio neuromuscular induzido por d-tubocurarina nem potencializou o abalo muscular induzido pela administração retrógrada de acetilcolina, sugerindo que NC provavelmente não atue na transmissão neuromuscular através de um mecanismo de ação anticolinérgico. O presente estudo tem por objetivo investigar os efeitos de NC (*trans*) em preparações neuromusculares de ratos previamente curarizadas e diretamente estimuladas com pulsos de 0,2 Hz.

Métodos: Utilizou-se preparações nervo frênico-diafragma isolado de ratos cujas contrações foram registradas em polígrafo Ugo Basile. Os resultados foram analisados pelo teste "t" de Student ($P < 0.05$).

Resultados: Com estimulação elétrica indireta (0,2 Hz) NC (3,0 mM) induziu 79,3 % \pm 4,3 (n=8) de aumento na ACM. Em preparações previamente curarizadas e diretamente estimuladas com pulsos de 0,2 Hz, NC (3,0 mM) induziu 33,9 % \pm 4,8 (n=4) de aumento na ACM.

Conclusão: Estes resultados demonstram que NC atua no músculo e no terminal nervoso motor para produzir os efeitos observados.

Apoio financeiro CNPq.

06.046

NEOSTIGMINA: MECANISMOS CELULARES FACILITADORES DA TRANSMISSÃO NEUROMUSCULAR. Baso, A.C.Z.; Serra, C.S.M.; Oliveira, A.C. Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.

Introdução: Neste estudo avalia-se comparativamente a participação de diferentes mecanismos celulares na facilitação neuromuscular induzida pela neostigmina (NEO). A facilitação foi mensurada pela capacidade da NEO em reverter o bloqueio neuromuscular devido ao vecurônio. Métodos: Preparação "in vitro": nervo ciático-músculo extensor longo dos dedos do rato. Parâmetros fisiológicos registrados: contrações musculares geradas a 0,1 Hz (isolada) e 50 Hz (tetânica) e potenciais de placa terminal (pspt), gerados em salvas de 50 Hz, dos quais se mediu a amplitude e o tempo de decaimento à metade (T1/2) e se calculou o tamanho quântico (TQ) e o conteúdo quântico (CQ). Resultados: Utilizando técnicas miográficas determinou-se a menor concentração de neostigmina capaz de antagonizar o bloqueio da contração muscular causado pelo vecurônio. Esta concentração foi $1,6 \times 10^{-8}$ M. Subseqüentemente, a neostigmina, nessa mesma concentração, teve os seus efeitos celulares estudados por técnicas eletrofisiológicas (registro dos pspt). Observou-se diferença significante ($p < 0,05$, teste T) unicamente na duração (T1/2) dos pspt: controle: $1,3 \pm 0,1$ msec (média \pm erro padrão, n=14 células); em neostigmina: $1,9 \pm 0,1$ msec (idem, n=10 células). A amplitude dos pspt, o CQ e o TQ não foram significativamente afetados nesta concentração de neostigmina. Discussão: Somente a duração dos pspt foi aumentada pela neostigmina $1,6 \times 10^{-8}$ M. Este é portanto o único mecanismo responsável pela

facilitação da transmissão neuromuscular exercida pela neostigmina $1,6 \times 10^{-8}$ M. Financiamento: FAPESP, CNPq, CAPES

06.047

A INIBIÇÃO DA Ca^{2+} -ATPase RETICULAR NÃO ALTERA A RESPOSTA CONTRÁTIL INDUZIDA COM FENILEFRINA (FE) EM MÚSCULO ANOCOCÍGEO (MAC) DE RATO. Araújo, C.B.L. & Bendhack, L.M. Lab. de Farmacologia, FCFRP – USP. 14040-903, -Ribeirão Preto-S.P

Introdução: O aumento da concentração citoplasmática de Ca^{2+} é imprescindível à contração induzida com FE no MAC de rato. A ativação de adrenoceptores alfa-1 com FE promove formação de IP_3 que, libera Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático e DAG. O ácido ciclopiazônico (CPA) inibe a Ca^{2+} -ATPase reticular e impede o armazenamento de Ca^{2+} neste estoque, depletando-o. Objetivo: 1) Verificar se a depleção do Ca^{2+} armazenado no retículo sarcoplasmático via CPA interfere com a resposta contrátil induzida com FE no MAC de rato; 2) Avaliar o tempo necessário para a depleção do estoque de Ca^{2+} sensível à FE.

Métodos e Resultados: MAC de ratos foi isolado e montado em câmara para órgão isolado para registro de tensão isométrica contendo solução de Krebs com Ca^{2+} 2,5 mM. Medimos a resposta contrátil induzida com a EC_{50} da FE (100 nM) em Ca^{2+} 2,5 mM e após 3, 6, 9, 12 e 15 min de incubação da preparação em meio zero Ca^{2+} -EGTA. Estudamos o tempo de repleção do estoque intracelular de Ca^{2+} e a contração induzida com FE (100 nM) em meio zero- Ca^{2+} -EGTA em presença de 10 μ M de CPA. Em meio contendo Ca^{2+} a contração induzida com FE foi $4,73 \pm 0,55$ g (n=8). Após 3 min em meio zero Ca^{2+} a FE induziu contração de $2,11 \pm 0,79$ g (n=8); após 6 min $1,49 \pm 0,24$ g (n=8); após 9 min $0,54 \pm 0,23$ g (n=8); após 12 min $0,56 \pm 0,23$ g (n=8); e após 15 min $0,0 \pm 0,0$ g (n=8). O tempo necessário para repleção dos estoques intracelulares de Ca^{2+} após 15 min em meio zero Ca^{2+} -EGTA foi de 30 min (n=6). O CPA não alterou a resposta contrátil induzida com FE em meio contendo Ca^{2+} após depleção dos estoques intracelulares em presença de CPA (n=6).

Conclusões: Os nossos resultados indicam que embora a mobilização de Ca^{2+} dos estoques intracelulares pela FE esteja impedida pelo CPA, a FE poderia mobilizar Ca^{2+} de outras fontes no sentido de compensar a ausência da liberação do Ca^{2+} sensível à Ca^{2+} -ATPase, pois não houve alteração da resposta contrátil à FE após tratamento com CPA. A depleção do estoque intracelular de Ca^{2+} , sensível à FE, ocorre de modo tempo-dependente.

Apoio Financeiro: FAPESP e PRONEX.

06.048

TETRAFENILFOSFÔNIO E TAPSIGARGINA INDUZEM FADIGA TETÂNICA EM PREPARAÇÕES NEUROMUSCULARES DE RATO. Borges, H.E., Bolonha, S.M., Campesatto-Mella, E., Santos, I.L.D., Santos, D.C.L., Alves-do-Prado, V. Departamento de Farmácia e Farmacologia, Universidade Estadual de Maringá, Paraná.

Introdução: Estoques mitocondriais e reticulares de Ca^{2+} estão presentes no terminal nervoso motor. Estudos bioquímicos com tapsigargina (TPSG), um bloqueador da captação e liberação de Ca^{2+} reticular, sugerem ser o estoque reticular mais importante para a manutenção da transmissão nas altas frequências de estimulações. Por outro lado, estudos com bloqueadores da liberação e captação de Ca^{2+} mitocondrial (Tetrafenilfosfônio, TFF) não foram executados. O presente trabalho investiga a influência dos estoques intracelulares de Ca^{2+} no perfil das contrações tetanizantes.

Método: Estímulos elétricos de altas frequências (F) foram indiretamente aplicados a preparações nervo frênico-diafragma isolada de ratos. A razão (R) entre a tensão muscular observada ao final (B) de F e a aquela obtida no início (A) foi usada para análise. Após encontrar F que induzia valores de R=1, drogas foram adicionadas à cuba de contenção. R foi expresso em % do R obtido em ausência de drogas (R=1,0). Os dados foram comparados com uso do teste "t" de Student ($P < 0,05$).

Resultados: TFF e TPSG reduziram os valores de R para $75,13 \pm 2,44\%$ (n=6) e $77,65 \pm 1,86\%$ (n=6), respectivamente.

Discussão: Ambos os estoques intracelulares de Ca^{2+} são importantes para o bom funcionamento do terminal nervoso motor na vigência de altas frequências de estimulações aplicadas ao nervo motor.

Apoio financeiro: CNPq

06.049

A POTENCIAÇÃO PÓS-TETÂNICA (PPT) INDUZIDA POR ÓXIDO NÍTRICO (NO) DEPENDE DA AÇÃO DO GÁS SOBRE O TERMINAL NERVO MOTOR. Campesatto-Mella, E., Bolonha, S.M., Borges, H.E., Santos, I.L.D., Ambiel, C.R., Ramos, E.R.P., Alves-Do-Prado, V. Departamento de Farmácia e Farmacologia, Universidade Estadual de Maringá, PR.

Objetivo: PPT é o aumento transitório da amplitude das contrações musculares observado com baixa frequência de estimulação após um estímulo tetanizante ser aplicado ao nervo motor. Estudos com tetrafenilfosfônio (TFF), um bloqueador da captação e liberação de Ca^{2+} mitocondrial, sugerem que o estoque mitocondrial é mais importante que o reticular para o aparecimento da PPT. No presente trabalho, estudou-se os efeitos de doadores de NO (L-arginina; L-arg ou S-nitroso-N-acetylpenicillamine; SNAP) sobre a PPT.

Métodos: A PPT foi induzida com estímulos de 100 Hz indiretamente aplicados, durante 10 seg e a intervalos de 10 min, em preparações nervo frênico-diafragma isolado de ratos. 100 Hz foi sempre intercalado com pulsos de 0,2 Hz. A PPT foi medida como razão entre a tensão da contração muscular a 0,2 Hz 5 seg após o tétano e a obtida 5 seg antes do estímulo tetanizante. Resultados: L-NOARG, bloqueador da NO-sintase, reduziu ($15\% \pm 1,1$, n=6) a PPT. Tal efeito foi antagonizado por L-arg que, isoladamente, assim como o SNAP, aumentou a PPT (L-arg = $17,5\% \pm 0,6$, n=6; SNAP = $10\% \pm 1,1$, n=6). L-Arg e SNAP antagonizaram a redução ($4,86\% \pm 0,4$, n=6) da PPT induzida por TFF. A PPT não foi alterada quando os diferentes agentes foram

estudados com preparações curarizadas e diretamente estimuladas.

Conclusão: NO aumenta a PPT por atuar sobre o terminal nervoso motor promovendo, provavelmente, uma elevação dos níveis intracelulares de Ca^{++} .

Apoio financeiro CNPq/CAPES

06.050

INCREASED Ca^{2+} INFLUX IN 2K-1C HYPERTENSIVE RAT AORTAS: ROLE OF Ca^{2+} -ACTIVATED K^{+} CHANNELS Callera, G.E., Varanda, W.A.1, Bendhack, L.M. Faculty of Pharmaceutical Sciences, 1Faculty of Medicine, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP-Brazil.

INTRODUCTION: Hypertensive 2K-1C rat aortas show an increased contraction to Ca^{2+} channels activators, suggesting an altered Ca^{2+} influx. K^{+} channels are important regulators of Ca^{2+} influx through voltage-gated channels, by controlling the membrane potential. We tested the hypothesis that in 2K-1C aortas an increased Ca^{2+} influx is related to changes in Ca^{2+} -activated K^{+} channels. **METHODS:** Isometric tension and resting membrane potential were evaluated in aortic rings without endothelium. Intracellular Ca^{2+} concentration ($[Ca^{2+}]_i$) was measured with fura 2/AM in cultured isolated aortic cells. **RESULTS:** Maximal contraction and sensitivity to Bay K 8644 were greater in 2K-1C than in normotensive rats (2K) (1.77 ± 0.15 vs $1.25 \pm 0.19g$, $p < 0.05$; pD_2 : 8.27 ± 0.07 vs 7.92 ± 0.08 , $p < 0.05$). Charybdotoxin (100nM) abolished the difference in maximal contraction to Bay K 8644 between 2K-1C and 2K (1.63 ± 0.18 vs $1.83 \pm 0.28g$; pD_2 : 9.26 ± 0.10 vs 8.45 ± 0.12 , $p < 0.05$). Resting membrane potential was less negative in 2K-1C (-35.19 ± 4.91 vs $-48.32 \pm 1.88mV$, $p < 0.01$). In 2K-1C, 100 nM Bay K 8644 induced larger increase in $[Ca^{2+}]_i$ (190.6 ± 45.6 vs 92.5 ± 14.6 nM, $p < 0.05$). Charybdotoxin (100nM) increased the effect of Bay K 8644 on $[Ca^{2+}]_i$ and abolished the difference between 2K-1C and 2K (977.8 ± 234.8 vs 839.5 ± 250.4 nM). **CONCLUSION:** Changes in the functioning of charybdotoxin-sensitive K^{+} channels are responsible for the increased contribution of Ca^{2+} channels to Bay K 8644-induced contraction in 2K-1C aortas. Supported by APESP, CNPq and PRONEX.

06.051

EFFLUX OF cyclic AMP REGULATES THE INTRACELLULAR CYCLIC NUCLEOTIDE CONTENT IN SKELETAL MUSCLE CELLS. Costa, Jr., V.L.; Chiavegatti, T.; Lapa, A.J.; Godinho, R.O.; Depto. Farmacologia, UNIFESP

Introduction: Direct or receptor-dependent activation of adenylyl cyclase (AC) induces a transient increase in the skeletal muscle synthesis of AChE, that was attributed to a parallel variation in the intracellular cyclic AMP (cAMP) (Costa, J. Brit. J. Pharmacol., 133:229, 2001). The aim of this study was to analyze the mechanisms involved in the fluctuation of intracellular cAMP in skeletal muscle. **Methods:** The cAMP was radiometrically quantified in rat skeletal muscle cultures incubated for 5-60 min with isoproterenol (ISO, 30

nM), the AC activator forskolin (Forsk, 10nM) or vehicle solutions. All experiments ($n=3$) were performed in the presence of 1mM IBMX to inhibit cAMP degradation. **Results:** Treatment of cells for 5 min with ISO increased by 138% the basal level of cAMPi (25.0 ± 3.9 pmol/mg protein) that declined exponentially from the peak after 10 (179.5 ± 17.4 pmol/mg) to 60 min (40.4 ± 1.9 pmol/mg). A transient increase in basal cAMPi was also detected after 5 min incubation of cells with Forsk (405.8 ± 10.4 pmol/mg). This effect was followed by a linear decrease in cAMPi, that initiated after 15 min and reached 49% of the maximum level after 30 min. In both ISO and Forsk treated cells, the reduction of cAMPi from peak levels was correlated to the proportional increase in the extracellular cAMP, that reached 460% and 1650% of basal levels (14.9 ± 1.2 pmol/mg), after 60 min stimulation, respectively. **Discussion:** Our results suggest the existence of a cAMP transport to the extracellular compartment in skeletal muscle cells. Considering that the cAMP egress was detected either in the presence or absence of PDE inhibitor, the efflux of cyclic nucleotide might be an additional regulatory mechanism for cAMP intracellular signaling. Supported by: CAPES/apesp

06.052

ESTUDO MIOGRÁFICO E ELETROFISIOLÓGICO DOS EFEITOS DO CISATRACÚRIO NA JUNÇÃO NEUROMUSCULAR Serra, C.S.M.; Baso, A.C.Z.; Oliveira, A.C. Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

Introdução: Demonstramos anteriormente que a inibição de W edensky (tétano não-sustentado) induzida pelo atracúrio (ATRA) é devida a ações pré- e pós-sinápticas na junção neuromuscular sendo a pré-sináptica predominante. O ATRA é uma mistura de dez isômeros dos quais o cisatracúrio (CIS) é o predominante. Neste trabalho avaliaram-se as ações farmacológicas do CIS em condições experimentais similares àquelas utilizadas anteriormente para o ATRA. **Métodos:** A preparação utilizada foi a nervo ciático-músculo extensor longo dos dedos do rato, "in vitro". Foram registrados os seguintes parâmetros fisiológicos: a) contrações musculares geradas a 0,1Hz (isolada) e 50Hz (tetânica); b) potenciais de placa terminal (pspt), gerados em salvas de 50Hz e dos quais se mediu a amplitude do primeiro ppt da salva e a amplitude média do trigésimo ao quinquagésimo nono ppt da salva (pspt-platô) e se calculou o tamanho quântico (TQ) e o conteúdo quântico (CQ). **Resultados:** CIS ($1,3 \times 10^{-7}M$) induziu inibição de W edensky da contração tetânica sem alterar a contração isolada. Nesta mesma concentração CIS diminuiu significativamente ($p < 0,05$; teste T) a amplitude do primeiro ppt da salva, a amplitude dos pspt-platô, o CQ do primeiro ppt da salva e o CQ dos pspt-platô (células controles $n=9$; células tratadas $n=6$). Não houve alteração significativa do TQ. **Discussão:** Neste estudo modificações em CQ indicam efeito pré-sináptico e em TQ pós-sináptico. Assim, igualmente ao ATRA, o CIS induz inibição de W edensky da contração tetânica por mecanismo predominantemente pré-sináptico. **Financiamento:** APESP, CNPq, CAPES

06.053

AÇÕES DA AMITRIPTILINA SOBRE A ATIVIDADE SINÁPTICA BASAL E INDUZIDA PELA ATIVAÇÃO DOS RECEPTORES NICOTÍNICOS EM NEURÔNIOS HIPOCAMPÁIS. Nascimento, B.S.; Aracava, Yá & Albuquerque, E.X.

Introdução: A amitriptilina (AMI), antidepressivo tricíclico aumenta a taxa dessensibilização do receptor nicotínico (nAChR) (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1981). A ativação do nAChR pré-terminal, presente em neurônios hipocámpais em cultura, promove um aumento da liberação de neurotransmissores (NT) sensível à tetrodotoxina (TTX), bloqueador de canais de sódio. Neste trabalho, avaliamos em cultura de neurônios hipocámpais de rato os efeitos de AMI ($0,2$ - $10 \mu M$) sobre as correntes sinápticas basais e induzidas na presença da acetilcolina (ACh) e colina (Col), agonista seletivo dos nAChRs do subtipo alfa7. As correntes foram registrada na ausência de TTX com o uso da técnica do 'whole-cell clamp'. **Resultados:** As correntes sinápticas multiquânticas eram mediadas basicamente pelos NT GABA e glutamato (GLU), com o potencial de reversão próximo ao valor esperado para os respectivos receptores (-20 e 0 mV) com as soluções externa e interna utilizadas. A aplicação de pulsos de 5-15s de ACh ($300mM$) e Col ($1mM$) por um sistema de Tubo-U produziu um aumento seguido de diminuição da frequência das correntes sinápticas. A AMI (1 - $10 \mu M$), quando na solução de banho (~ 1 min antes do pulso de agonista) reduziu, dependentemente da concentração, a atividade basal das correntes sinápticas (i.e., sem agonista). A aplicação subsequente de pulsos de ACh e de Col não mostrou aumento da atividade sináptica. Embora à $0,2 \mu M$ a AMI não produzisse alteração da atividade basal, na sua presença houve um aumento inicial da atividade sináptica induzida pelos agonistas. **Conclusões:** Em neurônios hipocámpais, a AMI bloqueou as atividades sinápticas basais mediadas por GABA e GLU, abolindo o efeito da ativação dos nAChRs sobre a liberação de neurotransmissores. Suporte: CNPq

06.054

NITRERGIC RELAXATION OF RABBIT CORPUS CAVERNOSUM INDUCED BY BATRACHOTOXIN. Teixeira, CE; Antunes, E and De Nucci, G. Dept. Pharmacol. UNICAMP Campinas/SP

OBJECTIVES: Na^{+} channel activation causes a nitric oxide (NO)-dependent relaxation of erectile tissues. Batrachotoxin (BTX) is secreted by the skin of arrow poison frogs (Phylllobates aurotaenia) and causes persistent activation of Na^{+} channels. This study aimed to investigate the effects of BTX in rabbit corpus cavernosum (RbCC). **METHODS:** RbCC strips were mounted in 10-ml organ baths and connected to isometric transducers. Data were recorded in a PowerLab system. **RESULTS:** BTX (10 nM- $1 \mu M$) caused relaxing responses in a concentration-dependent manner, with a pEC_{50} value of 6.58 ± 0.10 . The NO synthesis inhibitor L-NAME ($100 \mu M$) reduced the relaxations evoked by BTX (300 nM, $57 \pm 4\%$ in absence and $9 \pm 1\%$ in presence of L-NAME). Subsequent addition of L-arginine (1 mM) restored the relaxations. The soluble guanylate cy-

clase inhibitor ODQ (10 μ M) prevented the relaxation evoked by BTX (81 + 1% inhibition), whereas the PDE5 inhibitor sildenafil (100 nM) caused a leftward shift in the concentration-response curve to BTX (30 nM-1 μ M, pEC₅₀ of 6.54 + 0.08 in absence and 7.00 + 0.06 in presence of sildenafil). The Na⁺ channel blockers tetrodotoxin and saxitoxin (100 nM, each) inhibited the BTX-induced relaxations (73 + 3% and 78 + 1% inhibition, respectively). When added during the established relaxation, both blockers promptly reversed the responses to the baseline. CONCLUSION: These results indicate that BTX relaxes the RbCC through the release of NO from nitrergic fibers. Acknowledgement: We thank Dr John W. Daly (NIH, Bethesda, MD, U.S.A) for kindly supplying the amount of BTX used in this work. Financial Support: FAPESP.

06.055

PAPEL DO POTENCIAL DE MEMBRANA SOBRE A QUEDA DA REATIVIDADE DA CAMADA LONGITUDINAL DO ÍLEO DE COBAIA (CLIC) INDUZIDA PELO H₂O₂. Simonato, A., Aboulafia, J., Nouailhetas, V.L. A., Depto de Biofísica, UNIFESP/EPM, São Paulo, Brasil.

Introdução: Já demonstramos que a exposição ao H₂O₂ promove a queda da reatividade da CLIC. É descrito que o H₂O₂ altera o potencial de membrana do músculo liso vascular e provoca o relaxamento deste via ativação de canais de K⁺. Assim, estudamos o papel do potencial de membrana e dos canais maxi-K⁺ na queda da reatividade da CLIC ao KCl e agonistas, induzida por H₂O₂. Métodos: Registros de tensão da CLIC e registros das correntes de K⁺ em "patches" de membrana de miócitos recém dispersos da CLIC na configuração "cell-attached" com potencial de membrana fixado em -40mV. Resultados: A pequena despolarização induzida pelo KCl 4mM impediu a queda do Emáx, induzida pelo H₂O₂, para o KCl (controle (c): 19±3; após H₂O₂ 0.3mM (E1): 83±4*; após H₂O₂ 0,3mM e na presença de KCl 4mM (E2): 104±6;n=3), ACh (c: 123,4±4;E1:73±8*;E2: 113±6;n=4), Lis2-All (c: 122±4;E1:64±6*;E2: 113±5;n=4) e BK (c: 99±1;após H₂O₂ 1mM: 78±15*; após H₂O₂ 1mM e na presença de KCl 4mM: 107±7). O KCl também impediu a queda significativa do pD₂ para a ACh (c: 7,1; E1: 6,5*; E2: 6,8). A probabilidade de abertura dos Maxi-K⁺ aumentou frente a exposição ao H₂O₂ 0,1mM (de 0,027 para 0,056), 0,3mM (de 0,006 para 0,030) e 1mM (de 0,002 para 0,088). Sendo esta ativação reversível. O TEA 1mM não impediu o efeito do H₂O₂ sobre a CLIC. Discussão: A reversão parcial da queda da reatividade da CLIC para diferentes agentes estimulantes induzida por H₂O₂ indica a participação de canais iônicos dependentes de voltagem neste processo. A participação dos maxi-K⁺ foi descartada pela ausência de efeito do TEA sobre a queda da reatividade da CLIC, embora o H₂O₂ tenha sido capaz de indiretamente ativar os canais maxi-K⁺. Outra possibilidade a ser testada seria a alteração no comportamento dos canais de Ca²⁺. Apoio financeiro: Fapesp.

06.056

PRESYNAPTIC ACTIVITY OF TITYUS SERRULATUS SCORPION VENOM IN THE RAT ANOCOCYGEUS MUSCLE. Okuyama, CE; Bixeira, CE; Priviero, FB; De Nucci, G & Antunes, E. Dept. Pharmacol. UNICAMP Campinas/SP

OBJECTIVE: Scorpion venoms cause peripheral nerve stimulation with enhanced autonomic responses. The effects of Tityus serrulatus venom (TSV) on adrenergic, cholinergic and nitrergic fibers have been investigated using the rat anococcygeus muscle (AcM). METHODS: Preparations of AcM were mounted in organ baths and connected to isometric force transducers. Data were recorded in a PowerLab 400 system. RESULTS: Phentolamine (5 μ M), guanethidine (30 μ M) and tetrodotoxin (TTX, 1 μ M) markedly reduced the motor responses induced by TSV (1 μ g/ml) by 90 + 5%, 88 + 5% and 98 + 1%, respectively, whereas imipramine (3 μ M) enhanced these responses (83 + 4% in absence and 111 + 4% in presence of imipramine). Addition of neostigmine (1 μ M) potentiated the TSV-induced contractions by 31 + 8%, whereas atropine (1 μ M) slightly reduced these responses. Hexamethonium (100 μ M) abolished the nicotine-induced contractions (100 μ M) without affecting those elicited by TSV in tissues pretreated with guanethidine and contracted by carbachol (30 μ M), addition of TSV (3 μ g/ml) caused relaxant responses of the AcM, which were blocked by L-NAME (100 μ M; 83 + 5% inhibition), ODQ (1 μ M; 85 + 5% inhibition) and TTX (91 + 3% inhibition). L-Arginine (1 mM) prevented the inhibitory activity of L-NAME. CONCLUSION: These findings indicate that TSV stimulates the release of noradrenaline and nitric oxide from adrenergic and nitrergic fibers in the AcM, respectively, although acetylcholine released from cholinergic nerves may also play a role in the motor responses elicited by the venom. Financial Support: FAPESP.

06.057

PRESENCE OF ENDOTHELIN/SARAFOTOXIN RECEPTOR IN THE AORTA OF THE POISONING BRAZILIAN SNAKE Bothrops jararaca. Patti, L. C.; Proença, K.; Breno, M.C. and Borgheresi, R.A.M.B. Laboratório de Farmacologia, Instituto Butantan.

Introduction: Endothelins (ETs) are a group of active peptides, named endothelin-1, endothelin-2 and endothelin-3 (Y anagisawa et al., Nature 332:411, 1988). Sarafotoxins (SRTXs) are a group of venom peptides toxins, first studied in the snake Atractaspis engaddensis (Kochva et al., Toxicon 20:581, 1982; T akasaki et al., Toxicon 26:543,1988). These peptides are isoforms, with very similar structure and biological activity. They interact with the ET_B receptors, ETA and ETB, to mediate a strong constrictor effect. We reported that the isolated aorta of the Bothrops jararaca (Bj) is very sensitive to SRTX-b (Borgheresi et al., Toxicon 39:1211, 2001), different from the heart of the water snake Matrix tessellata, that was hardly affected by SRTX-b or ET1 (Zigdon-Arad et al.,

Toxicon 30:439,1992). There is no other report on the presence of ET_B receptors in snakes. The aim of the present work was to investigate the functional receptor(s) mediating the contractile response to ET-1 and SRTX-b in the aorta of the poisoning Brazilian snake (Bj). Methods, Results and Discussion: Ring- preparations (4-5 mm) from the intact isolated aorta, were mounted in organ baths (10ml) containing Krebs solution for snakes, at 37°C, bubbled with 95% O₂ and 5% CO₂, under an initial tension of 1g. The isometric tension was recorded by transducer connected through the Biopac MP100WS data acquisition system to a computer. Both ET-1 and SRTX-b, caused in the Bj's aorta comparable concentration-dependent contractile responses: - ET1 (pD₂ 8.93±0.45, and Emax. 2.55± 0.84, n=6); - SRTX-b (pD₂ 8.31±0.26 and Emax. 3.08± 0.89, n=4). The potency of ET1 and SRTX-b to contract the aorta Bj resembles those observed in : - human saphenous vein (Bax et al., Eur J. Pharmacol. 239:267, 1993); - rabbit jugular vein and rat thoracic aorta (Sumner et al., Br.J. Pharmacol. 107: 858, 1992); rat mesenteric artery (Moller et al., Eur .J. Pharmacol. 329:69-1997). We also observed a strong tachyphylact to ET1. In order to avoid this effect, each preparation was used only to the first cumulative curve of the agonist. Conclusion: Our results suggest the presence of functional ET-1/SRTX-b receptor(s) in the aorta of the snake Bj, with a order of potency similar to those observed in mammalian vein and artery by other authors, but different from the one detected in the water snake Matrix tessellata. These receptors will be pharmacologically characterized with the specific antagonists. Financial Support: FAPESP and Fundação Butantan.

06.058

A TOXINA TSTX-I DO VENENO DO ESCORPIÃO TITYUS SERRULATUS ANTAGONIZA SELETIVAMENTE AS AÇÕES PÓS-SINÁPTICAS DA NORADRENALINA EM DUCTO DEFERENTE DE RATO. 1Di Piero, P.; 1,3Freitas, T.A.; 1Fonseca, D.R.; 1Opperman, A.R.; 2Lebrun, I.; 1Conceição, I.M. 1-Lab. de Farmacologia, 2-Lab. de Bioquímica e Biofísica-Instituto Butantan; 3-FacBio-Universidade Metodista de São Paulo- SP - Brasil.

Introdução: A toxina TTX-I é o principal componente do veneno do escorpião Tityus serrulatus. Essa toxina está muito bem caracterizada tanto bioquímica, como eletrofisiologicamente, porém, suas ações farmacológicas ainda não são muito claras. Nosso objetivo foi verificar os efeitos da TTX-I sobre a contração induzida por diferentes agonistas do ducto deferente de rato. Métodos: Foram realizadas 3 curvas dose-resposta consecutivas para o KCl, noradrenalina, tiramina ou ATP. Após a terceira curva os órgãos foram incubados com toxina TTX-I (10 ou 100 nM) e 30 min após uma nova curva é realizada na presença da toxina. O efeito máximo e o pD₂ de cada curva foram calculados para posterior análise dos dados. Resultados: A toxina TTX-I na dose de 10 nM não afetou a contração induzida por qualquer um dos agonistas. Entretanto, a dose de 100

nM promove uma diminuição estatisticamente significativa do efeito máximo das curvas-dose-resposta da noradrenalina e tiramina, sem, porém afetar o pD₂ das duas curvas. Entretanto, nem o efeito máximo, nem o pD₂ das curvas para o KCl ou ATP foram afetados. Conclusão: Esses resultados mostram que a toxina T₁X-I antagoniza as ações pós-sinápticas da noradrenalina, sendo esse, um efeito seletivo para a ativação dos receptores adrenérgicos. Apoio Financeiro: FAPESP, Fundação Butantan, UEMESP

06.059

TOXINA T₁X-I DO VENENO DO ESCORPIÃO TITYUS SERRULATUS: NOVA FERRAMENTA NEUROBIOLÓGICA PARA O ESTUDO DA CO-TRANSMISSÃO NORADRENALINA-ATP EM TERMINAÇÕES NERVOsas SIMPÁTICAS.

1,3Freitas, T.A.; 1Di Pierro, P.; 1Fonseca, D.R.; 1Opperman, A.R.; Oliveira, M.; 2Lebrun, I. 1Conceição, I.M. 1-Lab. de Farmacologia, 2-Lab. de Bioquímica e Biofísica-Instituto Butantan; 3-FacBio-Universidade Metodista de São Paulo- SP - Brasil.

Introdução: Noradrenalina (NA) e ATP são dois co-transmissores nas terminações simpáticas, sendo liberados juntos após estímulos despolarizantes. Em trabalho anterior verificamos que a contração induzida em ducto deferente de rato (DDR) pela toxina T₁X-I é abolida pela desnervação do DDR e por antagonistas purinérgicos, mas, não é afetada por antagonistas adrenérgicos, sugerindo uma liberação exclusiva de ATP pela T₁X-I, sendo. Nosso objetivo foi investigar essa possibilidade através da quantificação de NA e ATP liberados pela toxina T₁X-I a partir das terminações simpáticas do DDR. Métodos: O conteúdo de NA e ATP foram medidos utilizando-se um sistema de HPLC acoplado a um detector eletroquímico. Dois DDRs foram incubados com solução nutritiva contendo ou não T₁X-I. As amostras foram colhidas e então tratadas com ácido perclórico (NA) ou cloroacetil (ATP) e submetidas à análise em HPLC. Resultados: A toxina T₁X-I não foi capaz de promover liberação de NA, ficando os níveis de liberação, quando da incubação da toxina, iguais aos níveis de liberação basal (1,5±0,5 fmol/mg/ml). Com relação à liberação de ATP, a toxina T₁X-I aumentou a liberação de ATP cerca 50 vezes em relação a liberação basal (12,19±1,73 fmol/mg/ml de liberação basal e 569,51±214,95 fmol/mg/ml para os órgãos incubados com T₁X-I). Conclusão: Nossos resultados nos permite concluir a toxina T₁X-I induz liberação exclusiva de ATP no DDR, sendo, ao nosso conhecimento o único composto químico capaz de tal ação. Assim, a toxina T₁X-I pode se constituir em importante ferramenta neurobiológica para o estudo da co-transmissão simpática. Apoio Financeiro: FAPESP, Fundação Butantan, UEMESP

06.060

VENENO DO ESCORPIÃO TITYUS SERRULATUS PROMOVE RELAXAMENTO DO JEJUNO ISOLADO DE RATO. 1,2Louza, G.S.G.; 1,2Oliveira, M.; 1,2Carvalho, R.R.; 1,2Freitas, T.A.; 1Di Pierro, P.; 1Yamanouye N.; 1Conceição, I.M. 1-Lab. de Farmacologia-Instituto Butantan; 2-FacBio-Universidade Metodista de São Paulo - SP - Brasil.

Introdução: Vários trabalhos mostram o efeito espasmogênico do veneno do T. serrulatus (Ts) sobre o trato gastrointestinal (TGI), sendo esse efeito atribuído às neurotoxinas do veneno, as quais provocariam liberação de acetilcolina (Ach). Uma vez que o TGI também é innervado pelo simpático, é provável que o veneno promova liberação dos neurotransmissores (NT) desse sistema (NA e ATP), levando ao relaxamento. Uma vez que a literatura carece de dados enfocando essa ação, nosso objetivo foi verificar uma possível liberação de NT simpáticos no jejuno isolado de rato induzida pelo veneno bruto do Ts e sua influência na contratilidade do órgão.

Métodos: Utilizamos ratos machos, normais ou reserpinizados (2 mg/kg). Realizamos curvas tempo-resposta para o relaxamento (CR) ou contração (CC) induzidas por 0,6 mg/ml de veneno. Nas CRs os órgãos foram pré-contraindo por 0,3 microM de Ach. Nos ratos normais, 30 min antes das CCs, os órgãos foram incubados ou não com suramina (0,1 mM - SUR), propranolol (3 microM - PRO) ou atropina (1 microM - ATR). Com exceção da ATR, o mesmo procedimento foi adotado para as CRs. Os efeitos do veneno foram registrados por 15 min. Resultados: A contração induzida pelo veneno foi antagonizada por ATR e SUR, sendo potenciada pela reserpinização e pelo PRO. Nos órgãos pré-contraindo com Ach o veneno promoveu relaxamento o qual foi abolido pela reserpinização. A SUR promoveu uma lentificação da CR e o PRO antagonizou o relaxamento somente após o 1o. min. Conclusão: Os dados obtidos indicam que o veneno do Ts promove, no JIR, liberação de NT tanto do parassimpático como do simpático, podendo se tornar importante ferramenta para o estudo da contribuição desses dois sistemas para a funcionalidade dos órgãos do TGI. Apoio Financeiro: FAPESP, Fundação Butantan, UEMESP

06.061

INHIBITORY EFFECT OF Crotalus durissus terrificus SNAKE VENOM (CdtV) OF MACROPHAGE PHAGOCYTOSIS. CONTRIBUTION OF CROTOXIN. Sampaio, SC*; Brigatte, P*; Santos, ACR.&; Santos, EC.&; Cury* *Laboratory of Pathophysiology and Sousa e Silva, MCC*; Curi, R & Institute of Biomedical Sciences/USP/Dep. of Immunopathology; Butantan Institute, Brazil

Previous work from our laboratory has shown that, in addition to the opioid-mediated analgesic effect, CdtV inhibits phagocytic function of macrophages. The present work investigated: (a) the mechanisms responsible for the inhibitory effect of CdtV, and (b) the involvement of crotoxin (CTX), the main toxin of CdtV, in this effect. The CdtV administered by sc route (30µg) to male Wistar rats or incubated with rat peritoneal resident macrophages inhibited phagocytosis of opsonized zymosan by these cells. The percentage of inhibition in the in vivo experiments was 46% and in the in vitro assays was: 0,25µg/ml-41%, 0,5µg/ml-44% and 1,0µg/ml-44%. Naloxone (1mg/kg) did not modified the inhibitory effect of CdtV. On the other hand, neutralization of CdtV by specific antivenin blocked venom effect. Crotoxin, (19µg, sc) also inhibited (46%) the phagocytic activity of macrophages. This was a long lasting effect since it persisted for 14 days after CdtV administration. The inhibitory effect was also

observed in vitro for CTX incubated (0,3; 0,016; 0,008 0,004µg/ml) with macrophages (30%; 33%; 47%; 53% of inhibition, respectively). The venom or CTX effect was not a consequence of a toxic effect, since FACS analysis did not show alterations of cell viability. These data suggest that the inhibitory effect of CdtV is not mediated by its opioid effect and demonstrate that CTX is involved with these inhibitory response. Financial support: FAPESP, CNPq

06.062

ALTERNAGIN-C, A NEW PROTEIN WITH D/ECD DISINTEGRIN DOMAIN ISOLATED FROM BOTHROPS ALTERNATUS, INDUCES HUMAN NEUTROPHILS CHEMOTAXIS BY ACTIVATION OF INTEGRIN-MEDIATED SIGNALING PATHWAYS. Mariano-Oliveira A, Coelho ALJ, Selistred-Araujo HS, Barja-Fidalgo C. & De Freitas MS Depto. Ciências Fisiológicas, Universidade Federal de São Carlos & Dept. Farmacologia, IBRAG, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

Disintegrins inhibit integrin-related functions like adhesion tumor cell metastasis, angiogenesis, and platelet aggregation. This work shows the effects of alternagin-C (Alt-C), a protein with D/ECD disintegrin domain purified from B. alternatus venom on human neutrophils (PMN) chemotaxis, assayed in Boyden chambers, and on the activation of integrin-mediated signaling pathways, analysed by immunoprecipitation and Western blotting. Alt-C (0.001-1 mM) showed a potent chemotactic effect for PMN. This same effect was observed when PMN were incubated with a peptide containing an ECD sequence (0.1-5 mM). Moreover, incubation of PMN with Alt-C induced heterologous inhibition of chemotaxis against fMLP. The activation of focal adhesion kinase (FAK) in PMN treated with Alt-C was determined by the increase in its content of phosphotyrosine. Alt-C significantly increased the FAK phosphorylation. In addition, Alt-C was able to induce an association between FAK and phosphoinositide 3-kinase (PI3K), an important molecule involved in the leukocyte migration. The adhesion complex formation was accompanied by actin cytoskeleton rearrangement. The results also demonstrated an activation of Ras-Raf-MAP kinase pathway followed by ERK-2 nuclear translocation. These data suggest that Alt-C is able to activate human PMN, triggering intracellular signals characteristic of integrin-activation pathways. Financial support: CAPES, CNPq, FAPERJ, IFS, SR2-UERJ.

06.063

DISINTEGRINS, ISOLATED FROM SNAKE VENOM, ALTER HUMAN LYMPHOCYTES PROLIFERATION BY ACTIVATION OF INTEGRIN-MEDIATED SIGNALING PATHWAYS. Helal-Neto E., Coelho A.L., Marcinkiewicz C.*, Barja-Fidalgo C. and De Freitas M.S. Dept. Farmacologia/IB, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil; *Dept. Pharmacology, Temple University, Philadelphia, PA, USA

Disintegrins, proteins isolated from snake venom, inhibit integrin-related functions like adhesion tumor cell metastasis, angiogenesis and platelet

aggregation through their RGD motif. This work shows the effects of monomeric disintegrins, flavivirin (Fl, 1 microM), kistrina (Kr, 1 microM) and echistatin (Echis, 1 microM) presenting RGD sequence, on human lymphocyte proliferation and on the activation of integrin-mediated signaling pathways. These cellular responses were related to RGD sequence by using a synthetic peptide RGD (250 microM), which is demonstrated to induce lymphocyte apoptosis. The lymphoproliferative state was measured by [³H] thymidine incorporation after 3 days of incubation. Only Echis showed different effects on lymphocyte proliferation in vitro, while Fl and Kr did not influenced this cellular response as well as observed with RGD tripeptide. When lymphoproliferative assays were performed in the presence of Concanavalin A (Con A), a potent mitogenic agent, Fl and Echis were able to change the Con A stimulus. However, Kr induced no changes. In addition, RGD peptide inhibited the proliferation. These results suggest a possible involvement of tyrosin kinase pathways mediated by integrin activation. Accordingly incubation of lymphocyte with disintegrins induced different alterations on tyrosine phosphorylation profiles, specifically on ERK-2 activation, as determined by Western blotting using anti-phosphotyrosine antibody. These data suggest that Fl, Kr and Echis directly activate integrin-coupled signaling in lymphocytes by interfering with cellular proliferation events. Financial support: FAPERJ, CNPq, IFS, SR2-UERJ.

06.064

AUMENTOS DE [Ca]²⁺ INDUZIDOS PELA PROGESTERONA E ARAGNOTOXINA EM ESPERMATOZOÍDES HUMANOS.

*Fernando Romero, **Raul Sanchez, *** Alice Teixeira Ferreira E ***Maria Etsuko Miyamoto Oshiro. *Depto Ciências Preclínicas, Fisiologia-Faculdade De Medicina, UFRO, Chile **Cebior/Faculdade De Medicina, UFRO, Chile ***Depto De Biofísica, Unifesp, SP/Brasil

A progesterona atua nos receptores de superfície localizados na cabeça dos espermatozoides e uma fração destes responde à progesterona, aumentando a concentração citosólica de Ca²⁺ ([Ca]²⁺). Na literatura, não se tem descrito efeitos sobre a sinalização de Ca induzida pela aragnotoxina (Atx), extraída do veneno da aranha chilena *Latrodectus mactans*. O objetivo foi determinar em espermatozoides humanos não capacitados a expressão dos receptores de progesterona bem como estimular com o extrato bruto da Atx e determinar as variações de [Ca]²⁺, utilizando-se fura2 (2 μM). Os espermatozoides de pacientes adultos e férteis (n=8) extraídos pela técnica "swin up", em meio BWW (Aiten, in: Male Infertility, ed. T.B. Hargreave, 75-86, Springer Verlag, Berlin, 1983), foram suspensos, em pH 7,4, à temperatura ambiente e após 2 h de carregamento, centrifugados a 2000rpm por 5 min e as células resuspensas em BWW A [Ca]²⁺ foi determinada antes e após estimulação com progesterona ou Atx (76 μg/ml). Os espermatozoides não capacitados, apresentaram níveis basais de Ca ao redor de 115 nM e a estimulação com progesterona, induziu uma resposta bifásica, sendo uma elevação inicial, transiente seguida de um componente lento. Na presença de 20 μM de proges-

terona se observou incremento na [Ca]²⁺ de 28% enquanto Atx 76 μg/ml aumentou de modo sustentado a [Ca]²⁺, de 44% com relação ao basal, quando adicionado previamente à progesterona. A adição de Atx posteriormente à progesterona não induziu efeito adicional. O efeito da progesterona, foi consequência da ativação de receptores P4, expressos nas membranas destes espermatozoides e os aumentos das [Ca]²⁺ induzidos pela progesterona e Atx, decorrem de influxos de Ca e/ou liberações de Ca intracelulares dos mesmos sítios de liberação DIUFRO 20242, Fondecyt 1010729

06.065

ANÁLISE DA POPULAÇÃO DE MASTÓCITOS DA LÍNGUA DE RATO DURANTE E APÓS SIMPATECTOMIA QUÍMICA POR SULFATO DE GUANETIDINA.

*Cunha, A. L. C.; *Mori, J. E.; *Stabile, A. C.; *Rosa e Silva, A. A.; *Lunardi, L. O. *MEF-FORP-USP, FMRP-USP - São Paulo.

Objetivos Verificamos a potencialidade do sulfato de guanetidina (fármaco que produz uma simpatectomia química após tratamento crônico) para estudos que envolvem mastócitos e inervação simpática. Métodos e Resultados Utilizamos ratos machos variedade Wistar, que sofreram simpatectomia química após tratamento crônico de sulfato de guanetidina (50mg/Kg). Cortes seriados de língua coletados a cada 25m foram quantificados. A análise histológica da língua mostrou uma desgranulação de 90% desde a primeira semana de tratamento até o fim da sexta semana. Terminadas 8 semanas após suspensão do tratamento, o número de mastócitos intactos aumentou para 69%. Conclusão Nossos resultados sugerem que a alteração na população de mastócitos observada não seja efeito da desnervação simpática produzida, mas sim resultado de uma ação direta do sulfato de guanetidina estimulando os mastócitos do conjuntivo a secretarem seus grânulos. *CNPq-PIBIC

06.066

ESTUDO COMPARATIVO DA SIMPATECTOMIA QUÍMICA PRODUZIDA POR SULFATO DE GUANETIDINA EM RATOS E COBAIAS MACHOS.

Stabile, A.C. (1)*, Galo, R. (1), Lunardi, L.O. (1), Rosa e Silva, A.A. (2), Gomes, J. C. (3), 1 -FORP-USP, 2 - FMRP-USP - IB - Botucatu - UNESP

Objetivos: A resposta aos estímulos variam entre as diferentes espécies. No presente estudo analisamos o efeito do sulfato de guanetidina, em ratos e cobaias, relacionando liberação de histamina e inervação simpática. Métodos e Resultados: Utilizamos cobaias *Cavia porcellus* e ratos *Wistars* machos, que receberam injeções intraperitoneais de sulfato de guanetidina (50mg/Kg) por 6 semanas. A cadeia ganglionar foi analisada histologicamente e a histamina do mesentério de ambos animais foi quantificada por espectrofluorimetria. Nos ratos os gânglios sofreram lesões graves e o mesentério teve 83% de histamina liberada. Nas cobaias não foi observada alteração morfológica no gânglio e não houve liberação de histamina do mesentério. Conclusão Nossos resultados mostram que o sulfato de guaneti-

dina não promove simpatectomia nas cobaias. Uma ação liberadora de histamina foi observada também apenas em ratos. A existência de uma correlação entre a simpatectomia e a liberação de histamina precisa ser melhor investigada. Apoio Financeiro: FAPESP

06.067

EXPRESSION OF c-KIT RECEPTOR IN RAT TESTIS AND THE EFFECT OF EXPERIMENTAL VARICOCELE

Riado, S.R., Avelar M.C.W., Porto, C.S., Section of Experimental Endocrinology, Department of Pharmacology UNIFESP-EPM, SP/Brazil.

Introduction: Varicocele, abnormal dilatation of spermatic vein, is a common pathologic finding in human males with clinical complaint of infertility. Nevertheless, the responses of the several testicular cell populations to varicocele have not been fully resolved (Turner, TT & Miller, DW, J. Urol. 156:1881, 1996). The c-kit receptor expressed on spermatogonia and its ligand, stem cell factor, produced by Sertoli cells are essential for spermatogonia proliferation and/or differentiation (Yoshinaga, K et al., Development 1 13: 689, 1991; Rossi, P et al., J. Endocrinol. Invest. 23: 609, 2000). Thus, the purpose of the present study was to evaluate the effect of experimental varicocele on c-kit receptor expression in rat testis.

Methods: Male Wistar rats (40-day-old) were divided into 2 groups: control (sham-operated) and experimental left varicocele (EM). The varicocele was induced by partial left renal vein ligation, leaving the diameter reduced of approximately 50%. This procedure increased intravenous pressure lateral to the ligation and caused a significant increase in left spermatic vein diameter 30 days after surgery. The rat body weight, testis and accessory organs weights were determined. Western blotting studies were performed using total cell lysate of the testis and polyclonal antibody anti-c-kit receptor.

Results: Left spermatic vein diameters, measured under direct observation through a dissecting microscope, were approximately 0.2mm in animals prior to ELV surgery and were significantly increased to 1.00mm in animals 30 days after surgery, graded as marked dilatation (severe varicocele). The success rate for induction of experimental severe varicocele was about 20% of total animals. Varicocele did not induce changes in testis, epididymis, ventral prostate and seminal vesicle weights when compared to control animals. The c-kit polyclonal antibody reacted with two protein of approximately 145 kDa and 130 kDa in testis from control and EM rats. The reaction was blocked when the antibody was preabsorbed with the blocking peptide. Quantitative analysis of two bands by densitometry revealed that the level of 145 kDa protein was reduced 10% in testis from EM rats.

Conclusion: These data suggest that the expression of the c-kit receptor is modulated by varicocele. Further studies are necessary to determine the stem cell factor expression in testis and the biological significance of stem cell factor/c-kit receptor complex in the impairment of spermatogenesis in varicocele.

Financial support: FAPESP (00/05309-0), CNPq and FADA.

06.068

CHARACTERIZATION OF ANTIMICROBIAL EP2/HE2 GENE TRANSCRIPTS IN BOVINE EPIDIDYMISS. Gouvêa, I.E., Avellar, M.C.W., Section of Experimental Endocrinology, Department of Pharmacology UNIFESP, São Paulo, Brasil.

Introduction and aim: In primate (human, chimpanzee and Rhesus monkey) and in rat epididymis, EP2/HE2 gene is transcribed into several message variants, generated by alternative splicing, encoding secreted peptides. EP2/HE2 gene is abundantly expressed in the proximal regions of the epididymis. It has been shown that EP2/HE2 gene is derived from two ancestral beta-defensin genes, a family of genes encoding small secreted peptides with antibacterial activities.

Thus, EP2/HE2 gene appears to code for natural epididymal-specific antimicrobial peptides that play a role in reproductive tract host defense and male fertility (Frohlich O., Biol. Reprod. 64: 1072, 2001). Seminal vesiculitis is the most common inflammatory condition in young peripubertal and older bulls, affecting negatively semen quality (Cavaliere J., Vet. Clin. Noth. Am. Food. Anim. Pract. 13: 233, 1997). The aim of this work is to study the expression of EP2/HE2 transcripts in bovine epididymis.

Methods: Caput epididymis was isolated from Bovine (*Bos taurus x Bos indicus*) Total RNA was isolated using Trizol. RNA (5ug) was reverse transcribed with oligo-dT primer. Polymerase chain reactions (PCR) was then analysed using different pairs of forward and reverse primers based on similar sequences among EP2/HE2 variants known from human, chimpanzee and rat epididymis studies. DNA products were confirmed by direct nucleotide sequencing performed with an automated sequencer. Results were analysed by BLAST searches to scan EP2/HE2 gene similarities.

Results and Discussion: One EP2/HE2 transcript variant was amplified by PCR from bovine caput epididymis total RNA. When compared to the original mRNA sequence, the DNA product corresponded to nt 217-835 of the EP2/HE2-L variant (total size 890 bp). This result suggest that EP2/HE2 gene is expressed in bovine epididymis and contributes to the study of this gene family in the male reproductive tract. Financial Support: FAPESP, CNPq, T.W. Fogarty International.

06.069

CHANGES IN ACETYLCHOLINESTERASE ACTIVITY IN THE RAT CAUDA EPIDIDYMISS DURING SEXUAL MATURATION. A.M.Silva, D.B.C.Queiróz, R.O.Godinho, C.S.Porto, G.Gutiérrez-Ospina, M.C.W.Avellar, Department of Pharmacology UNIFESP, São Paulo, Brasil; Department of Cell Biology, UNAM, Mexico City, Mexico.

Introduction and aim: The epididymis, an organ responsible for maturation, storage and transport of spermatozoa, is anatomically divided into caput, corpus and cauda regions. Recent data from our laboratory have shown that in cauda, but not in caput epididymis, a catecholaminergic nerve refinement occurs with rat sexual maturation

(Queiróz D.B.C., Anais XVI Reunião da FESBE pg. 345, 2001). In the present work, we conducted further biochemical and immunohistochemical studies to detect if changes in rat epididymal innervation are specific to the catecholaminergic system during the sexual maturation. Methods: Caput (CP) and cauda (CA) epididymis from 40- (immature), 60- (young adult) and 120-day (adult) old Wistar rats were used. Acetylcholinesterase (AChE) activity was detected by radiometric procedure and expressed as arbitrary units (A.U.). Immunohistochemical studies (cryostat sections, 8µm) were performed using AChE and microtubule-associated protein 1B (MAP 1B, a neuronal cytoskeletal marker) antibodies. Results: Qualitative observations showed that the number of AChE-positive fibers, neurons and puncta was higher in the CA than in the CP in all ages. Although there was no variation in the number of AChE-positive elements in the CP region with age, AChE-positive elements decreased with sexual maturation in CA region. MAP 1B immunohistochemical studies further supported these observations. Radiometric studies confirmed that total AChE activity did not change significantly with age in CP region (0.59 ± 0.05 , 1.04 ± 0.08 and 0.57 ± 0.03 A.U./mg tissue for 40, 60 and 120 days old, respectively, N=6), but decreased progressively with age in CA epididymis (6.74 ± 0.71 , 3.22 ± 0.24 and 1.51 ± 0.11 A.U./mg tissue for 40-, 60- and 120- day old, respectively, N=6).

Discussion: The results indicate that, besides changes in catecholaminergic innervation, AChE-positive nerve refinement also occurs in the CA epididymis with advance of sexual maturation. Financial Support: FAPESP, CNPq, CONACYT

06.070

Na⁺/K⁺-ATPase ALPHA1 AND ALPHA2 ISOFORMS AND L-TYPE Ca²⁺ CHANNELS EXPRESSION SEEM NOT TO BE MODULATED BY EXOGENOUS NORADRENALINE OR ATP IN CULTURED RAT VAS DEFERENS. Quintas, L.E.M., Lafayette, S.S.L., Caricati-Neto, A., Jurkiewicz, A., 1Noêl, F. Depto. Farmacologia Básica e Clínica, ICB/UFRJ, Rio de Janeiro, 2Depto Farmacologia, EPM/UNIFESP, São Paulo

Introduction: Surgical denervation of rat vas deferens (RVD), which produces adaptive supersensitivity, down-regulates either alpha2 (but not alpha1) Na⁺/K⁺-ATPase isoform (Quintas et al., Biochem. Pharmacol., 60:741, 2000) and L-type Ca²⁺ channels (VDCC) expression (Jurkiewicz et al., Eur. J. Pharmacol., 256:329, 1994). Furthermore, RVD cultured for 3 days also exhibits such molecular effect. We wish to investigate if NA or ATP, two sympathetic cotransmitters, may influence the behavior of these membrane-bound proteins. Methods and Results: Whole organs (Wistar RVD) were cultured for 3 days in Dulbecco's modified Eagle's medium without (DMEM group) or with 1 microM NA (DMEM+NA) or 5 microM ATP (DMEM+ATP). Concentration-response curves to NA characterized a significant development of supersensitivity for D but not for the other two groups. Nevertheless, Western blot (2 groups of DMEM and of DMEM+NA and 1 group of DMEM+ATP, 4 RVD each) revealed that the density of alpha2 was

extremely reduced compared to non-cultured organs, but that of alpha1 was not altered. Similarly, using [³H]isradipine binding technique, the number of VDCC sites in all experimental groups was 4-5 times lower than in non-cultured RVD. Discussion: NA and ATP come out to be essential for RVD sensitivity but, in contrast, these agents may not affect Na⁺/K⁺-ATPase and VDCC expression in vitro. Apparently, the mechanism of supersensitivity in cultured RVD is not dependent on such transmitters, and the same might be true for the in vivo situation. Financial Support: FAPESP, CNPq, APERJ

06.071

EXPRESSION OF MICROTUBULE-ASSOCIATED PROTEIN 1B (MAP 1B) IN RAT EPIDIDYMISS. D.B.C.Queiróz, A.M.Silva, C.S.Porto, G.Gutiérrez-Ospina, M.C.W.Avellar, Section of Experimental Endocrinology, Department of Pharmacology, UNIFESP, São Paulo, Brasil; Department of Cell Biology, UNAM, Mexico City, Mexico.

Introduction and aim: The epididymis, an organ responsible for the maturation, storage and transport of spermatozoa, is anatomically divided into caput, corpus and cauda regions, distinguished by their morphology and for region-specific gene expression and protein synthesis (Bomgardner D, J Androl 22: 527, 2001). The innervation of epididymis includes adrenergic, cholinergic and non-adrenergic non-cholinergic systems, important for the regulation of sperm transport. The density of these nerves is higher in cauda than in caput region (Ricker DD, J Androl 18:131,1988; Silva AM, J Androl 23:00,2002). Our aim was to characterize the expression of MAP 1B, a neuronal cytoskeletal marker (Schoenfeld T A, Neurosci 9:1712,1989), in efferent ducts and along epididymis from rats in different ages.

Methods: Caput and cauda epididymis from 40- (immature), 60- (young adults) and 120-day old (adult) Wistar rats were used in immunohistochemical studies (cryostat sections, 8 µm). MAP 1B, acetylcholinesterase (AChE) and dopaminergic hydroxylase (DβH) antibodies were used.

Results: Positive MAP 1B-epithelial cells, with their nuclei displaced toward the tubular lumen, were located only in efferent ducts and initial segment from adult rats. A second type of MAP 1B-positive cell was identified underneath the epithelial lining only in the efferent ducts and initial segment from adult rats. These two populations of MAP 1B-positive cells increased in number with progression of sexual maturation. They were not stained against DβH or AChE and not observed in caput or cauda region. In caput and cauda region, nerve fibers, puncta and neuronal somata were positively labeled against MAP 1B antibody. Most of these neuronal elements were stained by DβH or AChE. In the cauda region, MAP 1B-positive cells with few processes outgrowing from the pyramidal-shaped soma were also identified. These cells were not stained against DβH or AChE antibodies.

Discussion: The different populations of MAP 1B positive cells in rat proximal epididymal regions, known by the lack of innervation, may suggest their involvement in the neuronal control of the epididymal functions. Support: FAPESP, CNPq, CONACYT

06.072

RADIOPROTECTION BY alpha-TOCOPHEROL IN MICE CULTURED ILEUM SMOOTH MUSCLE CELLS EXPOSED TO GAMMA RADIATION.

MORAES, A.A.S.; França, J.P. Paredes-Gamero, E.J.; Segreto, H.R.C.; Oshiro, M.E.M.; Pacheco, A.S.; Segreto, R.A.; Andrade, E.S.; Pedrosa, M.Z.; Nader, H.B. and. Ferreira, A.T. Biophysics; Biochemistry and Medicine. UNIFESP/EPM.

It has been described that alpha-tocopherol (VitE) protects the cells against injuries promoted by gamma radiation (Rg). The objectives of this work was to analyse morphological and biochemical alterations in cultured longitudinal smooth muscle cells (LSMC) and radioprotection (RP) effect of LSMC by VitE after Rg. LSMC were pretreated with VitE (10mg/ml for days) and submitted with doses of 10 Gy with a telecobalt therapy source (1,25 Gy/min). Monolayers of cells were fixed in 2% formaldehyde and stained with secondary antibodies Alexa Fluor conjugated to green and red-fluorescent to identify: vinculin, actin F-BAX and cytochrome C. The nuclei was stained with DAPI. The images are a composition of three micrograph acquired using filter sets appropriated for blue, green and red fluorescence on a Zeiss confocal microscope (LSM 510). Morphological analysis, using the labeled vinculin and stained actin F, shows that Rg induces modifications in cytoskeleton through the formation of blebs and the VitE alters the cellular metabolism increasing the protein synthesis (increase of vinculin) and the cell proliferation. There are the participation of pro apoptotic proteins BAX and cytochrome C in the process of cellular death. After 4h of radiation, most cells manifest a phenotype where the mitochondrial cytochrome c is relocalized in the cytosol and BAX in the mitochondria. The morphological analysis indicated that the Rg caused cellular death, by apoptosis, confirmed by modifications in cytoskeleton and changes in the cellular membrane and participation of pro apoptotic proteins BAX and cytochrome C. The VitE was proved to be a good RP for irradiated LSMC and this VitE promoted increase of the synthesis of proteins and proliferation in LSMC. Supported by FAPESP and CNPQ.

06.073

EFFECTS OF ALPHA-TOCOPHEROL IN MICE ILEUM EXPOSED TO GAMMA RADIATION.

Pinhal Jr, P.; França, J.P.; Moraes, A. A.F.S.; Segreto, Paredes-Gamero, E.J. H.R.C.; Oshiro, M.E.M.; Dinardo, M.C.L.; Segreto, R.A.; Silva, M.R.R, Egami, M.I., Pedrosa, M.Z.; Miranda, A. and Ferreira, A.T. Biophysics; Medicine; Morphology and Pathology Anatomy UNIFESP

To analyze the effects of gamma-radiation (Rg) and the radioprotection (RP) by alpha-tocopherol (VitE) in ileum of mice (IM), was estimated: a) the morphological alterations of the cells; b) the contractile response to Carbachol (CCh); c) alterations in the lipidic bilayer by formation of compounds that react with thiobarbituric acid (TBARS) in consequence action of the reactive species of oxygen (ROS). Methods/Results: Mice (C57BL/10) were subdivided into groups: GC (Control), GI (Irradiated with doses of 10Gy), GC-II

(Control+VitE), and GI-II (irradiated+VitE). GC-II and GI-II were treated intraperitoneally with VitE (40mg/kg)/14days. In electron microscopy in IM, specially in the cripts and vilosities, due to their higher radiosensitivity had presented the classical figures of apoptosis. By use of light microscopy the cells when irradiated, they showed a reduction on the population of cells it was counted the number of apoptotic cells in the peak, in the group GI X GC, was 700% and GI X GI-II was 350%, in 4h after irradiation. It was observed that the VitE promoted increase cellular proliferation, occur increase of TBARS and MDA: higher for the group GI(34%) X GC, between the groups GC e GI-II, there was no significantly difference. The maximal contractile response to CCh was higher to GI-II group (100%) and low to GC-II (25%) in relation to GC group. Conclusions: The Rg promoted alterations in the membrane and cellular death was dependent on: the radiosensitivity, time and mechanisms of RP of VitE. The VitE was proved to be a good radioprotector for cells of IM but promoted increase cellular proliferation and alteration contractile response. Supported by F APESP and CNPQ.

06.074

REVISÃO DA CARACTERIZAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DO CARCINOSSARCOMA DE WALKER DO LABORATÓRIO DE ONCOLOGIA EXPERIMENTAL (LOE).

Alves, A.P.N.N.(1); Ferreira, F.V.A.(2); Pessoa, C.(3); Macêdo, P.(3); Moraes, M.E.(3), Oliveira, R.(3); Cardoso, R. (3); Lotufo, L. V., (3), Moraes, M.O. (3) - Departamento de Farmacologia e Fisiologia. Universidade Federal do Ceará. - 1- Depto de Clínica Odontológica 2- Depto de Patologia e Medicina Legal 3- Depto de Farmacologia e Fisiologia

Introdução: O Carcinossarcoma de Walker é um tumor transplantável, muito utilizado na pesquisa experimental do câncer. Foi descrito pela primeira vez em 1928 como uma neoplasia espontânea de glândula mamária de uma rata albina prenha, sendo caracterizada como um adenocarcinoma. Desde 1935 este tumor tem sofrido ao longo dos anos sucessivos transplantes, apresentando variações morfológicas, em diferentes situações (Ordóñez, N.G. Advances in Anatomic, vol5, p67-85, 1998). Foram determinadas três variantes tumorais baseadas nos tipos celulares presentes: carcinoma, sarcoma e carcinossarcoma. O estudo patológico sistemático deste tumor é escasso, principalmente quando comparado ao número de trabalhos desenvolvidos com o mesmo na área de oncologia experimental. Objetivo: Este trabalho tem como objetivo verificar a atual tipificação do Tumor de Walker do LOE o qual é largamente utilizado em trabalhos científicos e vem sofrendo inúmeros transplantes.

Método e Resultado: Foi utilizado a microscopia óptica associada às técnicas de imunohistoquímica para a sua caracterização. Foram utilizados, inicialmente, os marcadores para citoqueratina (AE1 / AE2), vimentina e CD45.

O tumor de Walker / LOE não apresentou células imunomarcadas para citoqueratina, a qual constitui o principal componente do citoesqueleto das células epiteliais. Por outro lado visualizou-se intensa marcação para vimentina, filamento encontrado nas células mesenquimais e neoplasmas derivados do mesênquima, em todos os casos analisados. Conclusão: O Carcinossarcoma Walker 256 / LOE sofreu variação morfológica para a variante Sarcomatosa do Walker 256. Estudos estão em andamento na bateria de imunomarcadores com citoqueratina.

06.075

ESTUDO DA ATIVIDADE DE DROGAS ANTINEOPLÁSICAS SOBRE O DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO DO OURIÇO DO MAR.

Wilke, D., Souza, M.D; Jimenez, R.; Pessoa, C.; Moraes, M.E.A.; Moraes, M.O.; Costa-Lotufo, L. Laboratório de Oncologia Experimental, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará.

Introdução: O ensaio do desenvolvimento embrionário de ouriços do mar é amplamente utilizado no estudo de novas drogas com potencial antitumoral. No presente trabalho, avaliou-se a citotoxicidade de 4 quimioterápicos (Etoposide, Doxorubicina, Taxol e Vmblastina) no desenvolvimento embrionários de ovos de ouriço do mar Métodos e Resultados: Os quimioterápicos (0,1 a 100 microM) foram adicionados aos ovos do ouriço do mar Lytechinus variegatus 5 minutos após a fecundação, e o desenvolvimento embrionário foi acompanhado até o estágio de blástula através de microscopia óptica. Com o objetivo de comparar a sensibilidade deste método com um método já estabelecido para teste de drogas antitumorais, avaliamos a citotoxicidade dos quimioterápicos (0,1 a 10 microM) em quatro linhagens de células tumorais (HL-60, CEM, HCT-8 e melanoma B-16) através do método do MTT. Todos os compostos foram ativos nos dois métodos utilizados. No método do MTT, os quimioterápicos inibiram completamente a proliferação das células das linhagens CEM, HL-60 e Melanoma já na concentração de 1 microM, enquanto que a linhagem HCT-8 mostrou-se mais resistente (inibição em torno de 60 % na mesma concentração de droga). Já no método do ouriço, a inibição total da primeira clivagem ocorreu na concentração de 100 microM para etoposide e doxorubicina, e 0,3 microM para o taxol e vimbastina.

Conclusão: Com base nesses resultados, conclui-se que o método do ouriço apresenta uma sensibilidade menor que o MTT, no entanto, é efetivo para detectar atividade antimetabólica de agentes com diferentes mecanismos de ação: inibidores de síntese de DNA, RNA e proteína, bem como de inibidores da polimerização/despolimerização de microtúbulos, sendo mais sensível a drogas que atuam no fuso mitótico, como por exemplo, taxol e vimbastina.

Apoio financeiro: Inst. Claude Bernard e FUNCAP

06.076

EFEITO ANTIPROLIFERATIVO DE EXTRATOS DE INVERTEBRADOS MARINHOS EM CÉLU-

LAS TUMORAIS. 1Cavalcanti,B.C.; 1Fortier,S.C.; 2Batista, T.; 2Berlinck,R.G.S.; Moraes1M.O.; 1Moraes,ME.; 1Pessoa,C. - 1Laboratório de Oncologia Experimental, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará; 2Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, Caixa Postal 780, CEP 13560-970, São Carlos, SP

Introdução: A importância da identificação de novos princípios ativos que inibam a proliferação celular por meio da exploração racional de recursos marinhos torna-se evidente diante da perspectiva de sua aplicação terapêutica.

Objetivos: O presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos antiproliferativos de 48 extratos obtidos de invertebrados marinhos em duas linhagens de células tumorais humanas: MCF-7 (mama), HCT-8 (cólon) e uma linhagem murina: Melanoma B16 (pele).

Métodos e Resultados: Os extratos metanólicos de diferentes espécies de esponjas marinhas e ascídias foram analisados no pre-screening inicial para avaliação do potencial de inibição celular através do método da sulforodamina, SRB. Durante o pre-screening as células foram incubadas com as diferentes frações por 48h, a 37°C e 5% de CO₂. O percentual de crescimento celular (G%) foi calculado comparando a absorbância do teste com o controle (100%), tempo-zero (0%) e padrões, paclitaxel e etoposide, (-100%). Das 48 amostras, 29 apresentaram percentagem de crescimento celular menor ou igual a 10%, em uma única concentração (100ug/mL). Sendo que duas dessas (SS97-16 e

SS97-34) foram inespecíficas nas linhagens testadas. A amostra SS97-16 corresponde ao extrato bruto da ascídia *Cystodytes dellechiaiei*, a partir do qual foram recentemente isolados 2 novos alcalóides piridoacridínicos, as sebastianinas A e B, que apresentaram atividade citotóxica contra células HCT-116 com mecanismo dependente de p53 (Torres et al., no prelo).

Conclusão: Estes dados reforçam a importância da pesquisa de produtos naturais marinhos na busca de novas drogas, dando início aos estudos de bioprospecção.

Apoio financeiro: FAPESP, Instituto Claude Bernard, FUNCAP

06.077

TAK-778 ENHANCES OSTEOGENESIS INDUCED BY HUMAN BONE MARROW CELL CULTURE.

Beloti, M.M.*; Rosa, A.L. Department of Surgery FORP, University of Sao Paulo, Brazil. e-mail: adalrosa@forp.usp.br

Introduction: TAK-778 has been shown to induce bone growth in vitro and in vivo models. However, until the present time there are no studies evaluating the effect of TAK-778 on human bone cells. Thus, the aim of this study was to investigate the effect of TAK-778 on osteogenesis induced by human bone marrow cells. **Methods:** Cells were cultured in 24-well culture plates (2x10⁴ cells/well) in culture medium containing TAK-778 (10⁻⁷, 10⁻⁶, and 10⁻⁵ M, each) or vehicle. During the culture period, cells were incubated at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ and 95% air. After 7, 14, and 21 days, cell prolifer-

ation was evaluated by counting the number of cells using a hemacytometer, total protein content was measured according to the Lowry method, alkaline phosphatase (ALP) activity was measured using a commercial kit, and bone-like formation was evaluated by measuring the percentage of total area stained by alizarin red using an image analyser. Data were compared by ANOVA and Duncan's test. **Results:** Cell proliferation was reduced while, total protein content, ALP activity, and bone-like formation were increased by TAK-778 in a dose-dependent way. **Discussion:** These results show that TAK-778 enhances both the osteoblastic differentiation and bone-like formation in human bone marrow cells. It means that TAK-778 could be a useful drug to enhance new bone formation in clinical situations that require rapid restoration of physiologic function, such as orthopedic and maxillofacial surgery. **Acknowledgments:** FAPESP and CNPq for financial support, and Takeda Chemical Industries for TAK-778 supplied.

06.078

INTRACELLULAR MECHANISM INVOLVED IN THE INTERACTION OF DISINTEGRINS WITH MELANOMA CELLS. Molinaro RC, Bittencourt RQ, Coelho ALJ, Zingali R, Barja-Fidalgo C, De Freitas MS - DFP/IB, UERJ; Depto. Bioquímica Médica, UFRJ, Brazil.

INTRODUCTION: Disintegrins are potent competitive antagonists of integrin-dependent cell adhesive functions. Angiogenesis and metastasis are events dependent on specific binding of integrins to extracellular matrix (ECM). In this study we investigated the effects of three monomeric RGD-disintegrins Kistrin (KR α v), Flavoridin (FL α 5 β av) and Jarastatin (JT α v β 5 β av) on cellular proliferation, actin cytoskeleton reorganization, tyrosine phosphorylation, MAPK and c-Fos activation in melanoma murine cells (B16F10). **METHODS AND RESULTS:** In vitro incubation of B16F10 cells for 48h with JT, KR or FL (1 μ M) induced inhibition of proliferation. Treatment with KR and FL, but not JT, induced decrease of actin polymerization. However, all disintegrins were able to stimulate tyrosine phosphorylation in B16F10. In addition, FL and KR increased Erk-2 nuclear translocation in these tumor cells. In contrast, cell treatment with JT and KR showed an increase of c-Fos content in nuclear extract, while FL dramatically decreased c-Fos nuclear levels in melanoma cells. **CONCLUSION:** The binding of RGD-disintegrins in melanoma murine cells affects proliferation. Interaction of KR and FL with receptors causes alterations in reorganization of actin cytoskeleton and MAPK activation pathway interfering with cellular survival. However, JT does not affect actin polymerization or Erk-2 nuclear translocation, but this disintegrin, like KR, was able to stimulate c-Fos transcription factor which is involved in the modulation of proliferation. Our data suggest that the RGD-monomeric disintegrins are putative prototypes for the study and the therapeutic control of tumor cells proliferation. **FINANCIAL SUPPORT:** CNPq, FAPERJ, IFS, SR2-UERJ.

06.079

LIPOXINAS E FRAGMENTOS PEPTÍDICOS INIBEM A PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS DE MELANOMA MURINO. Cezar de Mello, P.F.T.* & Fierro I.M.; Departamento de Farmacologia, IBRAG, UERJ, RJ.

Resultados anteriores demonstraram que Lipoxinas (LX) são potentes inibidores da proliferação vascular induzida pelo fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), tanto in vitro quanto in vivo. Esta atividade antiangiogênica das LX seria relevante no desenvolvimento de tumores malignos e metástases. Algumas células tumorais não apenas secretam VEGF, mas também realizam um "loop" autócrino expressando receptores funcionais para este fator de crescimento. Neste trabalho avaliamos a atividade antiproliferativa de análogos sintéticos de lipoxinas e fragmentos peptídicos em linhagens de células tumorais e a modulação intracelular desta atividade. Células de melanoma murino (B16F10) foram cultivadas em placas de 96 poços por 24h antes da adição de diferentes concentrações de LX (1-100 nM) e peptídeos (10-1000 nM). Após 48h de incubação, o número de células foi determinado e os resultados demonstraram uma inibição dose-dependente da proliferação celular que parece estar diretamente correlacionada a uma inibição da fosforilação em resíduos de tirosina. As amostras foram analisadas por eletroforese em gel de poliácridamida seguida por immunoblotting utilizando anticorpos anti-fosfotirosina e evidenciaram que as principais proteínas envolvidas possuem peso molecular em torno de 40-46 e 80-90 kDa. Estes resultados indicam um efeito antiproliferativo das substâncias testadas, cujo mecanismo parece envolver, predominantemente, uma indução de atividade fosfatásica regulando a via intracelular da PI3-Kinase/Akt, uma via fundamental no processo de proliferação celular. Apoio Financeiro: Faperj; CNPq e SR-2/UERJ.

06.080

ATIVAÇÃO DE MONÓCITOS HUMANOS POR ANÁLOGOS SINTÉTICOS DE LIPOXINAS E FRAGMENTOS PEPTÍDICOS. Simões, R.L.* & Fierro I.M.; Departamento de Farmacologia, IBRAG, UERJ, RJ.

A angiogênese é um processo biológico relevante em diversas patologias, tais como inflamação crônica e câncer sendo modulado por diferentes mediadores químicos. Os monócitos humanos são fontes importantes de fatores pró-angiogênicos tais como o VEGF expressando receptores funcionais para este fator de crescimento, além de outros mediadores como as Lipoxinas (LX). O presente trabalho tem por objetivo a investigação dos mecanismos envolvidos na ativação de monócitos por intermediários lipídicos e peptídicos e a consequente modulação deste fenômeno. Os monócitos foram isolados de sangue humano e incubados (5x10⁴) por 1h a 37°C, migrando de forma dose-dependente em resposta a análogos sintéticos de lipoxinas (1-100 nM) e fragmentos peptídicos (10-1000 nM). As células (2x10⁶) foram incubadas na ausência (controle) e na presença de

diferentes concentrações de lipoxinas e fragmentos peptídicos por 5 min a 37°C. As amostras foram aplicadas em gel de poliacrilamida seguido por immunoblotting utilizando anticorpos anti-fosfo tirosina. A análise densitométrica evidenciou fosforilação, de forma dose-dependente, em resíduos de tirosina em proteínas de diferentes pesos moleculares, destacando-se 14, 42, 46 e 50 kDa. Os resultados sugerem que as lipoxinas e os peptídeos, provavelmente através da interação com o mesmo receptor, promovem ativação dos monócitos, induzindo fosforilação em diferentes proteínas envolvendo as vias intracelulares da MAPkinase e JNK, essenciais neste processo e na modulação do papel destas células em diversos eventos ligados ou não à angiogênese. Apoio Financeiro: Faperj; CNPq e SR-2/UERJ

06.081

INTERAÇÃO NEGATIVA ENTRE OS EFEITOS MEDIADOS PELOS RECEPTORES AT₁ E AT₂ DA ANGIOTENSINA II NO MÚSCULO ANOCOCÍGEO DE RATOS. Márcio Augusto Fressatto de Godoy^a e Ana Maria de Oliveira - Departamento de Farmacologia, FMRP-USP Laboratório de Farmacologia, FCFRP-USP

Foi investigada a participação de populações heterogêneas de receptores para a angiotensina II (Ang II) no músculo anococcigeo de ratos. A importância prática de se determinar homogeneidade ou a heterogeneidade dos receptores de um dado tecido é que a última circunstância deixa em aberto a possibilidade da ativação ou inativação seletiva de um dos receptores. Um método prático para se determinar a heterogeneidade de uma população de receptores consiste na análise de Schild para antagonistas seletivos. Em um sistema homogêneo, a análise de Schild produz uma regressão linear cuja reta tem inclinação igual a 1 e uma interceptação com o eixo das abcissas igual a pK_{-log} (-log[constante de dissociação]) para antagonistas competitivos. Por outro lado, ocorrerá um desvio desse modelo em um sistema heterogêneo heterogêneo. Esta predileção está baseada na premissa de que o receptor secundário é menos sensível ao antagonista, que o primário (KENAKIN, 41:699, 1992). Neste trabalho, foram calculadas as regressões de Schild para os antagonistas seletivos dos receptores AT₁ e AT₂ da Ang II, losartan e PD123319 (0,01nM – 3nM) respectivamente, mediante a análise dos seus efeitos sobre as contrações isotônicas desencadeadas pelo peptídeo (0,1nM – 1nM) no músculo anococcigeo de ratos. Os resultados mostram que a análise de Schild para losartan resulta em uma reta com inclinação diferente de um, ao passo que PD123319 não exerce qualquer efeito. Entretanto, a incubação do músculo com losartan na presença de PD123319 (0,1nM) leva a uma reta com inclinação não diferente de 1 e valor de pK_{-log} igual a 9,16. Surpreendentemente, na presença do antagonista seletivo dos receptores α_1 -adrenérgicos, prazosin (1nM), losartan não produz qualquer efeito significativo; ao passo que PD123319 aumenta o efeito contrátil máximo da Ang II sugerindo um importante componente inibitório. Para avaliar a origem deste componente, foram aplicados sucessivos estímulos elé-

tricos de campo sobre a pré-contracção mantida do músculo com betanecol (30 nM). Na presença de guanetidina (30nM) E PRAZOSIN (1nM) no meio de incubação. Os resultados mostram que sucessivos estímulos elétricos (72V, 1Hz, 0,1ms, 10s) relaxam o músculo de maneira uniforme ao longo do tempo. Este efeito relaxante é aumentado significativamente pela Ang II (0,1pM – 0,1nM) de maneira dependente da concentração. PD123319 (0,01nM – 0,1nM) é capaz de inibir este efeito e L-NAME (100 nM), um inibidor da enzima óxido nítrico (NO)-sintase, é capaz de inibi-lo completamente. Em suma, os resultados sugerem a presença de uma população heterogênea de receptores para a Ang II no músculo anococcigeo de ratos, onde a ativação dos receptores do subtipo AT₁ induz contração das células de músculo liso, e a ativação dos receptores AT₂ induz inibição do efeito contrátil através de um mecanismo dependente da produção de NO.

06.082

POLIMORFISMOS NA REGIÃO PROMOTORA (T-786C) E NO EXON 7 (GLU298ASP) DO GENE DA SINTESE ENDOTELIAL DO ÓXIDO NÍTRICO (ENOS) AFETAM A PRODUÇÃO PLAQUETÁRIA DE ÓXIDO NÍTRICO (NO). Jose E. Tanus-Santos^a, Mehul Desai, Leslie R. Deak, David A. Flockhart, Jane E. Freedman, Georgetown University Medical Center, Washington, DC, USA e FMRP-USP – Depto. Farmacologia

Introdução: As plaquetas de pacientes com síndromes coronarianas agudas liberam menores quantidades de NO. Liberações reduzidas de NO podem ser causadas por variações genéticas da eNOS, as quais têm sido associadas com doenças cardiovasculares. Métodos: A produção de NO durante agregação plaquetária induzida por trombina (1U/mL) foi quantificada com um micro-eletrodo seletivo para NO, bem como a agregação plaquetária induzida por ADP (0,5-2,0 mM). As plaquetas foram obtidas de 47 voluntários caucasianos saudáveis que foram previamente genotipados para os polimorfismos T-786C e Glu298Asp da eNOS. A genotipagem foi feita por amplificação do DNA genômico (por PCR) seguida de digestão por enzima de restrição e análise dos fragmentos de DNA após eletroforese em gel de poliacrilamida. Resultados e Discussão: A ocorrência do variante genético C na região promotora do gene da eNOS foi associada com redução de 50% na produção plaquetária de NO (P=0.007). A ocorrência do variante Asp no Exon 7 foi associada com redução de 45% na produção plaquetária de NO (P=0.002). Não foram observadas alterações significativas na agregação plaquetária associadas a ambos polimorfismos. Estes resultados sugerem que estes polimorfismos genéticos da eNOS afetam a atividade desta enzima em plaquetas. A redução da produção de NO durante agregação plaquetária pode explicar a maior susceptibilidade a síndromes coronarianas agudas de portadores destes variantes genéticos da eNOS.

06.083

SUPEREXPRESSÃO DA PROTEÍNA PRO-APOPTÓTICA BAX CAUSA COLAPSO DO POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL E MORTE CELULAR. Carvalho, A.C.P.(1), Rosenstock, T.R.(1), Youle, R.J.(2), and Smaili, S.S.(1). (1) Departamento de Farmacologia, UNIFESP; (2) National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA.

INTRODUÇÃO: A Bax é uma proteína que está presente na maioria das células de eucariotos, atuando no ciclo celular e promovendo a morte por apoptose. Na presença de estímulos agressores químicos, físicos ou infecciosos, ocorre a superexpressão da proteína, que pode estar relacionada a sua toxicidade e também a gênese de diversas patologias. OBJETIVO: Estudar os efeitos promovidos pela superexpressão da Bax e sua relação com a mitocôndria em células da glia do córtex de rato. MATERIAIS E MÉTODOS: Experimentos foram realizados em cultura primária de astrócitos de ratos, que foram transfectados com o gene da Bax acoplado à GFP (Green Fluorescent Protein). Após 24 horas da transfecção, as células foram carregadas com TMRE, indicador do potencial de membrana mitocondrial (PMM), e medidas simultâneas da GFP-Bax e TMRE foram feitas em microscópio de fluorescência de alta resolução em tempo real. RESULTADOS: Cerca de 40-50% das células foram transfectadas com GFP-Bax e apresentaram uma fluorescência típica no citosol. Na presença de estímulo apoptótico (staurosporina) a Bax translocou do citosol para as mitocôndrias. A inserção na mitocôndria causou um colapso no PMM das mitocôndrias visualizadas individualmente. A Bax adicionada em células não transfectadas causou o mesmo efeito sobre o PMM. Estes efeitos não foram inibidos pela ciclosporina A, um inibidor do poro de transição de permeabilidade mitocondrial. A translocação da Bax causou a morte celular por apoptose (90%). CONCLUSÕES: A superexpressão da Bax potencia a toxicidade de agentes apoptóticos. Este efeito está relacionado à sinalização mitocondrial, já que estas organelas podem liberar fatores pró-apoptóticos que contribuem e aceleram a morte celular. APOIO FINANCEIRO: FAPESP e CNPq.

06.084

BIOLOGICAL PRODUCTION OF ALANYL-GLUTAMINE RICH PROTEIN FOR ORAL REHYDRATION AND NUTRITION THERAPY Assreuy, A.M.S.1; Lima, A.A.M.2; Guerrant, R.L.3; Karginova, O.A.4; Timko, M.P.4 1Depto. C. Fisiológicas-CCS, UECE, 2Unidade de Pesquisas Clínicas, UFC-Fortaleza-CE, Brasil; 3Division of Geographic Medicine, 4Dept. Biology, Univ. of Virginia-Charlottesville-VA, USA.

Introduction. Diarrhea and antineoplastic drugs cause disruption of intestinal functions, associated to higher permeability and increased risk of bacteremia and endotoxemia. Glutamine is the major energy source for protein synthesis in the intestinal epithelial cells. Since Glutamine is unstable in acidic conditions, stable glutamine de-

rivatives by addition of alanine (Ala) and Alanine-glutamine (Ala-gln) were chemically synthesized. The aim of this research was to test the feasibility of producing stable Ala-gln based peptides by genetic engineering. Methods. DNA encoding the Ala-gln rich protein fused to a hexahistidine affinity tag was inserted into the expression vector (pGAPzaA). Expression was induced from integrated *Pichia pastoris* (KM71H-MutS) cells and protein isolated by affinity chromatography. The expression level and purified protein were analyzed by Western Blot and SDS-PAGE and protein concentration by Micro BCA assay. Results and Discussion. An artificially gene encoding a 6.58 kDa Ala-gln protein was expressed and the secreted protein purified after a single step NiNTA column. The average concentration for total protein was 0,48 mg/ml per 0,5ml resin, starting from 50 ml crude extract. The optimization of this potential low cost production for the management of cancer patients receiving chemotherapeutic agents and of diarrheal disease of multiple cause will be explored. Financial Support: NIH

06.085

EVOLUÇÃO METABÓLICA E PERMEABILIDADE INTESTINAL EM CAMUNDONGOS TRATADOS COM METOPROLOLOL. 1Nunes-Monteiro, SM; 2Monteiro, MCSA; 1Barbosa-Jr, MS; 1Lima AAM. 1DeptºFisiologia e Farmacologia; 2DeptºBiologia/UFC.

Introdução: Metoprolol (MTX) é um quimioterápico análogo do ácido fólico que inibe a síntese de DNA. Pode induzir mielossupressão, nefrotoxicidade, hepatotoxicidade e mucosite intestinal. Objetivos: Avaliar experimentalmente o metabolismo e a permeabilidade intestinal (Bijlsma, Gastroenterol 1995;108:687). através da taxa de lactulose-manitol (L/M). Métodos: Camundongos machos (30-40g), com livre acesso à ração e água, foram tratados com PBS (controle, n=8) ou MTX (2,5mg/kg/24h sc, n=8) por 3 dias, e avaliados quanto à evolução ponderal, ingestão e ocorrência de diarréia. Após o tratamento ofertou-se 0,25mL de solução com L/M, e coletada a urina durante 24h, para análise em HPLC da taxa de recuperação urinária da L/M. Resultados como média±EPM (ANOVA, teste t Student, p<0,05). Resultados e Discussão: Os animais controle não apresentaram alteração no perfil metabólico e nem na permeabilidade intestinal. O grupo MTX mostrou perda de massa (31,90±0,22g) vs controle (34,12±0,38g); redução nas ingestões de ração (5,00±1,25g) vs controle (7,97±0,92g), e de água (2,70±1,41mL) vs controle (7,70±1,61mL). A taxa de L/M do grupo MTX foi maior (0,54±0,04) que a do controle (0,39±0,17). Constatou-se diarréia após o 3º dia de tratamento. Conclusão: MTX na dose de 2,5 mg/kg/24h sc por 3 dias é capaz de induzir diarréia, comprometer a evolução ponderal, prejudicar a fisiologia absorviva e o estado metabólico. CAPES/CNPq/UFC.

06.086

PERMEABILIDADE INTESTINAL E METABOLIS-

MO EM RATUS NORVEGICUS E MUS MUSCULUS AMBIENTADOS EM GAIOLA METABÓLICA. 1Monteiro, MCSA; 2Nunes-Monteiro, SM; 2Lima, AAM. 1-Bacharelado em Biologia; 2-Deptº de Fisiologia e Farmacologia /UFC.

Introdução: Animais de laboratório devem ter mantidos em cada espécie, padrões biológicos e ambientais. Em experimentações, utiliza-se mais o *Mus musculus* e o *Ratus norvegicus*. Nestes, o teste de lactulose/manitol (L/M) avalia em gaiola metabólica, a permeabilidade intestinal através da taxa de recuperação urinária de L/M (Bijlsma, Gastroenterol 1995;108:687). Objetivos: Avaliar o metabolismo destes animais em gaiola metabólica. Métodos: Ratos Wistar (n=24,150-230g) e camundongos Swiss (n=36,20-40g), de ambos os sexos, com água ad libitum, foram observados por 3 dias quanto à evolução ponderal, ingestões hídrica e de ração, e diurese. Ofertou-se 25g/rato, 11g/camundongo de ração padrão, em gaiola comum (CONTROLE); e 100g/animal, em gaiola metabólica (GM). No teste L/M, utilizou-se 10g/rato/24h e 5g/camundongo/24h, de ração pobre em carboidrato (RPCH). Resultados em média±EPM (ANOVA, t de Student; *p<0,05). Resultados e discussão: Camundongos fêmeas em GM (CFGM) mostraram redução da massa (24,79±0,19g), vs grupo controle (CFGC; 26,26±0,18g). Nos ratos machos em GM (RMGM) houve redução ponderal (165,5±2,39g), vs controle (RMGC; 177,6±2,39g) e vs grupo de fêmeas em GM (174,1±1,12g). CFGM teve maior consumo de ração (11,02±1,99g) vs controle (5,72±0,36g); e aumento na ingestão hídrica (3,11±0,89mL), vs controle (5,65±0,10mL). CFGM teve menor diurese (0,21±0,04mL) vs CMGC (0,71±0,05mL), e maior taxa L/M (>0,8). Conclui-se que o acondicionamento em gaiola metabólica altera a fisiologia e metabolismo, principalmente de *Mus musculus* fêmeas. CAPES/UFC.

06.087

UM MÉTODO NÃO INVASIVO PARA DETECÇÃO DE HELICOBACTER PYLORI. G. Sá Roriz Fonteles, A.A. Moreira Lima, Braga, L.L.B.C.; L. Barret, R. Guerrant e M.C. Fonteles. Unidade de Pesquisas Clínicas/IBIMED/UFC/UECE

A descoberta do *H. Pylori* em biópsias gastroduodenais por B. J. Marshal e J. R. Warren nos anos oitenta veio revolucionar a conduta e tratamento das úlceras gastrites e duodenites. A associação de macrolídeos, amoxicilina, metronidazol e bismuto, em diferentes esquemas, permite a cura de 80 à 90% dos pacientes com erradicação do germen. Há também relação entre a presença de *H. pylori* e o câncer gástrico, com alta prevalência no NE do Brasil. Daí a importância do monitoramento epidemiológico de populações de risco. Salivas foram colhidas sobretudo de crianças da favela Parque Universitário, num estudo piloto conduzido através do acompanhamento desta população do berço a adolescência. As salivas foram então resfriadas, centrifugadas por 15 minutos a 3000 G e congeladas a -70°C, até o dia da análise. Procedemos a determinação de IGG e ELISA por ELISA, utilizando kits para determinação de anticorpos no soro contra *H. pylori* (KPL-Lab-USA), contendo placas de microtitulação, anticorpos de cabra anti-IGG humano, conjugado de

fosfatase para marcação, solução bloqueadora de albumina bovina dispersa em soro fisiológico, glicerol a 50%, tampão de dietanolamina e antígeno de *H. pylori* preparado no laboratório a partir de amostra obtida na comunidade. Foram considerados positivos os casos cujas densidade ópticas foram igual ou superior a 2. Este índice foi calculado a partir do quociente entre os controles positivos e negativos. Esses dados foram comparados aos obtidos por teste respiratório e PCR das fezes. Quando confrontado com os Positivos por PCR houve confirmação de 79 % e teste respiratório coincide em 83% dos positivos. A comparação com o teste de amostras de saliva é uma ferramenta para a epidemiologia molecular. Apoio: FUNCAP

06.088

FACILITAÇÃO DA TRANSMISSÃO SIMPÁTICA PELOS COLINOCEPTORES MUSCARÍNICO E NICOTÍNICO PRÉ-SINÁPTICOS NO DUCTO DEFERENTE DE RATO NA HIPERTENSÃO GENÉTICA. D'Angelo, L.C.A.; Caricati-Neto, A.; Jurkiewicz, N.H. & Jurkiewicz, A. - Depto. de Farmacologia, UNIFESP/EPM, São Paulo-SP

INTRODUÇÃO: Os colinoceptores pré-sinápticos aumentam a liberação de neurotransmissores em neurônios simpáticos (Prog. Neurobiol. 51: 225-242, 1997). Como as disfunções simpáticas estão envolvidas na fisiopatologia da hipertensão genética (Can. J. Cardiol. 15:8A-14A, 1999), decidimos investigar o papel dos colinoceptores pré-sinápticos na transmissão simpática no ducto deferente (DD) de ratos hipertensos (SHR). MÉTODOS e RESULTADOS: Os DD (porção prostática) de ratos adultos normotensos (NWR) e hipertensos (SHR) foram montados "in vitro" (30°C, pH 7,4) e estimulados (0,2Hz, 1ms, 60-80V) para indução de contrações (twiches). Os agonistas Metacolina (MCh), Pilocarpina (PIL), Carbacol (CCh), Nicotina (NIC) e Dimetilfenilpiperazina (DMPP), aumentaram os twiches com valores de pD₂ similares em NWR e SHR, mas com maior E_{max} em SHR (MCh=293±56%, PIL=84±7%, CCh=96±27%, NIC=114±24% e DMPP=64±5%) do que em NWR (MCh=82±12%, PIL=47±6%, CCh=41±10%, NIC=37±6% e DMPP=25±4%). O antagonista muscarínico Atropina (10⁻⁸-10⁻⁷M) inibiu competitivamente os efeitos da CCh (10⁻⁷-10⁻⁵M), MCh e PIL, enquanto os antagonistas nicotínicos Hexametônio e Mecamilamina (10⁻⁶-10⁻⁵M) inibiram competitivamente os efeitos da CCh (10⁻¹⁰-10⁻⁴M), NIC e DMPP. CONCLUSÃO: A facilitação da transmissão simpática no DD por colinoceptores muscarínicos e nicotínicos pré-sinápticos está aumentada em ratos hipertensos. CNPq, APESP

06.089

CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL E POR "BINDING" DOS α₂-ADRENOCEPTORES PRÉ-SINÁPTICOS EM DUCOS DEFERENTES DE RATOS HIPERTENSOS GENÉTICOS. Lombardi, A. P.; Caricati-Neto, A. & Jurkiewicz, A. Depto de Farmacologia, UNIFESP/EPM, São Paulo-SP

INTRODUÇÃO: Em vários tecidos a neurotransmissão simpática é modulada por receptores pré-sinápticos, que inibem a liberação de noradrenalina e A TP (J. Pharmacol Physiol. 46:365,1995). Em vista disso, decidimos estudar o papel dos α_2 -adrenoceptores sobre a transmissão simpática em ducto deferente (DD) de ratos hipertensos.

MÉTODOS e RESULTADOS: Os DD (porção prostática) de ratos adultos normotensos (NWR) e hipertensos (SHR) foram montados "in vitro" (30°C, pH 7,4) e estimulados (0,2Hz, 1ms, 60-80V) para indução de contrações (twitches), após bloqueio dos α_1 -adrenoceptores (Prazosin 10⁻⁶M/30min). Estudamos os agonistas α_2 -adrenérgicos Clonidina (CLO) e UK 14,304 (UK), na ausência ou presença de antagonistas α_2 -seletivos Yimbina (YO) e rauwolscina (RA). Estudamos também a ligação da ³H-CLO em membranas do DD de NWR e SHR. Os twitches foram totalmente inibidos pela CLO e UK com a mesma potência (p₅₀) em DD de SHR (CLO = 8,03±0,01; UK = 8,00±0,02) e NWR (CLO = 8,40±0,06; UK = 8,2±0,04). Os efeitos da CLO e do UK foram bloqueados pela YO e a RA com a mesma potência (pA₅₀) em SHR (YO = 8,10±0,13; RA = 7,72±0,33) e NWR (YO = 8,12±0,07; RA = 8,14±0,12). A afinidade (K_d) e a densidade máxima (B_{max}) dos sítios específicos de ligação da ³H-CLO foram similares em DD de NWR (K_d = 0,93±0,07nM; B_{max} = 14,50±1,44fmol.mg proteína⁻¹) e SHR (K_d = 1,10±0,16nM; B_{max} = 11,75±1,31fmol.mg proteína⁻¹).

CONCLUSÃO: Os resultados mostram que a afinidade e a densidade dos α_2 -adrenoceptores pré-sinápticos em DD não diferem entre NWR e SHR. CNPq, CAPESAPESP

06.090

FACILITAÇÃO DA TRANSMISSÃO SIMPÁTICA PELOS α_2 -ADRENOCEPTORES PRÉ-SINÁPTICOS NO DUCTO DEFERENTE DE RATOS HIPERTENSOS GENÉTICOS. Lombardi, A. P.; Aldrovandi, E. P.; Caricati-Neto, A. & Jurkiewicz, A. – Depto. de Farmacologia, UNIFESP/EPM, São Paulo-SP

INTRODUÇÃO: Em vários tecidos a neurotransmissão simpática é modulada por receptores pré-sinápticos, que inibem ou facilitam a liberação de noradrenalina e A TP, incluindo os β -adrenoceptores (J. Pharmacol Physiol. 46:365,1995). Em vista disso, decidimos estudar o papel dos β -adrenoceptores sobre a transmissão simpática em ducto deferente (DD) de ratos hipertensos.

MÉTODOS e RESULTADOS: Os DD (porção prostática) de ratos adultos normotensos (NWR) e hipertensos (SHR) foram montados *in vitro* (30°C, pH 7,4) e estimulados (0,2Hz, 1ms, 60-80V) para indução de contrações tetrodotoxina- e α_2 -metileno ATP-sensíveis (twitches), sob o bloqueio de α -adrenoceptores (Fentolamina 10⁻⁶M/30min). Foram estudados os agonistas β_2 -seletivos (Salbutamol, SAL e Terbutalina, TER) e não seletivos (Isoprenalina, ISO e Adrenalina, ADR), na ausência ou presença de bloqueadores β -seletivos (Atenolol, ATE e Practolol, PRA). Na ausência do ATE e PRA, os twitches foram totalmente inibidos pela ISO e ADR e parcialmente pelo SAL e TER. A potência dos β -agonistas foi similar em SHR e NWR, mas o efeito máximo do SAL e TER foi menor em SHR. Na presença do ATE e PRA (10⁻⁷-10⁻⁶M), a potência dos β -agonistas foi reduzida em SHR e NWR e a amplitude dos twitches foi aumentada em baixas concentrações (10⁻⁸-10⁻⁶M) de β -agonistas em SHR e NWR. Porém, este aumento foi maior em SHR (30-40%) do que em NWR (10-20%).

CONCLUSÃO: A facilitação da transmissão simpática no DD por β -adrenoceptores pré-sinápticos está aumentada em ratos hipertensos.

CNPq, CAPESAPESP

06.091

MODULAÇÃO DA TRANSMISSÃO SIMPÁTICA PELOS CANAIS DE CÁLCIO TIPO L E N NO DUCTO DEFERENTE DE RATOS HIPERTENSOS GENÉTICOS. Ferreira, R.M.; Caricati-Neto, A. & Jurkiewicz, A. Depto. de Farmacologia, UNIFESP/EPM, São Paulo-SP

INTRODUÇÃO: Em tecidos ricos em nervos simpáticos, como o ducto deferente (DD), os canais de cálcio tipo N e L modulam respectivamente a liberação e a resposta dos neurotransmissores (J.

Pharmacol Physiol. 46:365,1995). Visto que disfunções simpáticas estariam envolvidas na fisiopatologia da hipertensão (Can J Cardiol. 15: 8A-14A, 1999), decidimos investigar o papel modulatório dos canais de cálcio (CC) tipo N e L na transmissão simpática no DD de ratos geneticamente hipertensos (SHR).

MÉTODOS e RESULTADOS: Os DD (porção prostática) de ratos Wistar normotensos (NWR) e hipertensos (SHR) de 16-20 semanas foram montados *in vitro* (30°C, pH 7,4) e estimulados eletricamente (0,1-20Hz, 1ms, 60-80V) para indução das contrações neurogênicas. Foram estudados os efeitos de ativadores (BayK 8644) e inibidores (Nifedipina, Isradipina, e Nimodipina) dos CC tipo L e do inibidor irreversível dos CC tipo N (w-Conotoxina GVIA) em DD de NWR e SHR. As contrações neurogênicas foram potencializadas pelo BayK 8644 (10⁻⁸-10⁻⁶M) e inibidas pela Nifedipina, Isradipina, Nimodipina e w-Conotoxina GVIA em DD de SHR e NWR. A potencialização pelo BayK 8644 foi significativamente maior em SHR do que em NWR, em todas as frequências estudadas.

CONCLUSÃO: Os resultados mostram que a resposta mediada pelos canais de cálcio tipo L sobre a transmissão simpática no ducto deferente de rato está aumentada na hipertensão genética. CAPESAPESP

06.092

EFEITOS DO MIDAZOLAM SOBRE O MÚSCULO LISO E TRANSMISSÃO SIMPÁTICA EM DUCTO DEFERENTE DE RATO. Stefani, F.; Caricati-Neto, A.; Jurkiewicz N.H. & Jurkiewicz A. Depto. de Farmacologia, UNIFESP/EPM, São Paulo, SP

INTRODUÇÃO: Os benzodiazepínicos (BDZ) são uma classe de drogas largamente utilizadas como pré-anseséticos, sedativos e ansiolíticos devido as suas ações depressoras sobre o SNC. Estudos recentes indicam ações dos BDZ sobre a neurotransmissão periférica (JPET, 291, 1164, 1999).

OBJETIVOS: Usando o ducto deferente de rato (DDR) como modelo experimental, investigamos os efeitos do BDZ midazolam (MDZ) na musculatura lisa e na transmissão simpática.

MÉTODOS: Os DD de ratos Wistar, machos, de 20 a 24 semanas, foram montados em banhos de órgãos isolados (37°C, pH 7,4), para medida de contração por drogas ou estímulo elétrico (twitch, 0,2Hz, 1ms, 60V).

RESULTADOS: O MDZ produziu: a) contrações com pD₂ de 4,4±0,1 e atividade intrínseca (α , em relação a fenilefrina, FEF) de 0,36±0,02; b) potenciação das respostas contráteis de agonistas α -adrenérgicos (FEF e noradrenalina) em doses de 10⁻⁷ a 10⁻⁵ M; c) curvas dose-resposta que foram inibidas competitivamente por prazosin, indicando interação com adrenoceptores α_1 ; d) em doses maiores, entre 10⁻⁴ a 10⁻³ M, bloqueio das contrações por FEF e noradrenalina, BaCl₂ e KCl e bloqueio do twitch, com pIC₅₀ de 4,1±0,1.

CONCLUSÃO: Os resultados sugerem que, no DDR, o MDZ é um agonista parcial em receptores α -adrenérgicos, apresentando também um componente inibitório. Não sabemos ainda se este componente inibitório está ou não relacionado a um eventual receptor benzodiazepínico periférico.

CNPq, APESP