

Setor 07. Imunofarmacologia

07.001

MASTÓCITOS E MACRÓFAGOS ESTIMULADOS PELO AGREGADO DE TRIÓXIDO MINERAL (MTA) LIBERAM UM FATOR QUIMIOTÁTICO PARA NEUTRÓFILOS.

Gomes, A. C.¹; Oliveira, S. H. P.² - ¹UNESP - Ciências Básicas - Farmacologia; ²UNESP - Ciências Básicas

Introdução: MTA induz migração de neutrófilos (MNE) para cavidade peritoneal de camundongos (CPC), porém, não é conhecido o papel de macrófagos (MO) e mastócitos (MAST) sobre essa migração. O objetivo do trabalho foi investigar o papel destas células (CEL) sobre a liberação de fator quimiotático para NE (FQNE) induzido por MTA. **Métodos:** MO peritoneais (5×10^6 células/poço) e MAST da medula óssea (3×10^6 células/poço) de camundongos, 95% de pureza, foram estimulados com MTA (est-MTA) (50 mg/ml) por 90 min para avaliar a liberação do FQNE nos sobrenadantes (SOB). MAST e MO foram pré-tratados com dexametasona (DEXA, 10 μ M); BW A4C (BW, 100 μ M) e U75302 (U75, 10 μ M) por 30 min. As CEL foram est-MTA durante 90 min. A seguir, as CEL foram lavadas e mantidas em cultura por 90 min para liberação do FQNE. O SOB (0,5 ml/cavidade) foi filtrado e injetado na CPC normais. **Resultados:** Os SOB de MAST e MO est-MTA induziram MNE (500% e 400%) respectivamente para CPC após 6h, comparado com o controle. DEXA, BW e U75 inibiram, em média de 35%, a liberação FQNE tanto dos MAST quanto dos MO. **Discussão:** Nossos resultados sugerem que MAST e MO liberam um FQNE mediado pela liberação de LTB₄, visto que o pré-tratamento das CEL com o BW e U75 foram capazes de inibir a MNE. A inibição obtida pela DEXA pode ser devida a presença de citocinas e/ou quimiocinas liberadas pelos MAST e/ou MO in vitro após estimulação por MTA, visto que observamos a presença de IL-1b e MIP-2 no exsudato peritoneal. **Apoio Financeiro:** FAPESP, CNPq

07.002

EXPRESSÃO DE SIRP α E SHP1 EM MONÓCITOS DE SANGUE PERIFÉRICO E CÉLULAS MIELOMONOCÍTICAS U937 E SEU PAPEL NA ANEMIA HEMOLÍTICA AUTOIMUNE

Almeida, A. C.¹; Barjas-Castro, M. L.²; Saad, S. T.²; Condino-Neto, A.³ - ¹UNICAMP - Farmacologia; ²UNICAMP - Centro de Hematologia e Hemoterapia; ³ICB - USP - Imunologia

INTRODUÇÃO: A interação SIRP α -CD47 promove a captação da fosfatase SHP1^{1,2,3}, provocando a inibição da fagocitose^{4,5}. A incidência de doadores sadios com Coombs positivo é maior que a de anemia hemolítica autoimune (AHAI). Consideramos que uma falha no sistema de inibição da fagocitose pode contribuir para a doença^{6,7,8}. Nosso objetivo foi determinar se monócitos (mon) de pacientes com AHAI apresentam alteração na expressão de SIRP α e SHP1, e o efeito de interferon- γ /fator de necrose tumoral- α (IFN γ /TNF α) e dexametasona (dexa) sobre essa expressão. **MÉTODOS:** Células U937 e mon de sangue periférico foram cultivados por 48h. A expressão gênica relativa de SIRP α e SHP1 foi determinada por RT-PCR. **RESULTADOS:** Mon de AHAI expressam mais SHP1 que mon sadios e o mesmo que células U937. A expressão de SIRP α em mon de AHAI é igual à de mon sadios e células U937 basais e menor que em células U937 cultivadas com IFN γ /TNF α , o que nessas células causa o aumento da expressão de SIRP α , mas não de SHP1. Dexa não alterou a expressão desses genes. A expressão de SIRP α e SHP1 em mon é menor que em células U937. **DISCUSSÃO:** A cultura com IFN γ /TNF α aumenta a expressão de SIRP α em células U937. Pacientes de AHAI sofrem de hemólise mesmo com alto grau de expressão de SHP1. Outros aspectos envolvidos na regulação negativa da fagocitose em AHAI devem ser estudados. **Referências Bibliográficas:** 1 – Oldenborg, PA, *J Exp Med* 193: 855, 2001. 2 – Neznanov, N, *J Biol Chem* 278(6):3809, 2003. 3 – Olsson, M, *Transfus Clin Biol* 13(1-2):39, 2006. 4 – Brown, EJ, *Trends Cell Biol* 11: 130, 2001. 5 – Oshima, K, *FEBS Lett*, 519: 1, 2002. 6 – Engelfriet, CP, *Semin Hematol* 29: 3, 1992. 7 – Gehrs, BC, *Am J Hematol* 69: 258, 2002. 8 – Genty, I, *Rev Med Interne* 23: 901, 2002. **Apoio Financeiro:** CNPq

07.003

EVALUATION OF A CHEMOKINE-BINDING PROTEIN IN A BLEOMYCIN-INDUCED LUNG INJURY IN MICE.

Alessandri, A. L.¹; Russo, R. C.¹; Soares de Souza, A. L.¹; Pinho, V.¹; Castor, M. G. M.¹; Silva, A. F. C.¹; Garcia, C. C.¹; Proudfoot, A. E. I.²; Teixeira, M. M.¹ - ¹UFMG - Bioquímica e Imunologia; ²Serono Pharmaceutical Research Institute - Serono Pharmaceutical Research Institute

Introduction: Recent studies have demonstrated that various viruses and parasites express chemokine-binding proteins (CKBP) that may be relevant for pathogenesis of disease caused by these microorganisms. Bleomycin (BLEO)-induced lung INJURY is the most important model to study interstitial lung disease. CCL3 plays a role in driving leukocyte accumulation and fibrosis in this model. We evaluated the ability of a CCL3-CKBP (CKBP1) to modify leukocyte recruitment in a model of chronic pulmonary inflammation induced by bleomycin. **Methods:** The influx of leukocytes was evaluated in the peritoneal cavity and by intravital microscopy of mice given CCL3. BLEO (0.0625 – 0.125 U) was instilled in the lung and inflammation assessed at different time points. **Results:** CCL3 induced a dose- and time-dependent recruitment of granulocytes. CCL3 also induced leukocyte rolling, adhesion and emigration in the cremaster, as assessed by intravital microscopy. CKBP1 prevented the CCL3-induced influx of leukocytes in a dose-dependent manner. CKBP1 treatment significantly inhibited the accumulation of neutrophils into the lungs of BLEO-treated mice. This was associated with diminished production of cytokines, mieloperoxidase levels and macrophage infiltration. Moreover, the drug significantly delayed and prevented lethality induced by BLEO. **Conclusion:** The present studies reinforce the role played by CCL3 in BLEO-induced lung injury. CKBP1 may represent a novel therapy for patients with pulmonary fibrosis. **Supported by:** FAPEMIG

07.004

ASSOCIATION OF *IPOMOEA CARNEA* AND BCG REDUCES BIRTH DEFECTS CAUSED BY CYCLOPHOSPHAMIDE IN RATS

Latorre, A. O.¹; Hueza, I. M.¹; Gorniak, S. L.¹ - ¹FMVZ - USP - Patologia

Introduction: Maternal immunostimulation (MIS) produces a significant decrease in malformations(MF) caused by teratogens. Thus, the purpose of the present study was to investigate the effect of *Bacillus Calmette Guérin* (BCG) and/or the aqueous fraction (AF) of the plant *I. carnea* which are known to activate macrophages (Holladay SD, *Teratology*,62,413,2000; Hueza IM,87,*JEthnopharmacol*,181,2003) on the induction of a teratogenic effect resulting from cyclophosphamide (CP) exposure in pregnant rats. **Methods**

and Results: The female rats Wistar were separated into 6 groups: 5 experimental(ABC, AC, BC, A and B) and 1 control(C). The treatment schedule: ABC, AC and A groups were pretreated by gavage for 14 days with AF (3g/kg of *I. carnea* dry leaves) 28 or 14 days prior to mating. The remaining groups (BC, B and C) were pretreated by gavage for the same period with water. On day 14 before mating, BCG(10mg/kg) was injected intraperitoneal (ip) in females from the ABC, BC and B groups and saline was injected ip in females from the AC, A and C groups. On day 11 of gestation, the ABC, AC, BC and C groups were treated with a subcutaneous injection of CP (7.5 mg/kg). Both BCG and/or AF attenuated the embryotoxic effects of CP in rats. All immune stimulated dams presented an increase in placenta and fetus bw. Fetuses from the ABC-group showed a decreased of skull anomalies, besides showed no occurrence of polydactylism over C-group.

Discussion: The association of AF and BCG provided improved MIS compared to BCG alone; however, additional studies are required to determine the specific mechanisms by which immune stimulant substances decrease MF. **Supported by:** FAPESP

07.005

PAPEL DO IFN-G DURANTE A INFECÇÃO EXPERIMENTAL PELO VÍRUS DA DENGUE EM CAMUNDONGOS

Fagundes, C. T.¹; Amaral, F. A.¹; Souza, R. S.²; Sousa, L. P.¹; Zirke, C.¹; Souza, P. R. S.¹; Teixeira, M. M.¹; Souza, D. da G. de¹ - ¹UFMG - Bioquímica e Imunologia; ²UFMG - Bioquímica e Imunologia

Introdução: A infecção pelo dengue constitui sério problema de saúde pública no mundo, especialmente em países tropicais. A produção de IFN-g parece contribuir no controle da infecção e na patogênese de várias infecções virais. Avaliamos a importância do IFNg e citocinas relevantes para a sua produção em um modelo de infecção pelo dengue sorotipo 2 (Den-2). **MÉTODOS:** Camundongos C57Bl6 selvagens ou deficientes em IFN-g (IFN-g^{-/-}) foram infectados intraperitonealmente com o Den-2 (1-100 LD₅₀). Vários momentos após infecção (3, 5 e 7 dias) avaliamos a letalidade, a liberação de citocinas, expressão de iNOS, hematócrito e número de plaquetas. **RESULTADOS:** Após a infecção, houve maior produção de IFNg no fígado e soro em comparação com animais não infectados. Animais IFN-g^{-/-} apresentaram maior letalidade que foi acompanhada de uma maior gravidade da apresentação clínica, como visto pela hemoconcentração e plaquetopenia. Animais IFN-g^{-/-} apresentaram maiores níveis de TNF- α tecidual, mas menores concentrações de MIP-2, KC, MCP-1. Experimentos em animais geneticamente modificados demonstram que a produção de IFNg foi controlada pela liberação de IL-18 e IL-12. **CONCLUSÃO:** A produção de IFN-g durante a infecção pelo vírus da dengue é secundária à liberação de IL-12 e IL-18 e é fundamental para o controle adequado da infecção. Na ausência do IFN-g a infecção é mais grave e acompanhada de maior letalidade. Sugere-se que estratégias vacinais que aumentem a produção de IFN-g possam ser úteis no controle da infecção primária pelo vírus da dengue. **Apoio Financeiro:** FAPEMIG, CNPq

07.006

PAPEL DOS ANTICORPOS NA HIPORRESPONSIVIDADE INFLAMATÓRIA DE ANIMAIS ISENTOS DE GERMES

Fagundes, C. T.¹; Amaral, F. A.¹; Vieria, L. Q.²; Nicoli, J. R.³; Teixeira, M. M.¹; Souza, D. da G. de¹ -
¹UFMG - Bioquímica e Imunologia; ²UFMG - Bioquímica e Imunologia; ³UFMG - Microbiologia

Introdução: Nós temos recentemente demonstrado que animais isentos de germes são hiporresponsivos a estímulos inflamatórios, como por exemplo, isquemia e reperfusão intestinal (IRI). Neste modelo, imunoglobulinas (Ig) são importantes na instalação da resposta inflamatória local e sistêmica. Assim, é nosso objetivo verificar se as Igs participam na hiporresponsividade em GF. **MÉTODOS:** Foi realizada transferência cruzada de soro (400 µL intra-peritoneal 24 horas antes da IRI) entre animais isentos de germe (GF) ou convencionais (CV). Além disso, utilizamos animais deficientes na cadeia µ de Ig (µ^{-/-}). Em ambos os protocolos os animais foram submetidos à 60 minutos de isquemia pela oclusão da artéria mesentérica superior. Após 40 minutos de reperfusão avaliamos parâmetros inflamatórios. **RESULTADOS:** Como ocorre em animais GF (sem administração de soro), animais GF que receberam soro de animais GF não apresentaram alterações nos parâmetros inflamatórios. Além disso, altos níveis de IL-10 tecidual foram encontrados nestes animais. A administração de soro de animais CV a animais GF reverteu este quadro, levando a uma resposta semelhante à de animais CV com um aumento na permeabilidade vascular, influxo de neutrófilos no pulmão, aumento da produção de TNF-α e redução de IL-10. Animais CV que receberam soro de animais GF, no entanto, não apresentaram diminuição da resposta inflamatória. Os animais µ^{-/-} apresentaram menor resposta inflamatória, com redução de TNF-α e IL-10 e menor letalidade após IRI. **CONCLUSÃO:** Estes resultados permitem inferir que diferenças no repertório e/ou titulação de Ig é um dos fatores preponderantes para o fenótipo hiporresponsivo dos animais GF durante IRI. **Apoio Financeiro:** FAPEMIG, CNPq

07.007

ROLE OF ABCB1 TRANSPORTER IN THE CARRAGEENAN- AND PAF-INDUCED INFLAMMATION.

Leite, D. F. P.¹; Kassuya, C. A. L.²; Menezes de Lima Jr., O.²; Nascimento, A. F. Z.²; Rumjanek, V. M.³; Calixto, J. B.² - ¹UFRJ - IBCCF; ²UFSC - Farmacologia; ³UFRJ - IBqM

Introduction: Inflammatory mediators are released from injured tissues, spreading outwards uninjured areas, promoting different features of inflammation. Multidrug efflux transporters recognize a wide variety of compounds, including inflammatory mediators, and actively extrude them from the cytoplasm to the outer medium. The present study analyzed the role of ABCB1 in a model of Carrageenan (Cg)-induced pleurisy and edema. As it is known that PAF is produced during Cg-induced inflammation and it is a substrate of ABCB1, PAF induced-edema was also realized. **Methods:** Mice were treated with a selective ABCB1 inhibitor PSC833 (PSC, 30mg/kg i.p) 30 min before Cg injection. Total and differential cell counts, TNF- α , IL1- β and plasma exudation were measured 4h followed pleurisy induction. In PAF- or Cg -induced edema, PSC was injected (1nmol/paw) 30 min before edema induction. Neutrophil and mononuclear cell migration was undirected analyzed by Mieloperoxidase (MPO) and N-Acetyl-Glucosamina (NAG). **Results:** PSC inhibited 69% of cell migration and about 45% of plasma exudation volume. PSC have also inhibited the increase of IL-1 β (82%), but did not reduce TNF- α significantly. PSC inhibited Cg and PAF-induced oedema as well as WEB2170 (30nmol/paw). PSC diminished MPO (at 2 and 3h) and NAG activity (at 3 and 4h) in PAF injected paws. **Conclusion:** ABCB1 seems to play an important role on inflammation as its blockade by PSC inhibited leukocyte migration plasma exudation and IL1 secretion. **Supported by:** FAPERJ, CAPES and CNPq

07.008

EFEITO DO VENENO DE *Thalassophryne nattereri* NA ADESÃO E VIABILIDADE DE CÉLULAS HeLa

Komegae, E. N.¹; Lopes-Ferreira, M.¹; Lima, C.¹ - ¹Instituto Butantan - Imunopatologia

Diversos estudos têm sido realizados com venenos de animais aquáticos na tentativa de identificar toxinas com atividade antiproliferativa para serem usadas em tumores (Newman & Cragg, 2004). Neste sentido, o veneno do peixe brasileiro *Thalassophryne nattereri* se destaca por ser capaz de bloquear o recrutamento seletivo de leucócitos. **Objetivos:** Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito deste veneno na adesão e sobrevivência de um tipo celular. **Métodos:** O veneno extraído do peixe após a compressão da base dos espinhos foi quantificado quanto ao teor de proteínas. Após adquirirem máxima confluência, células de carcinoma de cérvix humana (HeLa, CCL-2, ATCC, 4×10^5 /mL) foram novamente cultivadas na presença de 0,2, 2 ou 20 mg/mL do veneno de *T. nattereri* por 24 horas. Após o cultivo, as células foram coradas com cristal violeta a 0,05% para a determinação da aderência celular e, para a avaliação da viabilidade foi utilizado o método quantitativo de redução do MTT (0,5 mg/mL/100 mL). **Resultados:** O crescente aumento na concentração do veneno (de 0,2 a 20 mg/mL) induziu uma perda significativa tanto na adesão das células HeLa à superfície da placa (9,3%, 9,4% e 8,4%, respectivamente) quanto na viabilidade (65,64%, 65,87% e 2,51%, respectivamente). **Conclusões:** Estes resultados mostram que a perda da aderência das células ao substrato não está relacionada com a morte celular induzida pelo veneno, uma vez que nas menores concentrações (0,2 e 2 mg/mL) aproximadamente 66% das células se encontram viáveis, sugerindo que o veneno de *T. nattereri* pode agir bloqueando a ligação das células aos receptores adesivos na matriz extracelular. **Apoio Financeiro:** Fapesp

07.009

PGD₂ CONTROLS LTC₄ SYNTHESIS BY EOSINOPHILS DURING ALLERGIC INFLAMMATION

Mesquita-Santos, F. P.¹; Vieira-De-Abreu, A.¹; Calheiros, A. S.¹; Castro-Faria-Neto, H. C.¹; Weller, P. F.²; Bozza, P. T.¹; Diaz, B. L.³; Bandeira-Melo, C.¹ - ¹FIOCRUZ - Fisiologia e Farmacodinâmica; ²Harvard Medical School - Medicine; ³INCA - Biologia Celular, CPQ

Introduction and Objectives: In addition to the well-recognized PGD₂ ability to regulate eosinophil trafficking, we ask whether PGD₂ also controls the LTC₄-synthesizing machinery of eosinophils recruited to sites of allergic inflammation. **Methods and Results:** Intrapleural administration of PGD₂ (35 pmol/cavity) to sensitized mice elicited LTC₄ production and formation of new lipid bodies within eosinophils recruited to the pleural cavity 24 h after PGD₂ injection. Concurring, allergen-induced LTC₄ synthesis (from 5.8 ± 1.3 to 2.2 ± 0.4 ng/cavity, n=8, P<0.05) and eosinophil lipid body formation (from 20.5 ± 1.2 to 13.0 ± 0.4 LB/eosinophil, n=8, P<0.05) was abolished by the pre-treatment with HQL-79 (1 mg/kg, i.p. 30 min before allergic challenge), a specific inhibitor of hematopoietic PGD synthase. Immuno-localization of newly formed LTC₄ demonstrated that eosinophil lipid bodies were the sites of LTC₄ synthesis during PGD₂-induced eosinophilic inflammation. Although PGD₂ is able to directly prime eosinophils to enhanced LTC₄ production in vitro, we verified that PGD₂-induced lipid body-driven LTC₄ synthesis within eosinophils in vivo was dependent on the synergic activity of endogenous eotaxin acting on CCR3. **Conclusions:** Our findings showing that, in addition to its established roles in eosinophil recruitment, PGD₂ can control LTC₄ synthesis in vivo that takes place within cytoplasmic lipid bodies of infiltrating eosinophils. The synergism between eotaxin and PGD₂ to regulate such phenomena may have key role in allergic inflammation. We are currently characterizing the specific PGD₂ receptor (DP and CRTH2) and its interplay with CCR3 (the eotaxin receptor) to control LTC₄ synthesis. CNPq (PROFIX), PRONEX-MCT, FIRCA-NIH & HHMI.

07.010

PAPEL FUNDAMENTAL DA CITOCINA MIF NO CONTROLE DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA INDUZIDA PELO VÍRUS DA DENGUE EM CAMUNDONGOS

Amaral, F. A.¹; Fagundes, C. T.¹; Sousa, L. P.¹; Zirke, C.¹; Souza, P. R. S.¹; Teixeira, M. M.¹; Souza, D. da G. de² - ¹UFMG - Bioquímica e Imunologia; ²UFMG - Microbiologia

INTRODUÇÃO: A Dengue é uma doença de grande importância social, principalmente em países subdesenvolvidos. A forma hemorrágica é a mais grave, onde o quadro de choque se instala devido à alta liberação de mediadores inflamatórios e também à hemoconcentração. MIF tem crucial participação em processos inflamatórios por ser grande indutora de outros mediadores. Dessa forma, a verificação de MIF no modelo de infecção pelo vírus da Dengue é de grande relevância para a elucidação dos mecanismos envolvidos nessa doença. **MÉTODOS:** Foram utilizados camundongos Balb/c selvagens (WT) e deficientes em MIF (MIF^{-/-}), infectados ou não com o sorotipo 2 do dengue (1 LD50; i.p.). Os parâmetros inflamatórios analisados foram através da medição de citocinas e quimiocinas (ELISA), infiltrado neutrofílico (MPO), hemoconcentração (hematócrito) e quantificação viral. **RESULTADOS:** Após a infecção, animais WT apresentaram maiores quantidades de MIF no soro em comparação com os animais não infectados. Os animais MIF^{-/-} são menos susceptíveis à infecção pelo vírus da Dengue, com menores níveis de mediadores pró-inflamatórios (IL-6, IFN- γ , RANTES, MCP-1), viremia, infiltrado celular (pulmão) e hematócrito em relação aos animais WT infectados. **DISCUSSÃO:** Nossos resultados demonstram que MIF tem um papel preponderante na indução da resposta inflamatória induzido pela infecção pelo vírus da Dengue. Estratégias farmacológicas baseadas na inibição do MIF podem ser úteis no tratamento de pacientes com as formas graves do Dengue. **Apoio Financeiro:** FAPEMIG, CNPq

07.011

ESTUDO DO BCG INATIVADO POR EXTENSO CONGELAMENTO A SECO - EFD BCG OU AQUECIMENTO -HK BCG, SOBRE A ATIVAÇÃO DO SISTEMA NADPH OXIDASE EM CÉLULAS U937 E CÉLULAS MONONUCLEARES HUMANAS

Moreira, J.¹; Vargaftig, B. B.²; Condino-Neto, A.³ - ¹USP - Imunologia; ²USP - Farmacologia; ³ICB - USP - Imunologia

Introdução: Observa-se relação inversa entre prevalência da asma e imunidade relacionada às doenças infecciosas, como as causadas por *Mycobacterium tuberculosis* (Shirakawa et al., 1997). Infecções bacterianas possuem potencial de restaurar o equilíbrio entre a resposta Th1 e Th2, importante no controle da asma (Oyama et al., 2001). A produção de superóxido pelos fagócitos se dá através do complexo protéico denominado sistema NADPH oxidase, ativado durante a fagocitose (Henderson & Chappel, 1996). A produção aumentada de ânion superóxido leva a diminuição da função adrenérgica no pulmão, aumento de permeabilidade vascular, produção de muco, fatores quimiotáticos, hiperreatividade brônquica, peroxidação lipídica (Hancock, 1997). **Objetivo:** Investigar efeitos do EFD BCG e HK BCG sobre a NADPH oxidase em células de linhagem U937 e células mononucleares de sangue periférico (PBMC) de doadores saudáveis. **Métodos:** PBMC humano e células de linhagem U937 foram incubadas em placas de 6 poços na concentração de 1×10^6 células/ml/poço, sozinhas ou com $IFN\gamma$ (100U/ml) e $TNF\alpha$ (1000U/ml), ou com diferentes preparações de BCG: EFD BCG ou HK BCG - 20 bactérias/célula. Atividade NADPH oxidase foi medida por liberação de superóxido - ensaio de redução do citocromo c, especificamente inibido por superóxido desmutase (SOD) e através da ativação da expressão gênica do componente gp91phox do sistema NADPH oxidase medida por PCR. **Resultados e Discussão:** A exposição das células U937 indiferenciadas às diferentes preparações de BCG não levou à ativação da NADPH-oxidase medida como liberação de superóxido. A co-incubação destas células com EFD BCG e $IFN\gamma/TNF\alpha$ resultou em aumento de ânion superóxido muito semelhante àquele observado nos grupos com $IFN\gamma/TNF\alpha$. No entanto, a co-incubação de HK BCG com $IFN\gamma/TNF\alpha$ produziu discreto aumento de superóxido em relação ao EFD BCG mais $IFN\gamma/TNF\alpha$. A exposição de PBMC ao EFD BCG induziu discreta inibição da expressão gênica do componente gp91phox do sistema NADPH oxidase medida por PCR. **Apoio Financeiro:** FAPESP

07.012

EFEITO DO VENENO DE *Bothrops lanceolatus* SOBRE A RESPOSTA IMUNE HUMORAL.

Carvalho, M.¹; Garcia, C. A. A. C.²; Araújo, P. M. F.³; Lôbo de Araújo, A.⁴ - ¹FCM - UNICAMP - Farmacologia; ²IB - UNICAMP - Microbiologia e Imunologia; ³UNICAMP - Microbiologia e Imunologia; ⁴UNICAMP - Farmacologia

Introdução: Venenos animais sempre instigaram a curiosidade dos pesquisadores devido ao grande número de acidentes. Buscando formas de evitar a letalidade de venenos como os de *Bothrops sp* (90,5% dos acidentes no Brasil; Fundação Nacional de Saúde 1998) desenvolveu-se os imunesoros heterólogos que podem causar hipersensibilidade e trazer complicações à vítima acidentada. Foi observado em nosso laboratório que os imunesoros produzidos para o veneno de *Bothrops lanceolatus* (*B.l*) possuem títulos baixos de anticorpos neutralizantes quando comparados com outras espécies do gênero. Com o propósito de analisar e potencializar o imunesoro para o veneno de *B.l* foi testado o efeito deste veneno frente à resposta imune humoral a antígenos não relacionados (Eritrócito de Carneiro [EC]). **Material e Métodos:** Inoculação prévia do veneno de *B.l* na dose de 4,8µg/g; i.p 72hs antes dos estímulos primário (EP) e secundário (ES) com EC i.p 2% em camundongos Swiss machos (3 e 7 meses). Os títulos de anticorpos anti-EC foram determinados pelo teste de hemaglutinação em microplacas. **Resultado** No EP reduziu em 4,5 vezes de 1/118,4 (controle) para 1/26,4 (n=5; P<0,05), e no ES reduziu em 2,6 vezes de 1/4096 (controle) para 1/1568 (n=4; P<0,05) quando comparados com o controle (apenas EC). **Discussão:** Estes resultados demonstram que existe algum componente no veneno da *B.l* que reduz a produção de anticorpos reativos, o que poderia justificar uma baixa eficácia do imunesoro.

07.013

INDUÇÃO DE INFLAMAÇÃO EOSINOFÍLICA PULMONAR CRÔNICA E PERSISTENTE NUM MODELO MURINO

Kabbara, M. F.¹; Vargaftig, B. B.²; Lima, C.³ - ¹Instituto Butantan - Imunopatologia; ²USP - Farmacologia; ³Butantan Institute - Immunology

A maioria dos modelos animais de inflamação pulmonar se restringem à verificação das alterações agudas desencadeadas após curtos períodos de exposição alergênica. **Objetivos:** O objetivo deste trabalho foi padronizar um modelo animal que reproduza a inflamação pulmonar crônica e persistente. **Métodos:** Camundongos BALB/c foram imunizados no dorso com implante subcutâneo de clara de ovo endurecida (EWI 10%) no dia 0. Por 3 dias consecutivos a partir do 14º dia, foram expostos ao desafio com OVA 1% aerossol por 20 minutos durante 3 semanas seguidas. Após 24h, 20 e 45 dias do último desafio eles foram sacrificados para obtenção do lavado broncoalveolar para contagem total e diferencial de células e do pulmão para dosagem de citocinas. IgG1 e IgE anti-OVA foram avaliados no plasma por ELISA e PCA e IgE total foi avaliado por ELISA no pulmão. **Resultados:** A exposição dos animais imunizados com EWI aos sucessivos desafios antigênicos foi capaz de induzir inflamação eosinofílica pulmonar, principalmente em 24h ($84,76 \pm 56 \times 10^5$) e 45d ($6,93 \pm 3 \times 10^5$). Após 45d dos sucessivos desafios os animais também apresentaram infiltrado de neutrófilos no pulmão ($128,52 \pm 106 \times 10^5$). IL-4 se manteve até 45d no pulmão ($57,6 \pm 12$, 60 ± 3 e $44,78 \pm 7$ pg/mL), IL-5 em 20d (66 ± 13 pg/mL) e IFN-g em 20 (135 ± 31 pg/mL) e 45 d (167 ± 35 pg/mL). Os níveis plasmáticos de IgG1 anti-OVA dosados por ELISA se mantiveram significativamente elevados por até 45d e a atividade anafilática caiu após 20d (títulos de PCA 1/80, 1/20 e <5). Quanto a IgE total, os sucessivos desafios induziram elevados níveis no pulmão até 45d ($57,63 \pm 16$, $39,57 \pm 3,4$ e $59,36 \pm 14$ ng/mL) e com atividade anafilática em todos os períodos (títulos 1/80, 1/40 e 1/40). **Conclusão:** Podemos concluir que a presença de eosinófilos, neutrófilos, IL-4, IFN-g e de IgE alérgeno específica por longos períodos de tempo podem ser responsáveis pelo desencadeamento do remodelamento pulmonar observado na asma crônica. **Apoio Financeiro:** Fapesp

07.014

BLOCKADE OF ALLERGEN-EVOKED T CELL PROLIFERATION AND CYTOKINE SECRETION BY LIDOCAINE AND DERIVATIVES

Olsen, P. C.¹; Costa, J. C. S.²; Fonseca, B.³; Viola, J. P. B.³; Serra, M. F.¹; Cordeiro, R. S. B.¹; Silva, P. M. R. e.¹; Martins, M. A.¹ - ¹FIOCRUZ - Fisiologia e Farmacodinâmica; ²FIOCRUZ - Síntese; ³INCA - Biologia Celular, CPQ

Introduction: The local anesthetic lidocaine has immunoregulatory effects on T cells from patients with allergic asthma although the mechanism is poorly understood. We thought to compare the inhibitory effect of lidocaine and derivatives, synthesized for reduced anesthetic activity, on allergen-induced lymphocyte proliferation and cytokine secretion *in vitro*. **Methods:** T cells recovered from lymph nodes of TCR Tg OVA (Do11.10) mice were exposed to OVA in the presence or absence of increasing concentrations of lidocaine, JM24-1 or JMF2-1 (100-600 μ M). T cell proliferation was assessed by measuring increases in ³H-thymidine uptake, whereas cytokine secretion was measured by commercial ELISA. Cell viability was evaluated by trypan blue exclusion. **Results:** We found that lidocaine, JM24-1 and JMF2-1 inhibited IL-4, IL-5 and IL-13 production as well as the T cell proliferative response triggered by OVA challenge. Furthermore, T cell response was clearly more sensitive to JM24-1 and JMF2-1 than to lidocaine. There was also a concentration- and time-dependent increase in the number of dead cells following these treatments, under conditions where the analogues were again more effective. **Conclusion:** These findings demonstrate that the proliferative response, cytokine production and survival of OVA-activated T cells are inhibited by lidocaine and non-anesthetic lidocaine derivatives. Therefore ability to interfere with T cell function of lidocaine is independent of its capacity to cause local anesthesia. **Supported by:** PDTIS, FAPERJ and CNPq

07.015

EFFECTS OF A CXCR2 ANTAGONIST ON BLEOMYCIN-INDUCED PULMONARY INJURY AND FIBROSIS

Russo, R. C.¹; Alessandri, A. L.¹; Roffe, E.¹; Soares de Souza, A. L.¹; Garcia, C. C.¹; Guabiraba, R.¹; Amaral, F. A.¹; Cassali, G. D.²; Bertini, R.³; Colotta, F.³; Teixeira, M. M.³ - ¹UFMG - Bioquímica e Imunologia; ²UFMG - Patologia Geral; ³Dompé Research and Development - Dompé S.p.A.

Introduction: Pulmonary fibrosis is characterized by progressive interstitial collagen deposition, leading to loss of function and death. Inflammation, chemokines and cytokines are thought to precede and be relevant for collagen deposition. The effects of DF2162, a CXCR2 antagonist, on bleomycin-induced pulmonary fibrosis were studied here. **Methods:** C57BL/6J mice received an intra-tracheal instillation of 0.125U of BLEO or PBS. DF2162 (1.2 -30 mg/kg, BID) or vehicle were given orally. **Results:** Treatment with DF2162 inhibited PMN migration to BAL at days 2 and 8 after BLEO in a dose dependent manner. Maximal inhibition occurred at 6 mg/kg. DF2162 also reduced collagen deposition and decreased production of the fibrogenic cytokine IL-13 and CCL5. Despite reduced fibrosis and early neutrophil influx, there was a higher rate in DF-2162 (67%) - than in the vehicle-treated group (25%). Higher mortality was associated with accumulation of neutrophils, as assessed by MPO measurements, and diminished IL-10 levels in lung tissue. **Conclusion:** We suggest that the inhibition of neutrophil influx secondary to blockade of CXCR2 diminishes bleomycin-induced lung fibrosis. However, this is accompanied by a persistence of neutrophils in lung tissue and diminished production of regulatory cytokines, such as IL-10 and IL-13. As consequence, the lethality rate of treated animals is enhanced. These results suggest that chronic blockade of neutrophils may be deleterious in chronic pulmonary fibrosis. **Supported by:** CAPES

07.016

ROLE OF CANNABINOID RECEPTORS IN AN EXPERIMENTAL MODEL OF INFLAMMATORY ANGIOGENESIS

Guabiraba, R.¹; Coelho, A. M.¹; Russo, R. C.¹; Barcelos, L. S.²; Andrade, S. P.³; Teixeira, M. M.¹ - ¹UFMG - Bioquímica e Imunologia; ²University of Bristol - Bristol Heart Institute; ³UFMG - Fisiologia e Biofísica

Introduction: Angiogenesis depends on a complex network of cells and mediators. The activation or blockade of cannabinoid receptors showed to be an interesting pharmacological strategy to attenuate the angiogenic and/or inflammatory response in many experimental models. Here we investigated how this strategy may interfere in inflammatory angiogenesis. **Methods:** Polyester-polyurethane sponges were implanted in C57BL/6 mice. Animals received daily doses (10 mg/kg, s.c.) of the cannabinoid antagonists SR141716A (CB₁) and SR144528 (CB₂), separately, or 3 mg/Kg (s.c.) of the cannabinoid CB₁/CB₂ agonist WIN 55212-2, for 7 or 14 days. The implants were then collected for ELISA, hemoglobin, myeloperoxidase and N-acetylglucosaminidase measurements, used as indexes for angiogenesis, neutrophil and macrophage accumulation, respectively. **Results:** CB₁ or CB₂ receptor antagonist treatment was able to reduce cellular influx to the sponge at 7 and 14 days, with distinctive pattern for macrophages and neutrophils. The CB₁/CB₂ agonist also reduced cellular influx. Both treatments affected angiogenesis. These alterations were accompanied by changes in the levels of TNF- α , VEGF, CXCL1-3/KC, CCL2/JE and RANTES in all treatments. **Discussion:** The blockade or activation of cannabinoid receptors showed to be effective in reducing inflammatory and angiogenic responses. Although acting in a similar way, different levels of cytokines and chemokines may help explain this paradoxal response. **Supported by:** CNPq

07.017

MECHANISMS BY WHICH THE FLAVONOID DIOCLEIN DECREASES CYTOKINES AND CHEMOKINES LEVELS IN VITRO

Guabiraba, R.¹; Campanha, A. L.¹; Souza, A. L. S.¹; Santiago, H. C.¹; Lemos, V. S.²; Teixeira, M. M.¹ -
¹UFMG - Bioquímica e Imunologia; ²UFMG - Fisiologia e Biofísica

Introduction: Dioclein is a flavonoid isolated from *Dioclea grandiflora*, a brazilian vine. Previous studies showed that dioclein has an important cardiovascular effect. Its possible antioxidant and anti-inflammatory effect, however, has not yet been evaluated. Here, we investigated whether dioclein exhibits such properties.

Methods: C57BL/6 mice peritoneal macrophages were cultured. Cells were treated with increased concentrations of dioclein and stimulated with LPS. Supernatant was collected after 24 hours. Cytokines and chemokines levels were determined by ELISA. Nitric oxide (NO) was assessed by Griess reaction. Cells were also treated with dioclein and stimulated with zymosan. Reactive oxygen species production was evaluated by luminol-dependent chemiluminescence assay. Antioxidant effects were also evaluated using the xanthine/xanthine oxidase (X/XO) lucigenin-dependent chemiluminescence assay. Inhibition of PDE4 by dioclein was evaluated by a binding assay. **Results:** Dioclein decreased LPS-induced production of NO, TNF- α and IL-6 in a concentration-dependent manner. Production of chemokines CXCL1-3/KC and CCL2/JE were also decreased. Dioclein were antioxidant, as evaluated by luminol-induced chemiluminescence assay and by X/XO system, similar to well-known positive controls (BHT and α -tocopherol). PDE4 was inhibited at concentrations similar to those resembling anti-inflammatory and antioxidant effects. **Discussion:** Dioclein may exhibit an anti-inflammatory activity trough a combined antioxidant and PDE4-inhibition property. These two major mechanisms could justify the ability of the flavonoid in decrease cytokines and chemokines levels. **Supported by:** CNPq

07.018

MODELO EXPERIMENTAL DE TUMOR DE PULMÃO EM RATO POR VIA INTRABRÔNQUICA.

Simão, A. F. L.¹; Bezerra, N. P.¹; Miranda, S. P.²; Mourao, L. T. C.¹; Almeida, P. R. C.³; Gomes Neto, A.¹; Albuquerque Ribeiro, R.¹ - ¹UFC - Fisiologia e Farmacologia; ²FM - UFC - Fisiologia e Farmacologia; ³UFC - Patologia

INTRODUÇÃO: O câncer de pulmão tem sido a principal causa de morte por câncer no mundo. Os avanços no seu tratamento têm sido lentos em parte pela escassez de modelos experimentais. O objetivo foi desenvolver um modelo de tumor de pulmão em rato que permita o teste de fármacos no tratamento deste câncer. **MÉTODOS:** Foram usados ratos Wistar (n=127), anestesiados com tribromo-etanol 2,5% IP (1ml/100g de rato), traqueostomizados e intubados para introduzir uma cânula fina até as porções inferiores do pulmão e injetavam-se as células do tumor de Walker. Na 1ª etapa, estabeleceu-se o número de células para um bom índice de pega tumoral, usando-se de 10^5 a 5×10^5 células. Na 2ª avaliou-se o volume tumoral(vt) por tomografia computadorizada(TC) no 5º dia de implante e comparou-se com as medidas obtidas na necropsia(ncp). Na 3ª avaliou-se o efeito de drogas (celecoxib-Clb, talidomida-Tal, gefitinib-Gfb e paclitaxel-Pcl), através da análise do vt e da sobrevivência(sob). **RESULTADOS:** O índice de pega do tumor variou de 72 a 100%; as medidas do tumor feitas na TC e comparadas com a ncp foram semelhantes ($r=0,953$, $p<0,0001$); o vt médio foi de $0,118 \text{ cm}^3$ e a sob mediana de 11 dias; a sob aumentou (teste de Log Rank: $p<0,05$) nos animais tratados com Tal, Gfb e Pcl. **DISCUSSÃO:** O modelo é de fácil execução, tem alto índice de pega e boa correlação dos dados da TC com os da ncp, podendo se constituir em uma alternativa para o estudo de tumores no pulmão. **Apoio Financeiro:** CNPq

07.019

ANÁLISE DA IMUNOMARCAÇÃO DO ANTÍGENO NUCLEAR DE PROLIFERAÇÃO CELULAR (PCNA) NO TECIDO EPITELIAL DE FERIDAS CIRÚRGICAS TRATADAS COM LASERTERAPIA DE BAIXA INTENSIDADE (AsGa-Al-810nm)

Caçula, K. G.¹; Frigo, L.¹; Rocha, S. O.²; Lopes-Martins, R. A. B.³ - ¹Universidade Cruzeiro do Sul - Centro de Ciências Biológicas e da Saúde; ²UNIFESP - EPM - Fisiologia; ³USP - Farmacologia

Introdução: A laserterapia de baixa intensidade é aplicada na clínica como terapêutica adjuvante nos processos de reparação tecidual. Tem sido utilizada com grande eficácia em úlceras rebeldes, pós-operatório cirúrgico e ulcerações de pés diabéticos. Considerável corpo de evidência tem se acumulado na pesquisa experimental para apoiar sua utilização clínica. Estudos histológicos e em culturas de células, principalmente, com fibroblastos dão suporte a esta utilização. Entre os processos de grande importância para o fechamento da ferida ou úlcera está o crescimento do tecido epitelial. **Objetivo:** Avaliar o crescimento do tecido epitelial em feridas cirúrgicas em ratos por meio da análise da imunomarcação do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA). **Metodologia:** 10 *Rattus norvegicus* anestesiados com ketamina/xilazina e receberam uma incisão cirúrgica na região dorsal. Foram separados em dois grupos, sendo que um deles recebeu laserterapia de baixa intensidade com laser de ArGa-Al – 810nm, dose total de 3J por dois dias consecutivos. Os animais foram sacrificados e tiveram o fragmento da pele da região da lesão removido para preparo dos cortes histológicos e imunomarcação com anticorpo monoclonal do tipo IgG de camundongo, clone PC 10 (1:500) e revelados com anticorpo secundário, peroxidase, diaminobenzidina e peróxido de hidrogênio. A análise preliminar dos cortes histológicos foi realizada em microscópio de luz branca. **Resultados Parciais:** A análise das lâminas mostrou evidente imunomarcação das células epiteliais, sendo que a quantidade de células imunomarcadas com anti-PCNA apresentou-se notadamente superior no grupo que recebeu a laserterapia de baixa intensidade. **Discussão:** Nossos resultados estão de acordo com os trabalhos da literatura que apontam a laserterapia como um potencial agente indutor de proliferação celular. **Apoio Financeiro:** CNPq; PIBIC/UNICSUL

07.020

A HIGHER *DNMT3B* EXPRESSION CORRELATES WITH A LOWER EXPRESSION OF *p14^{ARF}* AND *p16^{INK4a}* IN ESOPHAGEAL CANCER

Simao, T. A.¹; Ribeiro, F. S.¹; Fierro, I. M.²; Ribeiro-Pinto, L. F.¹; Albano, R. M.¹ - ¹UERJ - Bioquímica; ²UERJ - Farmacologia

Introduction: Esophageal cancer is the sixth cause of cancer-related death in the world. Epigenetic alterations are important events in cancer development, including aberrant methylation of CpG islands, which is a common way of inactivating tumor suppressor genes in these malignancies. Cytosine methylation is established and maintained by a family of DNA methyltransferase enzymes. Hypermethylation of CpG dinucleotides initiates the formation of a protein complex, including proteins who bind these methylated residues (MBDs and *MeCP2*), leading to transcriptional repression. **Methods:** We investigated, by RT-PCR, the expression of human *DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B*, *MBD1*, *MBD2*, *MBD3*, *MBD4* and *MeCP2* in normal esophageal mucosa. Then, we analyzed the mRNA expression of these DNMTs, *esophagin*, *p14^{ARF}*, *p16^{INK4a}* and *E-cadherin* in 17 matched esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) and matched normal mucosal samples. **Results:** *Esophagin* expression was either absent or reduced in 64.7% ESCC samples. The expression of *p14^{ARF}* and *p16^{INK4a}* was absent or reduced in 52.9% and 58.8% ESCC samples, respectively. Only 11.7% ESCC samples showed reduced levels of *E-cadherin* mRNA. The correlation between mRNA expression of the DNMTs and these genes was analyzed by the Spearman rank test. Expression was inversely correlated for *DNMT3B* and *p14^{ARF}* and *p16^{INK4a}*. **Discussion:** The results suggest that *DNMT3B* overexpression may be involved in the suppression or lower expression of *p14^{ARF}* and *p16^{INK4a}* seen in esophageal ESCC. **Supported by:** FAPERJ / CNPq

07.021

CHRONIC INGESTION OF ALCOHOLIC DRINKS INDUCES ALTERATIONS IN CORPORAL WEIGHT AND IN THE CONSUMPTION OF FOOD AND LIQUID

Ferreira, M. B. B.¹; Souto, T. S.¹; Rosa, M. L.¹ - ¹FAMECA - Ciências Biofisiológicas

Introduction: The aim of this work was to investigate whether the corporal weight and the consumption of food and liquid are differently affected by chronic ingestion of different types of usual alcoholic drinks.

Methods: Rats (150g, n=8) were treated with water (control) or 5%-20% of ethanol (E), sugar-cane liquor (S), vodka (V) or whisky (W), increasing 5% per week (habituation), and 20% maintained for 15 days (chronic ingestion). The corporal weight (each 5 days) and the food and liquid consumption (daily) were measured in the control (C) and alcoholic (E, S, V or W) animals. **Results:** The corporal weight of both control and alcoholic animals increased in a different way ($p=0.05$, Anova followed by Duncan test) during the chronic period of treatment (E = $369,4\pm 75,7$; S = $409,5\pm 65,3$; V = $403,75\pm 59,5$; W = $417,5\pm 47,9$; C = $437,4\pm 43,6$). The alcoholic animals also consumed significant less food (E = $15,7\pm 1,0$ g; S = $16,5\pm 1,3$ g; V = $16,6\pm 1,2$ g; W = $17,3\pm 1,0$ g; C = $28,0\pm 1,6$ g) and liquid (E = $28,1\pm 2,5$ ml; S = $27,0\pm 1,8$ ml; V = $29,4\pm 1,9$ ml; W = $30,1\pm 2,2$ ml; C = $50,2\pm 4,1$ ml) than the control animals ($p<0.0001$, Anova followed by Duncan test) and such consumption was similar for all alcoholic groups. **Discussion:** These results show that chronic ingestion of different alcoholic drinks affects both corporal weight gain and food and liquid daily consumption. In addition, the corporal weight gain of the animals drinking ethanol was lower than all other alcoholic groups even with similar consumption of food and liquid. **Conclusion:** Alcoholic drinks of social consumption may be more suitable than ethanol for studying the effects of chronic alcoholism experimentally. **Supported by:** Fundação Padre Albino