

06. Farmacologia da Inflamação

06.001
PRÊMIO INOVAÇÃO

06.002
PRÊMIO INOVAÇÃO

06.003

Análise do efeito de nanocápsulas contendo indometacina em um modelo de poliartrite em ratos. Zilberstein, A. C. C. V.¹; Bernardi, A.²; Jager, E.³; Guterres, S. S.⁴; Pohlmann, A.⁵; Calixto, J. B.⁶; Morrone, F. B.⁷; Battastini, A. M. O.⁸; Campos, M. M.⁹ - ¹PUCRS - Farmácia; ²UFRGS - Bioquímica; ³UFRGS - Farmácia; ⁴UFRGS-PPGCF; ⁵UFRGS - Ciências Farmacêuticas; ⁶UFSC - Farmacologia; ⁷PUCRS - Farmácia; ⁸UFRGS - Bioquímica; ⁹PUCRS - Cirurgia-Odontologia

Introdução: Nanopartículas são sistemas carreadores de fármacos com diâmetro inferior a 1 µm, podendo ser constituídos de polímeros biodegradáveis (Pohlmann et al., Eur. J. Pharm. Sci., 16, 305, 2002). Tem sido sugerido que antiinflamatórios não-esteróides nanoencapsulados, podem apresentar maior eficácia, com importante redução nos efeitos adversos (Guterres et al., Pharm. Sci., 11, 229, 2001). O presente estudo comparou a eficácia antiinflamatória da indometacina em nanocápsulas, com aquela observada para o mesmo fármaco em solução em um modelo de poliartrite em ratos. **Métodos:** As nanocápsulas contendo indometacina foram preparadas pelo método de nanoprecipitação de polímeros biodegradáveis pré-formados (Fessi et al., Int. J. Pharm., 113, r1-r4, 1989). Foram utilizados ratos machos Wistar (N= 5-8 por grupo; 180–200 g). Os animais receberam uma injeção intraplantar contendo 200 µl de adjuvante completo de Freund (CFA; diluído 1:1 em salina). O edema de pata foi medido em pletismômetro entre 14 e 21 dias após a administração de CFA. Os animais foram tratados com indometacina em solução (IndOH) ou indometacina em nanocápsulas (IndOH-NC) (1 mg/kg, i.p.) durante todo o período de avaliação. Ao final dos 21 dias, os animais foram submetidos à eutanásia e o soro foi coletado para análise de citocinas através de ELISA. Diferentes porções do intestino delgado foram avaliadas em relação à toxicidade gastrointestinal. **Resultados:** No modelo de poliartrite induzido pelo CFA, o tratamento com IndOH-NC (1 mg/kg, i.p., 2 vezes ao dia, 14 dias após o CFA, por 8 dias) causou redução do edema de pata induzido pelo CFA que foi significativamente superior àquela obtida com IndOH (35 ± 2 % e 14 ± 3 %, respectivamente; P < 0,05). O tratamento com IndOH-NC produziu uma redução significativa dos níveis das citocinas pró-inflamatórias IL-6 e TNFα (84 ± 11% e 83 ± 8%, respectivamente), associada a um aumento dos níveis da citocina antiinflamatória IL-10 (196 ± 55%). Por outro lado, a produção destas citocinas não foi alterada de maneira significativa pela administração de IndOH (P > 0,05). Além disso, foi observada uma redução significativa dos índices lesionais no intestino delgado dos animais tratados com IndOH-NC (68 ± 5%), em comparação aos animais tratados com IndOH. **Discussão:** Os resultados apresentados mostram que a IndOH-NC apresenta eficácia antiinflamatória superior àquela observada para o mesmo fármaco em solução, com uma redução marcante dos efeitos tóxicos sobre o trato gastrointestinal. Apoio Financeiro: CNPq, CAPES, PRONEX, BPA-PUCRS

06.004

Alterações na sinalização da insulina no tecido adiposo mesentérico durante a inflamação intestinal. De Oliveira, C. C.¹; Acedo, S. C.¹; Pedrazzoli, J. Jr.¹; Saad, M. J. A.²; Gambero, A.¹
¹USF-UNIFAG; ²UNICAMP - Clínica Médica

Introdução: Sabemos atualmente que o tecido adiposo mesentérico se modifica frente a patologias como a doença de Crohn, expandindo-se e produzindo adipocitocinas. A produção de adipocitocinas pode influenciar de maneira autócrina e parácrina a sinalização da insulina no tecido adiposo. O objetivo deste trabalho foi estudar a sinalização da insulina no tecido adiposo mesentérico (TAM), em animais com inflamação intestinal onde se observou o aumento da secreção de TNF- α (Gambero e col., *Inflam. Bow. Dis.*,13:1357, 2007). Outros marcadores inflamatórios também foram estudados. **Métodos:** Foram usados ratos Wistar que receberam 3mg de ácido trinitrobenzenosulfônico (TNBS; via intracolônica) em intervalos de 14 dias. Os controles receberam salina. Amostras de TAM foram coletadas antes e após a administração de 10U de insulina i.v. A análise da via de sinalização da insulina (IRS/AKT) e marcadores inflamatórios foi realizada por Western blot. A colite foi caracterizada pela presença de lesões e pela atividade de mieloperoxidase no colon (infiltrado de neutrófilos). **Resultados:** Os animais com colite apresentaram escore de lesões de $4,3 \pm 0,6$ frente ao escore de $1,0 \pm 0,2$ observado nos controles ($n=5$; $p<0,05$). O infiltrado de neutrófilos foi maior nos animais com colite ($13,3 \pm 3,8$ e $2,1 \pm 0,3$ U MPO/mg no grupo colite e controle, respectivamente; $n=5$; $p<0,01$). A administração de insulina resulta em fosforilação em tirosina do Substrato de Receptor de Insulina (IRS)-1 no TAM de animais controle, mas não de animais com colite ($0,76 \pm 0,15$ e $1,22 \pm 0,23$ Unidades Arbitrárias (UA) de fosfo-IRS-1/IRS-1 antes e após insulina no TAM de controles e, $1,28 \pm 0,21$ e $1,31 \pm 0,18$ UA de fosfo-IRS-1/IRS-1 antes e após insulina no TAM de colites; $n=4$; $p<0,05$). A fosforilação da AKT também não foi observada nos animais com colite. No TAM de animais com colite foi observado um infiltrado de macrófagos ($0,8 \pm 0,2$ e $1,3 \pm 0,1$ UA de F4/80/b-Actina no TAM de controle e colite, respectivamente; $n=4$; $p<0,01$). A atividade da JNK (jun-n terminal quinase) também foi maior no TAM de animais com colite ($0,9 \pm 0,1$ e $1,2 \pm 0,1$ UA de fosfoJNK/JNK no TAM de controle e colite, respectivamente; $n=4$; $p<0,05$). **Discussão:** O TAM torna-se resistente a sinalização da insulina via IRS/AKT durante a colite experimental devido à alterações inflamatórias presentes neste local, como atividade de JNK e o infiltrado de macrófagos. Esta resistência pode estar relacionada à alterações na fisiologia dos adipócitos, resultando por exemplo, na modificação da liberação de ácidos graxos com atividade imunomoduladora durante o processo inflamatório intestinal. Apoio Financeiro: FAPESP

06.005

Efeito da sinvastatina, da ezetimiba e da associação ezetimiba/sinvastatina sobre a artrite por adjuvante. Bracht, L.¹; Caparroz-Assef, S. M.²; Magon, T. F. S.²; Bersani-Amado, C. A.² - ¹Faculdade Integrado de Campo Mourão - Farmácia; ²UEM - Farmácia e Farmacologia

Introdução: Estudos experimentais e clínicos sugerem que as estatinas, agentes frequentemente prescritos para o tratamento da hipercolesterolemia, apresentam uma ação antiinflamatória e imunomoduladora devido a um comprometimento na via de síntese do L-mevalonato e inibição da prenilação da família Rho GTPases, interferindo na secreção de citocinas e na migração e função de leucócitos. O uso da terapia combinada de um redutor da absorção intestinal de colesterol com uma estatina (ezetimiba/sinvastatina), parece promover um maior controle dos lipídeos séricos, entretanto, o efeito antiinflamatório desta associação não foi ainda investigado. Assim, o objetivo deste estudo foi investigar comparativamente os efeitos da sinvastatina, da ezetimiba e da associação ezetimiba/sinvastatina sobre a artrite induzida por adjuvante (AIA), um modelo experimental utilizado para a avaliação do efeito antiinflamatório de fármacos. **Métodos:** A artrite foi induzida em ratos Holtzman, machos, (200-220 g), através da injeção intradérmica de adjuvante completo de Freund (Sigma[®]) na pata posterior esquerda. O tratamento dos animais com sinvastatina (40 mg/kg), ezetimiba (10 mg/kg) e ezetimiba/sinvastatina (10/20 mg/kg, 10/40 mg/kg), via oral, em dose única diária, foi iniciado no dia da injeção do adjuvante e continuado por 28 dias. O processo inflamatório foi acompanhado através das medidas do volume de ambas as patas posteriores, com auxílio de um pletismógrafo digital. No final do período experimental foram avaliados os níveis séricos de colesterol total e HDL dos animais. **Resultados:** O tratamento com sinvastatina promoveu uma diminuição do volume de ambas as patas, embora estes resultados não tenham sido estatisticamente significativos. Por outro lado, o tratamento com ezetimiba não reduziu o edema de ambas as patas. A associação ezetimiba/sinvastatina nas doses de 10/20 e 10/40 mg/kg inibiu significativamente a intensidade do edema da pata injetada, promovendo uma redução de 39% e 52% no 13º dia ($p < 0,001$), 31% e 47% no 21º ($p < 0,05$) e 33% e 34% no 28º dia ($p < 0,01$), respectivamente. O edema na pata direita (não-injetada) foi quase completamente suprimido pelo tratamento com ambas as doses da associação. O efeito antiinflamatório observado parece ser independente da ação hipolipemiante das estatinas, uma vez que não foi observada uma redução dos níveis séricos de colesterol nos animais. **Conclusão:** Os resultados indicam que a associação de fármacos com mecanismos de ação em diferentes vias metabólicas, como os utilizados neste estudo, pode resultar em benefícios adicionais, podendo ser utilizados como alternativa terapêutica no tratamento de doenças inflamatórias crônicas. Apoio Financeiro: Apoio CNPq/UEM, Faculdade Integrado de Campo Mourão.

06.006
PRÊMIO INOVAÇÃO

06.007

B₁ AND B₂ kinin receptors participation in hyperproliferative and inflammatory skin process in mice. Pietrovski, E. F.¹; Otuki, M. F.¹; Regoli, D.²; Pesquero, J. B.³; Zamprônio, A. R.¹; Cabrini, D. A.¹ - ¹UFPR - Farmacologia; ²UNIFE - Farmacologia; ³UNIFESP - Biofísica

Introduction: Bradykinin and kallidin are released during dermal injury and inflammation as a result of activation of kallikreins which cleave high- and low- molecular weight kininogen, respectively. In the skin, kinins play a role in the mediation of cutaneous responses as reactive cell proliferation, pain and inflammation. The role of kinins in inflammatory skin process is poorly understood but is probable that kinins contribute to the pathogenesis of cutaneous diseases.

Methods: Male and female Swiss or wild type (WT), B₁ knockout mice (B₁^{-/-}), B₂ knockout mice (B₂^{-/-}) and double knockout (B₁B₂^{-/-}) mice (25-35 g) were used. Ears thickness was measured before and 6 h after induction of acute skin inflammation with TPA (2.5 mg/ear), using a digital micrometer (Great, MT-045B). In acute model, Hoe140 (100 nmol/kg) and des-Arg⁹-[Leu⁸]-BK (1000 nmol/kg) were administered i.p. 15 min before TPA application. SSR240612 (0.1 mg/ear) and FR173657 (0.1 mg/ear) were applied topically 5 min after TPA. In the chronic model of inflammation using knockout mice, TPA (2 mg/ear) was applied in an alternate manner during 9 days and the edema was measured daily. After chronic application, animals were sacrificed and biopsies were collected for histological analysis and for evaluation of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expression by western blot. **Results:** All kinin receptor antagonists did not inhibit the acute TPA-induced oedema and experiments on knockout mice confirmed the lack of kinin system participation in acute model. However, in chronic cutaneous inflammation induced by multiple application of TPA, the B₁^{-/-} and B₂^{-/-} animals showed a significant increase of ear oedema and epidermal cellular hyperproliferation. Curiously, the B₁B₂^{-/-} did not present significant alteration on these parameters. When PCNA levels were evaluated, B₁^{-/-} and B₂^{-/-} mice show a significant increase of PCNA expression (14.42% and 33.51%, respectively) while a significant reduction was observed in B₁B₂^{-/-} mice (24.83%) indicating a smaller cellular proliferation when compared with WT. In the histological analysis WT, B₁^{-/-}, B₂^{-/-} presented pronounced acanthosis (epidermal hyperplasia) which was significantly reduced in B₁B₂^{-/-} animals. **Discussion:** Kinin receptors are present in the skin organization and clearly participate in chronic skin inflammatory process. Therefore, kinin receptors seem to be involved in the control of the hyperproliferative process of cutaneous keratinocytes and further investigation is necessary to clarify this hypothesis. **Support** : Sanofi-Aventis, Astellas Pharma Inc., CNPq, CAPES.

06.008

Efeitos da crotoxina e de suas subunidades (CA e CB), isoladas do veneno de *Crotalus durissus terrificus*, sobre células endoteliais em cultura. Matsubara, M. H.; Lima, S. A.; Teixeira, C. F. P. Instituto Butantan - Farmacologia

Introdução: A crotoxina (CTX), componente majoritário do veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus* (VCdt), é constituída de duas subunidades: a crotapotina (CA) e a fosfolipase A₂ (FLA₂ ou CB). É conhecido que estes componentes, quando isolados, exercem efeitos distintos do complexo CTX. No presente estudo, avaliamos os efeitos das subunidades CA e CB, da crotoxina, no metabolismo, na integridade e viabilidade de células endoteliais em cultura. **Métodos:** Células endoteliais (CEs), da linhagem tEnd, foram cultivadas em meio de cultura RPMI-1640, com 10% de soro fetal bovino e semeadas em microplacas de 96 poços, para a formação de monocamadas. Após atingirem confluência (48 horas), as CEs foram incubadas com a FLA₂ ou a crotapotina, ambas nas concentrações de 1, 2 e 4 mM, ou RPMI apenas (controle). Decorridas 24 horas, a citotoxicidade foi avaliada pelo ensaio enzimático da lactato desidrogenase (LDH), a atividade metabólica pela redução do sal de tetrazolium (MTT) e a integridade das monocamadas, pelo ensaio do cristal violeta. **Resultados:** A FLA₂, em todas as concentrações estudadas, não afetou o metabolismo das células endoteliais, porém, causou aumento da liberação de LDH (180, 289 e 174%), em comparação aos controles. Nas concentrações de 2 e 4 mM, a FLA₂ diminuiu significativamente a integridade das monocamadas celulares, na ordem de 35 e 42%, em relação aos controles, respectivamente. A crotapotina, por sua vez, nas concentrações utilizadas, não afetou nenhum dos parâmetros celulares avaliados. **Discussão:** Os resultados obtidos indicam que a FLA₂, mas não a crotapotina, exerce efeitos diretos sobre as células endoteliais, que resultam em perda da viabilidade e da integridade do endotélio. Tais efeitos são semelhantes aos anteriormente demonstrados para o VCdt, mas não para a CTX. Desse modo, sugere-se que a FLA₂, quando dissociada da crotapotina, seja um componente importante para os efeitos deletérios do veneno total sobre o endotélio. Apoio Financeiro: FAPESP e CNPq

06.009

Effect of statins on acute pancreatitis in rats. Marangoni, F. A.; Ferreira, T.; Antunes, E.; Nucci, G. de; Landucci, E. C. T. - UNICAMP - Farmacologia

Introduction: Statins are lipid-lowering drugs with anti-inflammatory and antioxidant properties. Statins therapy increases the adverse effects in patients taking these drugs. Some clinical trials report that one of the main adverse effects in statin-treated patients is the pancreatitis development. However, these studies are controversial because the correlation of pancreatitis with statin intake is unclear. We have investigated the effects of pretreatment of rats with atorvastatin in the experimental pancreatitis induced by sodium taurocholate in rats. **Methods:** Treated animals received atorvastatin by oral gavage (10 mg/kg/day) 14 days prior to pancreatitis induction. The bile salt sodium taurocholate (5%, 0.3 mL) were injected into the pancreatobiliary duct of anaesthetized rats in a steady manual pressure over a period of 60 sec. Control animals were injected into the pancreatobiliary duct with sterile saline (0.9%). Four h later, the pancreatic plasma protein extravasation (PPE), pancreatic and lung myeloperoxidase (MPO) were measured. **Results:** Injection of sodium taurocholate in the common bile duct of rats caused a significant increase in the PPE (153 ± 15 mL), pancreatic MPO (1.3 ± 0.1 UMPO/mg) and lung MPO levels (25.8 ± 1.0 UMPO/mg of tissue) when compared with saline-injected groups (112 ± 2.7 μ L; 0.6 ± 0.2 and 20.3 ± 0.4 UMPO/ mg of tissue, respectively). Pretreatment with atorvastatin itself for 14 days did not cause pancreatitis in any animal. On the other hand, treatment with atorvastatin for 14 days significantly reduced ($P < 0.05$) the PPE, pancreatic MPO and lung MPO induced by sodium taurocholate (88.5 ± 4.0 mL; 0.6 ± 0.3 and 20.6 ± 1.9 UMPO/mg, respectively). **Conclusion:** Our studies show that pretreatment with atorvastatin alone does not evoke pancreatitis, but it rather significantly attenuates the pancreatitis induced by sodium taurocholate in rats. Apoio Financeiro: FAPESP

06.010

Redução da inflamação alérgica pulmonar em ratos após exposição ao formaldeído: papel do óxido nítrico e de moléculas de adesão. Lino dos Santos Franco, A.; Breithaupt-Faloppa, A. C.; Domingos, H. V.; Oliveira-Filho, R. M.; Tavares de Lima, W. ICB-USP - Farmacologia

Introdução: O formaldeído (FA) é um poluente ambiental presente em materiais de construção, produtos de madeira, cosméticos, laboratórios de patologia, histologia e anatomia. É emitido também na queima do gás de cozinha e na fumaça do cigarro. A exposição ao FA causa risco à saúde constituindo importante fator de origem de asma ocupacional e ambiental. Considerando a relação entre exposição ao FA e asma, nós investigamos a participação do FA sobre a resposta alérgica pulmonar avaliando a expressão de E-selectin, ICAM-1, VCAM-1 e PECAM-1 no pulmão, bem como a liberação de nitritos em sobrenadante de cultura de células obtidas do lavado broncoalveolar (LBA). **Métodos** Ratos Wistar machos foram divididos em 4 grupos: FA, ratos expostos ao FA (1%, 90 min, 3 dias); FA/OVA, ratos sensibilizados e desafiados com ovoalbumina (OVA) (1%, 15 min) após a inalação com FA; OVA/OVA, ratos sensibilizados e desafiados com OVA e ratos não manipulados (Basal). Após 24 h da última exposição ao FA ou do desafio com OVA o LBA foi realizado e as células recuperadas foram incubadas por 24 h. O sobrenadante foi recolhido para quantificação de NO₂. Ainda, em outra série de experimentos, os pulmões foram removidos para realização de imunohistoquímica. **Resultados:** A expressão de VCAM-1 e PECAM-1 foram aumentadas no grupo FA (158 ± 2.3; 181 ± 0.8 unidades arbitrárias) em relação ao grupo basal (152 ± 0.5; 163 ± 1.15). A interação FA/OVA reduziu a expressão de ICAM-1, PECAM-1 e VCAM-1 (136 ± 0.4; 162 ± 2.02; 145 ± 0.8) em relação aos grupos FA (156 ± 2.08; 158 ± 2.3; 181 ± 0.8) e OVA/OVA (155 ± 2.32; 181 ± 1.1; 157 ± 0.8). A expressão de E-selectina não foi alterada nos grupos estudados. Com relação a liberação de NO₂, notamos aumento no grupo FA (26,8 ± 6,1µM/2x10⁶cell) em relação ao grupo basal (9,6 ± 2,5). O grupo FA/OVA aumentou a liberação de NO₂ (59,7 ± 7,9) em relação aos grupos FA e OVA/OVA (6,8 ± 2,5). **Conclusões:** Nossos dados sugerem que o FA interfere na resposta inflamatória pulmonar desencadeada pela OVA. O aumento na liberação de NO₂ parece modular negativamente a expressão de ICAM-1, PECAM-1 e VCAM-1 acarretando em redução da celularidade pulmonar após o desafio com OVA. Assim, é relevante investigar a imunidade de indivíduos alérgicos que estão expostos ao FA Apoio Financeiro: CAPES e CNPq.

06.011

Impact of an ambient pollutant, 1,2-naphthoquinone exposure, at a neonatal period, on allergic response at a late stage. Santos, K. T.¹; Câmara, P. R. S.²; Camargo, E.³; Oliveira, J. F. de¹; Muscará, M. N.¹; Costa, S. K. P.¹ - ¹USP - Farmacologia; ²UNICAMP - Clínica Médica; ³UNICAMP - Farmacologia

Introduction: many inflammatory conditions (e.g. asthma) have been associated with exposure to ambient air pollutants such as diesel exhaust particles (DEP) and reactive chemical compounds (e.g. 1,2-naphthoquinone; 1,2-NQ)¹. We showed that 1,2-NQ co-injected with DEP into the rat trachea exacerbated the inflammatory response evoked by DEP². This study evaluated the influence of 1,2-NQ in mice, at neonatal stage, in response to ovalbumin (OVA)-induced allergic inflammatory response at a late livelihood stage. **Methods:** neonate (2-3g) or adult mice (30-35 g) were exposed to aerosolized 1,2-NQ (158 ng/10ml) or vehicle solution (PBS:Tween 80:DMSO) for 15 min daily for three days. Eight weeks later, these animals were sensitized with OVA (10µg/0.2 ml PBS, s.c.) and on 14 day challenged with OVA (1%) or PBS during 20 min. After 24 h, mice were submitted to aerosolized metacholine (MCh) in increasing concentrations (100µL of 3,12-50 mg/ml; 5 min) to induce bronchoconstriction. Readings were taken and enhanced pause (Penh) was measured as an indicator of bronchoconstriction (increase of airway resistance). The animals were killed, bronchoalveolar lavage (BAL) collected and total and differential cell counts evaluated. **Results:** neonate exposure to 1,2-NQ followed by sensitization/challenge with OVA/OVA in the adult stage significantly increased ($P < 0.01$) total cells (TC), lymphocytes (LP) and eosinophils (EO) counts in BAL (TC: 69 ± 6 , LP: 21 ± 2 and EO: $18 \pm 3 \times 10^4$ cells/BAL) when compared to mice exposed to pollutant vehicle, as neonates, and OVA/OVA in the adult life (TC: 58 ± 2 , LP: 10 ± 1 and EO: $8 \pm 2 \times 10^4$ cells/BAL) or neonate animals exposed to 1,2-NQ and OVA vehicle at a late stage (TC: 24 ± 2 ; LP: 2 ± 1 ; EO: $1 \pm 0.2 \times 10^4$ cells/BAL). MCh caused a significant concentration-dependent bronchoconstriction in allergic mice previously exposed as neonate (or not) to 1,2-NQ compared to animals exposed to the vehicle of pollutant group. No significant differences were observed between leukocyte counts or airway responsiveness of adult mice exposed or not to 1,2-NQ and subsequently sensitized/challenged with OVA. **Discussion:** short exposure to 1,2-NQ at an early stage, but not during a late stage of life, induced a significant increase of inflammatory cells (mainly LP and EO) into the BAL in response to an allergic stimuli, without affecting the increase of airway resistance to MCh. **References:** 1. Hamada, K. et al. (2007); *J Toxicol Environ Health A*; 70(8):688-95; 2. Teles, AM. et al. (2006); 38 Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental. SBFTE: Eventus, p. 36. **Acknowledgments:** CNPq, FAPESP. We thank MAAG Barreto and SA Teixeira for technical assistance. Apoio Financeiro: CNPq, FAPESP

06.012

Obesity enhances the eosinophilic inflammation in a murine allergic asthma model. Calixto, M. C.¹; Lintomen, L.¹; Saad, M. J. A.²; Antunes, E.¹ - ¹UNICAMP - Farmacologia; ²UNICAMP - Clínica Médica

Introduction: Epidemiologic data have indicated that obesity increases the prevalence and incidence of allergic asthma. Although obesity is reported to initiate a state of low-grade systemic inflammation that may act on the lung to exacerbate asthma, little is known about the pathophysiological mechanisms underlying the cross-talk between obesity and asthma. The scarcity of information reflects in part the lack of experimental models mimicking the asthma responses in obese individuals. Recent studies have shown that genetically obese mice exhibit innate airway hyperresponsiveness (Shore et al., 2003; Johnston et al., 2006), but little attention has been given to the allergic pulmonary leukocyte recruitment in obese animals. Since selective accumulation of eosinophils into the airways has become a central concept of the asthma pathology, this study was designed to investigate the time-course eosinophil influx into lungs of diet-induced obese mice. **Methods and Results:** Male C57bl6/J mice (initial weight 14.5 ± 0.9 g) received a high fat diet for 10 weeks. On the eighth week, animals were sensitized with a s.c. injection of OVA (100 μ g dissolved in Al(OH)₃). Two weeks thereafter, mice were then intranasally challenged with OVA (10 μ g), after which eosinophil counts in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) and bone marrow were evaluated. Peripheral blood was collected to measure the lipid. High-fat diet mice showed a significant increase in body weight and epididymal fat, as well as in total serum cholesterol concentration compared with non-obese groups. Intranasal challenge with OVA in previously sensitized mice largely increased the eosinophil (EO) counts in BALF at 48 h and 72 h post-OVA challenge (0.7 ± 0.06 and $0.12 \pm 0.03 \times 10^6/\text{ml}$, respectively) compared with non-sensitized-control mice (0.01 ± 0.01 and $0.01 \pm 0.01 \times 10^6/\text{ml}$ respectively). At 72 h post-OVA challenge, obesity potentiated by 80% ($P < 0.01$) the EO counts in BALF. In bone marrow, a significant increase in EO counts ($2.2 \pm 0.4 \times 10^6/\text{ml}$) was also found in obese compared with non-obese mice ($0.3 \pm 0.1 \times 10^6/\text{ml}$). The levels of TNF- α , IL-6 and IL-10 are significantly increased in sensitized obese mice. **Conclusion:** We have established an experimental model in C57bl6/J obese mice that clearly show a potentiation of EO influx in response to OVA challenge. Measurements of levels of IgE, other Th2 cytokines in BAL fluid/serum, as well as histological studies have been currently performed to further elucidate the mechanisms determining the relationship between obesity and asthma. Apoio Financeiro: Financial support: CAPES

06.013

Papel modulador do estradiol na ativação leucocitária após isquemia/reperfusão intestinal. Floriano, S. M.; Rodrigues Coelho, F.; Breithaupt-Faloppa, A. C.; Vitoretti, L. B.; Oliveira-Filho, R. M.; Tavares de Lima, W. - ICB-USP – Farmacologia

Introdução: Neutrófilos (PMN) ativados em decorrência da isquemia/reperfusão (I/R) intestinal são seqüestrados para o pulmão e seus produtos tóxicos são potenciais indutores de lesão pulmonar microvascular. Assim, em eventos inflamatórios, observa-se a geração de mediadores e fatores de crescimento que interagem com as células endoteliais (interação leucócito-endotélio). Evidências indicam papel modulador dos hormônios sexuais femininos na asma e na lesão pulmonar decorrente do choque hemorrágico. Estudos também mostram efeitos que os hormônios sexuais femininos em machos reduz a adesão de PMN ao endotélio. O objetivo do presente estudo foi avaliar o papel do estradiol na interação leucócito-endotélio decorrente de I/R intestinal. **Métodos:** Grupos de ratas foram anestesiados e submetidos à oclusão da artéria mesentérica superior por 45 min, seguida por reperfusão intestinal por 2 h. Ratos machos foram tratados com estradiol (1,4 mg/kg) 18 h antes da I/R intestinal. PMN circulantes foram obtidos após o período de reperfusão intestinal e incubados com monocamadas de células endoteliais (HUVEC) por 4 h. O descolamento endotelial foi avaliado por meio da redução da densidade óptica em relação à monocamada controle. A expressão de PECAM-1 por estas células foi avaliada por meio de ensaios imunohistoquímicos. A avaliação da presença de PMN foi feita pela atividade de mieloperoxidase (MPO) no pulmão e no intestino. **Resultados:** A integridade das células endoteliais não foi alterada por PMN de fêmeas submetidas a I/R intestinal, enquanto que os PMN de machos geraram descolamento significativo das monocamadas. Os ratos tratados com estradiol apresentaram redução significativa (75%) do descolamento endotelial causado por PMN em relação ao grupo não tratado. PMN de machos ou fêmeas após a I/R intestinal reduziram de maneira similar a expressão de PECAM-1 nas células endoteliais. A atividade de MPO aumentou nas ratas submetidas a I/R intestinal em relação aos grupos controles. **Discussão:** Sugere-se que embora a I/R intestinal determine recrutamento de PMN em ratas, estes não necessariamente estão com atividade funcional alterada de maneira a lesar o endotélio *in vitro*. Neste contexto, a redução do descolamento causada por PMN de ratos machos que receberam estradiol, indicaria potencial ação moduladora do estrógeno na atividade funcional dos PMN. Estudos sobre o efeito da remoção dos ovários estão em andamento. Apoio Financeiro: FAPESP(05/02271-5),CNPq.

06.014

Modulação da expressão de moléculas co-estimuladoras na superfície das células dendríticas (DCs) pelos hormônios sexuais femininos (HSF). Golega, B.¹; Ligeiro de Oliveira, A. P.¹; Rodrigues-Soares, C.¹; Domingos, H. V.¹; Oliveira-Filho, R. M.¹; Lima, C.²; Tavares de Lima, W.¹ - ¹ICB-USP - Farmacologia

Introdução: Em estudos anteriores mostramos que a sensibilização antigênica 7 dias após a ovariectomia (OVx) reduz a inflamação pulmonar em modelo murino de asma, sugerindo que o curso da inflamação alérgica pulmonar (IAP) depende dos níveis circulantes de HSF. O desencadeamento da asma está sob influência reguladora do sistema imunológico, onde as células T naïve respondem ao antígeno apresentado pelas células apresentadoras de antígeno (APCs) com relevante participação das moléculas do MHC e moléculas co-estimuladoras da superfície das APCs, onde as DCs ocupam lugar de destaque. Considerando o exposto, neste estudo analisamos a influência dos HSF sobre a expressão de moléculas co-estimulatórias na superfície de DCs esplênicas de camundongos fêmeas. **Material e métodos:** Camundongos Balb C fêmeas com 7 dias de OVx ou falsamente operadas (sham) foram sacrificadas por deslocamento cervical e o baço retirado. As células do baço foram centrifugadas e o botão celular ressuscitado em meio RPMI incompleto para obtenção de DCs. As células obtidas do baço foram marcadas com anticorpos anti-B220 (marcador de linfócitos B), anti-CD11b e CD11c (marcadores de células dendríticas), anti-CD40, CD80 e CD86 (marcadores de moléculas co-estimulatórias) e anti-MHCII, e em seguida analisadas por citometria de fluxo (FACs). **Resultado:** A remoção dos ovários determinou redução da população de células positivas para B220 (30,8%) e CD11c⁺/CD11b⁺. Ainda, houve diminuição da expressão das moléculas co-estimuladoras CD40, CD80, CD86 e MHC de classe II (33,06%, 42,03%, 50,67% e 29,25% respectivamente), na superfície dessas células duplamente marcadas.

Discussão: Os dados obtidos podem sugerir que os HSF medeiam a apresentação de antígeno ao reduzir a população de DCs bem como suas moléculas co-estimuladoras, podendo interferir no desenvolvimento da resposta imune adquirida. Apoio Financeiro: Apoio financeiro: FAPESP (05/02271-5, 2007 / 52220-3), CNPQ.

06.015
PRÊMIO INOVAÇÃO

06.016

Endogenous glucocorticoids (EG) control expression and activity of vascular adhesion protein 1 (VAP-1) on endothelial cells of cremaster muscle. Gonçalves, M. G. B.¹; Cavalcanti, D. M. H.¹; Jalkanen S.²; Farsky, S.¹ - ¹USP - Análises Clínicas e Toxicológicas; ²University of Turku - MediCity Research Laboratory

Introduction: VAP-1 is a semicarbazide-sensitive monoamine oxidase expressed in some cells, including endothelial cells, which display enzymatic and adhesive properties (Jalkanen *et al.*, Trends Immunol, v.22 , p.211, 2001). It has been described that both actions of this molecule are relevant to control of the leukocyte-endothelial interactions (Jalkanen *et al.*, Arterioscler Thromb Vasc Biol. v. 28, p.18. 2008). We have previously demonstrated that EG control synthesis and expression of adhesion molecules involved on cells interactions during leukocyte migration (Cavalcanti *et al.*, Mol Cell Endocrinol. v. 249, p. 32, 2006.; and Cavalcanti *et al.*, Br J Pharmacol. v.152, p.1291, 2007). **Objectives:** This work investigated the possible control of EG on VAP-1 expression or activity. **Methods:** Adrenalectomized (ADX), sham-operated (SO) or non-manipulated (NM) male Wistar rats were donors of cremaster muscle to quantify VAP-1 expression and activity. VAP-1 expression was quantified on membrane of endothelial cells by immunohistochemistry assay, using VAP-1 monoclonal antibody bound to biotin labeled secondary antibody. VAP-1 activity was quantified in the protein content of the tissue by measure hydrogen peroxide formation using fluorescence assay. Quantifications were carried out in tissues collected from non- or LPS (5 mg/kg; i.p.; 4 hours) injected animals. **Results:** Basal expression and activity of VAP-1 were equivalent in the tissue of the three groups of animals tested. However, after LPS injection both expression and activity of VAP-1 were reduced in tissue from ADX animals in comparison to tissues collected from SO or NM animals (*P<0,05). **Discussion:** Data here obtained, for the first time, show that EG exert a role on expression and activity of VAP-1 during a systemic inflammation induced by LPS. Interestingly, it is indicated that EG positively control the expression and activity of the molecule. Apoio Financeiro: FAPESP 05/59753-1

06.017

Padronização de um ensaio colorimétrico de ativação linfocitária para triagem de novos candidatos a antiasmáticos. Novo, A. F.¹; Olsen, P. C.¹; Costa, J. C. S.²; Cordeiro, R. S. B.¹; Silva, P. M. R. e¹; Martins, M. A.¹ - ¹FIOCRUZ - Fisiologia e Farmacodinâmica; ²FIOCRUZ - Far-manguinhos

Introdução: Dado que a expansão clonal de linfócitos tem papel importante na patogenia da asma, objetivamos neste trabalho padronizar um ensaio de proliferação de linfócitos *in vitro*, baseado nas propriedades colorimétricas do Alamar blue (AB), um indicador de atividade metabólica celular. Os potenciais efeitos na proliferação linfocitária exercidos pelo antiinflamatório esteroide dexametasona, pelo anestésico local lidocaína e seu análogo JMF2-1, foram também investigados no sistema. **Metodologia:** Células obtidas de baço de camundongos BALB/c, em concentrações crescentes (1×10^5 – 8×10^5 células por poço), foram estimuladas com o agente mitogênico Concanavalina A (ConA, 10 µg/mL) na presença ou ausência de tratamento, feito concomitantemente. As células foram incubadas por 48 horas a 37°C (95% de O₂ e 5% CO₂), para adição posterior de 20 µL de AB por poço. As leituras (570 e 600 nm) foram realizadas nos tempos de 2, 3, 5, 6, 7 e 24 horas após a adição de AB. **Resultados:** A estimulação com ConA produziu aumentos marcados na taxa de redução de AB, em relação ao controle (salina), apenas na condição de 8×10^5 células por poço. A resposta foi notada inicialmente com 3 horas de incubação (15% de aumento), atingiu valores máximos com 6 horas de incubação (129% de aumento), desaparecendo a diferença para o controle na 24^a hora de incubação. Observamos que o tratamento com dexametasona (100 µM) inibiu completamente a resposta de ativação induzida por ConA no tempo de 6 horas. O bloqueio significativo do fenômeno foi também percebido após tratamento das células com JMF2-1 (300 µM e 600 µM), em condições onde a lidocaína (300 µM e 600 µM) mostrou-se inativa. **Conclusão:** Nossos dados mostraram que os tratamentos efetuados com dexametasona e JMF2-1, mas não lidocaína, apresentaram marcada atividade antiproliferativa de linfócitos, reforçando a interpretação de que este análogo não anestésico de lidocaína tem propriedades relevantes associadas ao controle terapêutico da asma. Concluímos também que o bioensaio permitiu o monitoramento contínuo da proliferação dos linfócitos, podendo ser útil em projetos de triagem de novos compostos antiinflamatórios e antiasmáticos. Apoio Financeiro: CNPq, PDTIS e FAPERJ.

06.018

Participação da via hemeoxigenase-1/biliverdina/CO na proteção contra lesão gástrica induzida por indometacina em camundongos. Gomes, A. S.¹; Soares, P. M. G.¹; Barbosa, A. L. R.¹; Medeiros, J-V. R.¹; Cunha, F. de Q.²; Souza, M. H. L. P.¹ - ¹UFC - Fisiologia e Farmacologia; ²FMRP-USP

Introdução: As drogas antiinflamatórias não-esteroidais (AINES) constituem um importante grupo de fármacos, com uma ampla variedade de indicações terapêuticas nas diversas áreas médicas. Apesar de seus efeitos benéficos, há uma alta incidência de efeitos adversos no trato gastrointestinal (Olivero & Graham, 1992). Nos últimos anos, vários estudos vêm demonstrando que a hemeoxigenase 1 (HO-1), e seu substrato, heme e seus produtos CO e biliverdina (BLV), são capazes de modular o processo inflamatório. **Objetivo:** Avaliar o papel da hemina (substrato da HO-1), BLV, decarbonil dimanganês (DMDC) (doador de CO) ou de um inibidor da HO-1, zinco protoporfirin IX (ZnPPIX), na lesão gástrica (LG) induzida por indometacina (INDO) em camundongos. **Métodos:** Camundongos (20-30g) foram pré-tratados com hemina (3 mg/kg), BLV (3 mg/kg), DMDC (25µmol/kg) ou ZnPPIX (3 mg/kg) uma hora antes da administração de INDO (10 ou 30 mg/kg). Três horas depois, os animais foram sacrificados e seus estômagos retirados para mensuração da LG. Fragmentos foram coletados para determinação da atividade de mieloperoxidase (MPO), malonaldeído (MDA), glutatona (GSH), hemoglobina (Hg) e bilirrubina (BLR). A detecção das citocinas IL-1, TNF-α e IL-10 foram determinadas por ELISA, usando o Kit DuoSet (R&D Systems). **Resultados:** Hemina, BLV ou DMDC reduziram (p<0,05) as LG (13,3 ± 1,3; 21,5 ± 2,4; 6,1 ± 1,4mm², N=5), a atividade de MPO (8,2 ± 1,2; 16,4 ± 4,0; 8,2 ± 0,9U/mg, N=5), os níveis de MDA (87,6 ± 6,0; 58,8 ± 4,3; 88,1 ± 11,9nmol/g, N=5), a concentração de Hg (19,8 ± 1,2; 29,9 ± 4,7; 21,3 ± 2,1mg/g, N=5) e aumentou (p<0,05) os níveis de GSH (112,2 ± 11,07; 275,5 ± 47,5; 186,7 ± 32,2ug de NPSH/g de tecido, N=5) quando comparado com o grupo INDO (30,7 ± 5,9mm², N=5; 24,9 ± 3,3U/mg, N=5; 128,9 ± 6,2nmol/g, N=5; 36,8 ± 3,5mg/g, N=5; 58,7 ± 4,7ug de NPSH/g). A concentração de BLR se mostrou elevada (p<0,05) apenas na gastroproteção induzida por hemina (1,0 ± 0,15mg/dL, N=5) e BLV (1,5 ± 0,3mg/dL, N=5) quando comparado com o grupo INDO (0,8 ± 0,06mg/dL, N=5). Hemina e DMDC diminuíram (p<0,05) a concentração de TNF-α (1099 ± 121,7pg/ml, N=5; 1035 ± 77,3pg/ml, N=5) e IL-1β (2675 ± 179,1pg/ml, N=5; 3046 ± 429,7pg/ml, N=5), induzida por INDO (1527 ± 159,3pg/ml, N=5; 4007 ± 275,5pg/ml, N=5), respectivamente. Entretanto, aumentou (p<0,05) IL-10 (1482 ± 200,6pg/ml, N=5; 1490 ± 146,6pg/ml, N=5), quando comparado com o grupo INDO (970,7 ± 32,6pg/ml, N=5). O pré-tratamento com ZnPPIX (3 mg/kg) aumentou (p<0,05) a LG (19,1 ± 2,5mm, N=5), a atividade de MPO (12,7 ± 2,1UMPO/mg), a concentração de Hg (30,7 ± 3,3mg/g, N=5) e os níveis de MDA (172,0 ± 7,5nmol/g, N=5) e diminuiu a concentração de GSH (79,7 ± 5,2ug de NPSH/g, N=5) quando comparado com o grupo INDO (10,6 ± 1,2mm, N=5; 7,7 ± 0,5UMPO/mg, N=5; 18,5 ± 1,2mg/g, N=5; 121,2 ± 3,6nmol/g, N=5; 129,0 ± 11,6ug de NPSH/g), respectivamente. **Conclusão:** Dessa forma, é possível concluir que a via HO-1/BLV/CO participa do processo de defesa da mucosa gástrica contra lesões gástricas induzidas por INDO, diminuindo a infiltração de neutrófilos, a hemorragia, a presença de radicais livres e de citocinas pró-inflamatórias, como TNF-α e IL-1β, além de aumentar a concentração de IL-10. Apoio Financeiro: CNPq

06.019

Kinins and nitric oxide are involved in the nociceptive responses induced by *Tityus serrulatus* scorpion venom in rat paw. Pessini, A. C.¹; Kanashiro, A.¹; Machado, R. R.¹; Malvar, D. do C.²; Figueiredo, M. J.³; Aguiar, F. A.¹; Kalapothakis, E.⁴; Souza, G. E. P.¹ - ¹FCFRP-USP Física e Química; ²UFRRJ - Ciências Fisiológicas; ³FMRP - USP - Farmacologia; ⁴UFMG - Biologia Geral

Goal: The present study aiming to investigate the inflammatory mediators, such as NO and kinins, underlying the (*Tityus serrulatus* venom) Tsv-induced mechanical hypernociception and spontaneous responses.

Methods and Results: The hypernociceptive effect of Tsv were evaluated in male Wistar rats by constant pressure paw (Von Frey method) during 1 h intervals for up 6 h and the spontaneous behaviors were determined by counting the number of flinches after injection of Tsv during 5 min intervals for up 60 min. Tsv (0.01 to 10 µg/paw) elicited a dose- and time-dependent mechanical hypernociception that started at 30 min, peaked at the 1h and decreased thereafter reaching the control (saline injected animals) 6h later. Additionally flinches in a characteristic biphasic response (formalin like-response), with the early phase ranging from 0 to 14 min and the late phase from 15 to 60 min after injection. The dose of 1 µg/paw was selected for the remaining both experiments. The participation of kinins and NO involved on Tsv-induced hypernociceptive response was evaluated by pre-treatment with DALBK (100 nmol/paw) and icatibant (10 nmol/paw), B₁ and B₂ selective kinin receptor antagonists, respectively. While DALBK was effective from 2 to 4 h after venom injection (2 h: 57.1 ± 1.1; 3 h: 85.7 ± 1.0; 4 h: 83.3 ± 1.4 %, respectively), icatibant was effective at time as early as 1 h (1 h: 64.3 ± 0.7; 2 h: 81.4 ± 1.2; 3 h: 91.4 ± 1.3; 4 h: 90.0 ± 1.0 %, respectively). L-NAME (50 mg/kg, ip. 30 min prior), a non-selective nitric oxide synthase inhibitor, significantly reduced these response by 40.0 ± 1.0; 65.0 ± 1.2; 71.4 ± 1.3; 50.0 ± 0.5 % at 1, 2, 3 and 4 h, respectively. In the next series of experiments, given prior to Tsv DALBK and icatibant abolished the early phase (from 0 to 9 min) and the late phase (from 25 to 60 min after the injection) and L-NAME significantly reduced Tsv-induced flinches only late phase from 25 to 54 min after the injection. The inhibitions observed were 25.4 ± 0.9; 60.7 ± 1.1; 56.3 ± 1.0; 82.3 ± 1.4; 82.3 ± 1.0; 75.9 ± 1.4 % at 25-29, 30-34, 35-39, 40-44, 45-49 and 50-54 min, respectively. **Conclusions:** the results of the present study showed that the Tsv, when injected s.c. into the rat paw, causes a dose-dependent mechanical hypernociception and flinches (a characteristic biphasic response). We also observed a possible association between kinins and NO on both and nociceptive responses. Apoio Financeiro: CNPQ, FAPESP

06.020

Interação entre as vias monóxido de carbono/hemeoxigenase 1 e sulfeto de hidrogênio/cistationa gama-liase na defesa da mucosa gástrica contra lesão induzida por etanol em camundongos. Gomes, A. S.¹; Medeiros, J-V. R.¹; Cunha, F. de Q.²; Souza, M. H. L. P.¹
¹UFC - Fisiologia e Farmacologia; ²FMRP-USP

Introdução: Monóxido de carbono (CO) e H₂S são mensageiros gasosos que possuem ações antiinflamatórias no estômago estando envolvidos na manutenção da integridade da mucosa gástrica (Fiorucci et al 2005 e 2006; Gibbons&Farrugia, 2004). Diversos autores sugerem que essas moléculas podem interagir em condições fisiológicas e patológicas, possuindo um papel regulatório em diversos tecidos. **Objetivo:** Investigar a interação entre os mediadores gasosos monóxido de carbono/hemeoxigenase 1 e sulfeto de hidrogênio/cistationa gama-liase no mecanismo de proteção contra lesão gástrica induzida por etanol em camundongos. **Métodos:** Camundongos (20-30g) foram divididos em 4 grupos experimentais: No grupo 1, os animais foram pré-tratados com drogas indutoras/doadoras de CO: hemina (3 mg/kg, via i.p.) ou DMDC (12,5 µmol/kg, via i.p.) e no grupo 2, com drogas precursoras/doadoras de H₂S: cisteína (50 mg/kg, por gavagem), NaHS (150 µmol/kg, por gavagem) ou lawesson (27 µmol/kg, por gavagem). No grupo 3, trinta minutos antes da administração das drogas indutores/doadores de CO ou drogas precursoras/doadores de H₂S (grupo 4), os animais receberam DL-propargilglicina (PAG) (50 mg/kg, por gavagem) ou zinco protoporfirin IX (ZnPPIX) (3 mg/kg, via i.p.). Uma hora depois, receberam etanol 50% (0,5ml/25 kg, por gavagem). Passado 60 minutos da administração de etanol 50%, os animais foram sacrificados e os estômagos retirados para mensuração do índice de lesão gástrica. Para determinação do índice de lesão gástrica, os estômagos fotografados com câmera digital para posterior análise das alterações macroscópicas com uso de um programa de planimetria computadorizada (Ko JK-S & Cho CH, 1998). **Resultados:** Hemina ou DMDC reduziram (p<0,05) as lesões gástricas (15,5 ± 4,1mm², N=5; 13,2 ± 1,8mm², N=5), quando comparado com o grupo etanol 50% (87,5 ± 6,2mm² N=5), respectivamente. Cisteína, NaHS ou lawesson reduziram (p<0,05) as lesões gástricas (41,8 ± 6,0mm², N=5; 21 ± 5,6 mm², N=5; 22,8 ± 6,6mm², N=5), quando comparado com o grupo etanol 50% (96,1 ± 10,8 mm² N=5), respectivamente. O pré-tratamento com ZnPPIX antes da administração de cisteína (91,5 ± 8,2mm², N=5), NaHS (63,5 ± 19,8mm², N=5) ou lawesson (142,9 ± 11,3mm²; N=5) reverteu a gastroproteção induzida por drogas precursoras/doadoras de H₂S, aumentando (p<0,05) as lesões na mucosa gástrica dos camundongos tratados com etanol 50% (96,1 ± 10,8mm² N=5), respectivamente. O pré-tratamento com PAG, antes da administração de hemina (85,0 ± 12,9mm², N=5) ou DMDC (88,1 ± 17,5mm², N=5) reverteu a gastroproteção induzida por drogas doadoras de CO, aumentando (p<0,05) as lesões na mucosa gástrica dos camundongos tratados com etanol 50% (96,1 ± 10,8mm² N=5), respectivamente. **Conclusão:** Os resultados sugerem que as vias monóxido de carbono/hemeoxigenase 1 e sulfeto de hidrogênio/cistationa gama-liase interagem na proteção da mucosa gástrica contra lesões induzidas por etanol. Apoio Financeiro: CNPq

06.021

Efeito do antagonista seletivo dos receptores CXCR2 para quimiocinas, SB225002, no carcinoma oral de células escamosas. Romanini, J.¹; Leal, P. C.²; Pinto Jr., D. S.³; Santos, D. S.⁴; Calixto, J. B.⁵; Batista Jr., E. L.⁶; Campos, M. M.⁷ - ¹PUCRS - Estomatologia; ²UFSC-QMC-CFM; ³USP - Odontologia; ⁴PUC-RS - Farmácia; ⁵UFSC - Farmacologia; ⁶PUC-RS - Odontologia; ⁷PUC-RS - Cirurgia-Odontologia

Introdução: A morbidade e mortalidade elevadas associadas ao carcinoma de células escamosas da cavidade oral, o prognóstico limitado e a falta de opções terapêuticas nos casos avançados, torna fundamental aumentar o entendimento acerca dos mecanismos envolvidos na invasão e progressão deste grupo de tumores, a fim de identificar novos alvos terapêuticos (Rollins, *Eur. J. Cancer*, 42, 760, 2006). Embora existam evidências experimentais convincentes sobre a relevância das quimiocinas CXC e seus receptores em diversas neoplasias, ainda não há relatos sobre sua importância em tumores da cavidade oral. Assim, o presente estudo teve como objetivo determinar o envolvimento do receptor CXCR2 para quimiocinas no carcinoma de células escamosas da cavidade oral. **Métodos:** Foi utilizada a linhagem HN30 de carcinoma de células escamosas da cavidade oral de humanos. As células foram cultivadas em DMEM 10% e, posteriormente, incubadas com o antagonista seletivo dos receptores CXCR2, SB225002 (concentrações 25, 50, 100, 200, 400 e 800, 1600 e 32000 nM e controle DMSO 0,01%; 72 h) ou com a quimiocina IL-8 (concentrações 1, 3, 10, 30 ng/mL e controle PBS; 24 h). A proliferação celular foi avaliada através do ensaio de MTT. **Resultados:** A incubação com o SB225002 determinou uma diminuição concentração-dependente da proliferação celular, sendo a inibição máxima obtida na concentração de 800 nM (45 ± 10 %). Por outro lado, a incubação de IL-8 produziu um aumento da proliferação das células HN30, que foi dependente da concentração, sendo a resposta máxima observada na concentração de 10 nM (40 ± 15 %). **Discussão:** Os resultados obtidos indicam o envolvimento do receptor CXCR2 na progressão do carcinoma de células escamosas da cavidade oral. Outros estudos estão em andamento a fim de caracterizar o efeito deste antagonista em modelos *in vivo*. É possível sugerir que antagonistas seletivos dos receptores CXCR2 representariam alternativas interessantes para o tratamento do câncer bucal, especialmente em combinação com a terapêutica disponível atualmente. Apoio Financeiro: Apoio Financeiro: CAPES e CNPq

06.022

Acute pro-inflammatory actions of endothelins in zymosan-induced arthritis. Conte, F. P.¹; Barja-Fidalgo, T. C.²; Verri Jr., W. A.³; Cunha, F. de Q.³; Rae, G. A.⁴; Penido, C.¹; Henriques, M. G.¹ - ¹FIOCRUZ - Farmacologia Aplicada; ²UERJ - Farmacologia; ³FMRP-USP; ⁴UFSC - Farmacologia

Introduction Endothelins (ETs) are involved in inflammatory events including pain, fever, edema and cell migration. Rheumatoid arthritis (RA) is an autoimmune disease characterized by joint inflammation due to a chronic inflammatory process of the synovial membrane, characterized by infiltration of macrophages, lymphocytes and polymorphonuclear cells into the synovial tissue, among other events. ET-1 levels are increased in plasma and synovial membrane of RA patients, but the evidence that ETs participate in RA physiopathology is very limited. The present study investigates the involvement of ETs in neutrophil accumulation in the murine model of zymosan-induced arthritis. **Methods and Results** Levels of ET-1 mRNA expression were increased in synovial extracts 2 h after zymosan stimulation (500 µg/25 µL; i.a.) that was followed, at 6 and 24 h, by massive neutrophil influx into inflamed site. Selective pharmacological blockade of ET_A receptors (BQ-123; 0.15-150 pmol/cav; i.a.) significantly reduced 6 h zymosan-induced neutrophil influx in a dose-dependent manner (maximum inhibition of 86 %) in contrast to impaired neutrophil accumulation observed in all doses used of ET_B antagonist (BQ-788; 0.15-150 pmol/cav; i.a.) (maximum inhibition of 75 %). In addition, dual pharmacological ET receptor blockade (bosentan; 10 mg/kg; i.v.) also impaired 6 h zymosan-induced leukocyte accumulation (sal 0.11 ± 0.02 ; zy 12.59 ± 1.82 ; bos $7.97 \pm 0.73 \times 10^5$ cells/knee, n=10). Western blotting analysis showed the expression of both ET receptors in synovial tissue, that was not altered after zymosan stimulation. Reinforcing the pro-inflammatory role of ETs in this reaction, pre-treatment with BQ-123 or BQ-788 (15 pmol/cavity; i.a.) also decreased zymosan-induced TNF-α production within 6 h (sal 0.20 ± 0.07 ; zy 0.65 ± 0.05 ; BQ-123 0.40 ± 0.04 ; BQ-788 0.32 ± 0.05 ng/ml, n=10), KC/CXCL1 production within 24 h (sal 0.08 ± 0.004 ; zy 0.11 ± 0.004 ; BQ-123 0.09 ± 0.003 ; BQ-788 0.09 ± 0.003 ng/ml, n=10) and leukotriene B₄ at 6 (sal 0.005 ± 0.005 ; zy 1.47 ± 0.24 ; BQ-123 0.62 ± 0.14 ; BQ-788 0.63 ± 0.121 ng/ml, n=10) and 24 h (sal 0.009 ± 0.003 ; zy 2.210 ± 0.542 ; BQ-123 0.418 ± 0.095 ; BQ-788 0.099 ± 0.030 ng/ml, n=10). **Discussion** Taken together, these results point to a participation of ETs on knee joint inflammation. ETs play an important pro-inflammatory activity during zymosan-induced arthritis, acting through both ET receptors, by mechanisms that regulate neutrophil influx, secretion of inflammatory mediators in inflamed knee joints. Apoio Financeiro: CNPq/FIOCRUZ

06.023

Inhibitory effects of hydrogen sulphide on carrageenan- induced arthritis. Ekundi-Valentim, E.; Santos, K. T.; Teixeira, S. A.; Barreto, M. A. A.; Muscará, M. N.; Costa, S. K. P. ¹USP-ICB – Farmacologia

Introduction: hydrogen sulphide (H₂S), a well known environment pollutant, has been proven to be produced endogenously in mammalian tissues and now seems to play an emerging role in physiological and pathophysiological conditions such as inflammatory disease (Szabó, 2007). This study was undertaken to evaluate the relevance of H₂S in carrageenan (CGN)-induced acute arthritis. **Methods:** male Wistar rats (180-220 g) were subjected, under halothane anaesthesia, to intra articular injection (i.art.) of 3% CGN or saline (50 µl; control group). Sixty min before CGN injection, either an inhibitor of H₂S formation, DL-propargylglycine (PAG; 52mM/knee joint), or an H₂S donor, Lawson's reagent (3.6 mmol/knee joint), was injected i.art. in the knee joint. The non-selective cyclooxygenase inhibitor indometacin (6 mg/kg; i.p), was used as a positive control. **Results:** following 4 h CGN i.art injection, the functional assays revealed that the vehicle-treated rats exhibited a potent knee oedema (3.32 ± 0.1mm) associated with pain scored behaviour (1.7 ± 0.2). Significant levels of both myeloperoxidase (MPO; 281 ± 41 U/cavity) and inducible nitric oxide synthase (iNOS; 2.6 ± 0.4 pmol/min/mg protein) activities were also detected in the synovial fluid of arthritic rats. Either the i.art injection with Lawson's reagent or systemic treatment of rats with indometacin, significantly attenuated the CGN-induced oedema (2.47 ± 0.2** and 1.3 ± 0.13*** mm for Lawson's reagent and indometacin respectively; n=7-8), pain score, 0.9 ± 0.2* and 0.2 ± 0.2*** for Lawson's reagent and indometacin respectively; n=7-8) and MPO activity (74 ± 9.6** and 78,71 ± 13,3** U/cavity for Lawson's reagent and indometacin respectively; n=7-8), but failed to reduce increased iNOS activity (2.3 ± 0.3 and 2.8 ± 0.1 pmol/min/mg protein). In contrast, treatment with PAG failed to significantly effect on CGN-induced arthritic signs, but potentiated the activity of synovial iNOS (4.5 ± 0.2*** pmol/min/mg protein; n=4). **Discussion:** we show for the first time that exogenous supply of H₂S in the knee joint allowed a significant reduction of CGN-induced acute arthritis signs, although did not affect the iNOS activity. Addition, endogenous H₂S does not seem to be involved in CGN-induced arthritis signs; despite the increase in iNOS activity. **References:** Szabó C. *Nat Rev Drug Discov.* 2007; 6(11): 917-35. *Review.* **Acknowledgments:** Ekundi is a recipient of a grant from University Agostinho Neto, Angola. Apoio Financeiro: FAPESP and CNPq for financial support.

06.024

Reactive oxygen species production via NAD(P)H oxidase mediates Heme-induced cytoskeletal alterations and increased expression of adhesion molecules in HUVEC. Nascimento da Silva, V.¹; Morandi, V.²; Barja-Fidalgo, T. C.¹; Arruda, M. A.¹ - ¹UERJ - Farmacologia; ²UERJ - Biologia Celular e Genética

Introduction: Vascular occlusion is a major cause of the morbidity associated with several hemolytic disorders, especially sickle-cell disease. It has been described that NAD(P)H oxidase-derived reactive oxygen species (ROS) evokes increased endothelium-leukocyte interaction. However the etiological agent responsible for such effect remains unknown. A putative mediator of such phenomenon is free heme. Heme, which is released during hemolytic episodes, induces expression of endothelial adhesion molecules and consequent adherence of leukocytes and reticulocytes to endothelial cells. Our group has described that free heme acts as a prototypical proinflammatory molecule. Nevertheless, these phenomena seem to rely on the activation of several redox-sensitive signaling routes through NAD(P)H oxidase activity (Graça-Souza et al., 2002; Arruda et al., 2004; Arruda et al., 2006). In this work, we aim to define the still underappreciated role of heme on vascular biology and the putative role of NAD(P)H oxidase activity on heme-induced endothelial cell activation, evaluating ROS production and changes in the cytoskeleton dynamics. **Materials and Methods:** HUVEC were cultured on gelatin-coated glass coverslips overnight. Cells were then pre-treated or not with DPI (10 μ M) and incubated in the absence or in the presence of heme (3-100 μ M). ROS generation was assessed by dihydrorhodamine 123 (DHR) assay. Immunofluorescence microscopy analysis was employed to detect the expression of VCAM-1. Protein levels were detected by Western blot analysis. F-actin was stained with rhodamine phalloidin. **Results:** Heme (3-100 μ M) induces NAD(P)H oxidase-dependent ROS production in a concentration-dependent fashion, as assessed by DHR assay. Heme is also able to induce actin cytoskeleton alterations as well as focal adhesion kinase (FAK) phosphorylation and its subsequent association to actin, events also ruled by NAD(P)H oxidase-derived ROS. Importantly, heme-induced expression of VCAM-1 also requires NAD(P)H oxidase activation. The redox-sensitive signaling pathways as well as NADPH oxidase subunits involved in such effects are under investigation. **Discussion:** Our work demonstrates, for the first time, a direct link between heme and NAD that demonstrates that free heme, in a concentration range found in hemolysis loci induces endothelial activation in a NAD(P)H oxidase-dependent manner. A better knowledge about the heme modulation of NADPH oxidase activity may lead to the development of more precise therapeutic strategies in order to ameliorate the morbidity associated with sickle-cell disease. Apoio Financeiro: FAPERJ, CNPq, SR-2/UERJ

06.025

Efeito do composto MV8608 da *Mandevilla velutina* sobre as respostas nociceptivas e inflamatórias no modelo de cistite hemorrágica causada pela ciclofosfamida em ratos. Santos, A. A. Jr.¹; Martins, J. P.¹; Leal, P. C.²; Thiesen, F. V.³; Calixto, J. B.⁴; Morrone, F. B.¹; Campos, M. M.⁵ - ¹PUCRS - Farmácia; ²UFSC - QMC/CFM; ³PUCRS-INTOX; ⁴UFSC - Farmacologia; ⁵PUCRS – Cirurgia Odontologia

Introdução: A cistite hemorrágica é um efeito colateral freqüentemente observado em pacientes sob tratamento com o quimioterápico ciclofosfamida (CYP). Os efeitos urotóxicos da CYP são atribuídos ao metabólito acroleína e podem ser parcialmente prevenidos pelo agente uroprotetor, o ácido 2-mercaptoetanosulfônico (MESNA) (Katz et al., J Cancer Res. Clin. Oncol., 121, 128, 1995). O presente estudo avaliou os efeitos da aglicona esteróide MV8608, extraída do rizoma da *Mandevilla velutina* na cistite hemorrágica induzida por CYP em ratos, em comparação com o MESNA. **Métodos:** Foram utilizados ratos machos Wistar (N= 6-8 por grupo; 180–200 g). A cistite foi induzida pela injeção intraperitoneal (i.p.) de CYP (100 mg/kg). As respostas nociceptivas foram avaliadas como a soma dos escores para 3 parâmetros comportamentais: grau de fechamento dos olhos, freqüência respiratória e alteração postural, em vários intervalos de tempo (15-180 min) (Boucher et al., J. Urol., 164, 203, 2000). Como parâmetros inflamatórios, foram medidos, a presença de hemorragia, o peso da bexiga por 100g de animal (48 h) e o extravasamento plasmático em bexigas de ratos pré-tratados com azul de Evans (25 mg/kg, i.v., 24 h). **Resultados:** O tratamento com o MESNA (131 µmol/kg, i.p., 3 doses, 0,5 h antes e 4 e 8 h após a aplicação de CYP) foi capaz de reduzir de maneira significativa a presença de hemorragia (49 ± 7 %) e o peso da bexiga (40 ± 4 %) nos animais injetados com CYP em relação ao grupo controle. No entanto, o mesmo tratamento não causou alteração significativa da nocicepção induzida pela CYP. De forma interessante, a administração do composto MV8608 (27,62 µmol/kg, i.p., 0,5 h antes) produziu uma redução marcante das respostas nociceptivas (67 ± 1 %) induzidas pela CYP em ratos, sem, contudo, alterar significativamente o edema, a hemorragia ou o extravasamento plasmático causados pela CYP ($p > 0.05$). **Discussão:** Os resultados apresentados permitem inferir que o composto MV8608 poderia constituir uma alternativa vantajosa para o controle dos efeitos colaterais associados à quimioterapia com CYP, especialmente se utilizado em combinação com o agente uroprotetor MESNA. Apoio Financeiro: Apoio Financeiro: CNPq, PRONEX, BPA-PUCRS.

06.026

Estudo do efeito do corticóide flunisolida sobre miofibroblastos pulmonares *in vitro*. Ramos, T. J. F.; Perez, S. A. C.; Martins, M. A.; Silva, P. M. R. e - FIOCRUZ - Fisiologia e Farmacodinâmica

Introdução: A silicose é uma doença pulmonar grave, caracterizada pela ocorrência de intenso processo granulomatoso, e para a qual não há uma terapia eficaz. Demonstramos que o tratamento curativo com o corticóide flunisolida foi eficiente em induzir marcada inibição do componente fibrótico da silicose murina. Considerando-se os fibroblastos como células alvo importantes para resposta de fibrose tecidual, neste estudo investigamos o efeito da flunisolida sobre a reatividade de fibroblastos *in vitro*. **Métodos:** As células foram obtidas a partir de pulmões de camundongos Swiss-Webster, normais ou instilados intranasalmente com sílica (10 mg) (7 e 28 dias), mediante dissociação mecânica e digestão enzimática, com solução de colagenase, sendo mantidas em cultura. Após a terceira passagem foi realizada análise de proliferação através do ensaio de incorporação de [³H] timidina. Como estímulo foi utilizada rmlL-13 (1-10 ng/mL), uma citocina de reconhecido caráter prófibrótico. As análises foram realizadas 24 horas após a estimulação e nos experimentos envolvendo o tratamento, o corticóide flunisolida foi adicionado 1 hora antes da estimulação. **Resultados:** Verificamos por meio de imunocitoquímica que as células apresentaram marcação positiva para a proteína α -actina de músculo liso e negativa para a proteína citoqueratina, caracterizando assim o fenótipo de miofibroblastos. Observamos, de forma interessante, que as células provenientes de animais silicóticos apresentaram taxa de proliferação basal superior àquela dos normais. Quanto à estimulação com rmlL-13, vimos que os miofibroblastos obtidos de animais normais e silicóticos (7 dias) mostraram-se responsivos à citocina, conforme atestado pelo aumento na taxa de proliferação, enquanto que aqueles obtidos de animais silicóticos crônicos (28 dias) foram refratários. O tratamento com flunisolida (10^{-8} - 10^{-5} M) não modificou a taxa de proliferação celular quando da estimulação com IL-13 no caso de miofibroblastos normais, porém inibiu marcadamente na condição dos miofibroblastos silicóticos. **Discussão:** Nossos achados mostram que miofibroblastos silicóticos apresentaram nível basal de proliferação superior aquele dos normais e, que a estimulação com IL-13 foi capaz de ativar as células provenientes de animais de fase aguda, porém não de fase crônica. Esta resposta foi sensível ao tratamento com o corticóide flunisolida, indicando que fibroblastos constituem um alvo importante para o efeito antifibrótico deste composto e reforçam o fato de que a flunisolida pode constituir uma ferramenta terapêutica promissora de aplicação na condição da silicose. Apoio Financeiro: PAPES 4/FIOCRUZ, CNPq, FAPERJ e UNESCO.

06.027

Temporal characterization of hypernociceptive and inflammatory responses induced by complete Freund's adjuvant injection in the mice paw. Nascimento, A. F. Z.¹; Quintão, N. L. M.²; Passos, G. F.¹; Medeiros, R.¹; Calixto, J. B.¹ - ¹UFSC - Farmacologia; ²UNIVALI - Ciências Farmacêuticas

Introduction: For half a century, complete Freund's adjuvant (CFA) has been the most commonly used immunoadjuvant for experimental work. Nevertheless, their mode of action is still not completely understood. CFA has profound effects on both cellular and humoral systems: it induces inflammation and pain, enhances antibody formation, stimulates phagocytosis, causes extensive proliferation of the lymphoreticular system, and produces or increases delayed hypersensitivity and autoimmune disease. Herein, we attempted to determine the temporal sequence of events involved in the inflammatory and hypernociceptive responses induced by intradermal injection of CFA in mice. **Methods:** Male Swiss mice (25-30 g) received a 20 µl intradermal injection of CFA (complete Freund's Adjuvant) into one hindpaw (right paw). In order to analyze the possible contralateral effects of CFA injection, the left paw did not receive any injection. Separate groups of mice received sterile saline into the right paw and were used as control. After challenge, mechanical hypernociception (von Frey) and oedematogenic (pletismometer and macroscopic changes) responses were evaluated at several time-points following CFA intradermal injection (1 h – 28 days). To assess the molecular changes associated with CFA treatment, separated group of mice paw was collected after different time points following intradermal CFA injection. IL-1β levels (1 h – 72 h), neutrophil influx (1h – 28 days) and transcription factors activation (NF-κB and CREB, 1h – 28 days) were assessed by means of ELISA, mieloperoxidase assay and western blotting approaches, respectively. **Results:** Intradermal injection of CFA (20 µl) produced a rapid onset and sustained hypernociceptive and oedematogenic responses in mice. These responses were represented by a significant reduction of paw withdrawal latencies in relation to mechanical stimuli and by an increase of paw volume. A more intense and long-lasting mechanical hypersensitization was noted in ipsilateral (increase of the response frequency of 56% from 2 h to 14 d) in comparison to the contralateral paws (increase of the response frequency of 50%; from 5 to 21 d). Similarly, the onset of oedema formation occurred at 2 hours, being maximal at 24 hours, remaining stable for up to 21 days, and decreasing 28 days following CFA injection. The molecular analysis revealed that intradermal CFA injection induced a rapid onset and sustained augmentation in the IL-1β levels (50-fold), neutrophil migration (5-fold), as well as NF-κB and CREB activation (both 10-fold) in the mice paw. Time-course analysis revealed that these molecular changes were minimal at 1 hour, but increased in a time-dependent manner, peaking at 12-24 hours, and being reduced 72 hours later. **Conclusions:** The present study contributes to better understand the cellular and molecular mechanisms underlying CFA-induced hypernociception and inflammation in the mice. In addition, present results allow us to define crucial elements in the pathogenesis of pain and inflammatory conditions. Apoio Financeiro: CNPq, PRONEX, FAPESC, CAPES.

06.028

Tumor necrosis factor and interleukin-6, but not interleukin-1, are involved in RANTES-induced fever in rats. Machado, R. R.¹; Yamashiro, L. H.²; Soares, D. de M.²; Kanashiro, A.¹; Sorgi, C. A.³; Faccioli, L. H.³; Kawamoto, E. M.²; Scavone, C.²; Proudfoot, A. E. I.⁴; Souza, G. E. P.¹ - ¹FCFRP-USP - Física e Química; ²ICB-USP - Farmacologia; ³FCFRP-USP - Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas; ⁴Serono Pharmaceutical Research Institute - Serono Pharmaceutical Research Institute

Introduction: In rats, RANTES (Regulated on activation, normal T cells expressed and secreted), a CC chemokine is involved in fever induced by lipopolysaccharide (LPS) by acting on CCR1 and CCR5 receptors⁽¹⁾. Aiming to investigate the position of RANTES in fever cascade to LPS we investigated the connection between tumor necrosis factor (TNF)- α , interleukin (IL)-1 β , IL-6 and RANTES. **Methods:** RANTES (25 pg/rat) was injected intrahypothalamically (i.h.) in male Wistar rats. Control animals received vehicle only. Body temperature was measured for up to 6 h by radio-telemetry system. IL-1 receptor antagonist (IL-1ra; 20 mg/rat, i.h.), soluble tumour necrosis factor receptor I (sTNFR1; 50 ng/rat, i.h.) and anti-rat IL-6 antibody (IL-6Ab; 0.5 mg/rat, i.h.) were administered before RANTES, IL-1 β (300 pg/rat, i.h.), TNF- α (25 ng/rat, i.h.) or IL-6 (30 ng/rat, i.h.), respectively. The cerebrospinal fluid (CSF) was collected 2.5 h after injection of RANTES by puncture of *cisterna magna*. Levels of IL-1 β , TNF- α and IL-6 were determined in CSF using ELISA. Met-RANTES, antagonist of CCR1 and CCR5 receptors (i.v.), was given before IL-1 β , TNF- α or IL-6. In addition, the hypothalamus was collected after injection of RANTES and both nuclear factor- κ B (NF- κ B) activation and COX-2 mRNA expression were determined using EMSA and RT-PCR assays, respectively. **Results** - IL-1ra reduced the fever to IL-1 β but not that induced by RANTES. sTNFR1 reduced the fever to TNF- α but was also ineffective in RANTES-induced fever. However, IL-6Ab reduced the fever to IL-6 as well as the fever induced by RANTES. In addition, i.v. injected Met-RANTES reduced the fever induced by TNF- α but did not change that induced by IL-1 β or IL-6. Furthermore, i.h. injected RANTES increased IL-6 CSF concentration while IL-1 β and TNF- α were not detected in this fluid. Finally, RANTES increased NF- κ B binding activity and COX-2 mRNA expression. **Conclusions:** These results suggest that in the cascade of mediators involved in the fever promoted by LPS, the chemokine RANTES synthesis/release is preceded by TNF- α and that IL-6 and PGE₂ (formed via COX-2) seems to be situated downstream RANTES. The NF- κ B activation after RANTES might represent the signalization via for induction of IL-6 and COX-2 synthesis. In summary, RANTES can be placed in LPS-induced fever as follow: LPS \rightarrow TNF- α \rightarrow RANTES \rightarrow IL-6 \rightarrow PGE₂. (1) Machado et al., *Brain Research*, v.1161, p.21-31, 2007. Apoio Financeiro: FAPESP, Proc. Nr. 03/04838-7, 05/55717-0.

06.029

Antiedematogenic and antinociceptive effects of the selective phosphoinositide 3-kinase gamma inhibitor, AS605240 and their analogues. Nascimento, A. F. Z.¹; Leal, P. C.²; Medeiros, R.¹; Calixto, J. B.¹ - ¹UFSC - Farmacologia; ²UFSC - QMC/CFM

Introduction: Phosphatidylinositol 3-kinases (PI3Ks) are a family of lipid kinases, which phosphorylate the 3'-OH position of the inositol ring of phosphoinositides. The PI3K pathway play a key signaling role in transduction of the cascade involved in many homeostatic mechanisms, such as mitogenic signaling, cell survival and growth, metabolic control, vesicular trafficking, degranulation, cytoskeletal rearrangement and migration, among others. This family of lipid kinases is activate by a wide variety of different stimuli including growth factors, inflammatory mediators, hormones, neurotransmitters, and immunoglobulins and antigens. Particularly, the class IB PI3K p110 γ (PI3K γ) had emerged as a promising target for the treatment of inflammatory disorders. Recently, it has been demonstrated that a small-molecule PI3K inhibitor, mainly AS605240, effectively reduces inflammatory process in rheumatoid arthritis. In the present study, we attempted to evaluate the possible anti-inflammatory and antinociceptive effects of AS605240 and some of its analogs in carrageenan (Cg)-induced inflammatory and nociceptive processes. **Methods:** Swiss mice (30–35 g) were treated with Cg (300 μ g/paw). The AS605240 and its analogues (A1, A2, A3, A4 and A5) were dissolved in 5% DMSO (10 mg/kg) and administered by the intraperitoneal (i.p.) route 30 min before Cg injection. The mechanical hipernociception was evaluated at different time points intervals with Von Frey hair (0.6 g) application, and the paw withdrawal front Von Frey hair application was considered the hipernociception index. The paw edema was assessed with plethysmometer in different time points following Cg treatment. **Results:** Systemic treatment with AS605240 or with the analogues A2, A3 or A5 (10 mg/kg, i.p.) significantly reduced the Cg-induced paw edema in mice. AS605240 reduced Cg-induced paw edema for 24 hours (inhibition of 87 ± 9 , 86 ± 9 , 29 ± 6 and $30 \pm 2\%$, at 1, 2, 4 and 24 h, respectively). In addition, the analogues A2, A3 and A5 produced a less effective, but significant, inhibition over Cg-induced paw edema (inhibition of 34 ± 15 , 51 ± 3 and $31 \pm 6\%$ at 4, 2 and 4 h, respectively). The results of Von Frey test revealed that systemic treatment with AS605240 (10 mg/kg) was able to significantly prevent the Cg-induced mechanic hipernociception in mice (inhibition of 47 ± 11 , 51 ± 8 and $58 \pm 7\%$ at 6, 8 and 24 h, respectively). **Discussion:** These data shown that PI3K γ seems to exert a critical role in the mechanical hipernociception and edema following intradermal injection of Cg. Therefore, drugs that selectively regulate the activation of PI3K γ may have important therapeutic role in diseases involving painful and inflammatory processes. Apoio Financeiro: CNPq, PRONEX, FAPESC, CAPES

06.030

3D Allergic lung myofibroblast culture system: new model to study fibrosis and remodeling. Dalzy, D. V.¹; Silva, P. M. R. e¹; Garzoni, L. R.²; Anjos-Valotta, E. A. dos¹; Borojevic, R.³; Martins, M. A.¹; Perez, S. A. C.¹ - ¹FIOCRUZ - Fisiologia e Farmacodinâmica; ²FIOCRUZ - Ultra-Estrutura e Biologia Celular; ³UFRJ-ICB - Histologia e Embriologia

Background: Airway remodeling is a feature of asthma that is identified by peribronchial and subepithelial fibrosis. The neogenesis of lung fibrosis observed in asthma is ill understood because of limited experimental models that mimics of what occurs in living organisms. **Aim:** This study was undertaken in order to establish a 3D culture model with lung myofibroblast obtained from allergic mice and to analyze the effect of rmlL-13 in this system. **Methods:** Balb/c mice were immunized with a suspension of ovalbumin (OA) (50 mg) adsorbed in Al (OH)₃ (5 mg) administered on days 0 (sc) and 14 (ip). At day 28, OA challenges (50 mg/25 mL, i.n.) were performed 3 times a week during 2 weeks. Myofibroblasts from naïve or allergic lung were grown in flat monolayers after mechanic and enzymatic lung dissociation. After the third trypsinization, 95% of pure myofibroblasts were obtained. Multicellular spheroids were formed using myofibroblast plated in agarose-coated 96 U-well plates. Analyses were performed by phase and confocal microscopy. **Results:** Naïve and allergic lung myofibroblasts were able to reaggregate into cellular spheres and spontaneously generated fibronectin and collagen type I, as attested by confocal microscopy. Though spheroids generated from allergic lungs appeared higher in volume as compared to the controls, they grew even more following exposure to rmlL-13. Moreover, this cytokine up-regulated fibronectin production in naïve cell spheres. **Conclusion:** Multicellular spheroids sensitive to IL-13 and able to produce components of extracellular matrix can be generated from lung myofibroblasts. This lung microtissue seems to provide an appropriate environment for the study of lung fibrosis and remodeling in allergic conditions. Apoio Financeiro: Apoio financeiro: CAPES, PAPES IV, PDTIS e FAPERJ.

06.031

Influência do estado diabético induzido por aloxana sobre o desenvolvimento da silicose experimental em camundongos. Torres, R. C.; Carvalho, V.; Ferreira, T. P. T.; Arantes, A. C. S. de; Silva, P. M. R. e¹; Martins, M. A. FIOCRUZ - Fisiologia e Farmacodinâmica

Introdução: Silicose é uma doença inflamatória crônica pulmonar caracterizada por uma fibrose intensa associada a um infiltrado inflamatório e formação de granulomas locais. Evidências na literatura mostram que indivíduos diabéticos apresentam capacidade diminuída em produzir respostas inflamatórias. No presente estudo investigamos a influência do estado diabético sobre a fibrose pulmonar induzida por sílica em camundongos. **Métodos:** Camundongos Swiss-Webster foram anestesiados com halotano e receberam uma injeção intravenosa de aloxana (65 mg/kg). Após sete dias, alguns animais foram instilados com uma suspensão de sílica em salina (10 mg /50 µL). Quatorze dias após a indução da diabetes foram feitas as análises que contaram com avaliação da mecânica pulmonar em pletismógrafo invasivo de corpo inteiro, contagem de leucócitos sanguíneos periféricos em microscópio óptico bem como avaliação da resposta inflamatória pulmonar através de cortes de pulmões corados com Hematoxilina e Eosina. **Resultados:** A instilação de sílica em camundongos levou a um marcado infiltrado leucocitário e a presença de numerosos granulomas no tecido pulmonar, fenômeno este que ocorreu em paralelo com alterações marcantes na funcionalidade pulmonar, caracterizadas por um aumento da resistência e redução da complacência pulmonares. Os camundongos diabéticos instilados com sílica, por sua vez, não apresentaram alterações na formação de granulomas, na resposta inflamatória pulmonar, bem como na funcionalidade das vias aéreas em comparação com os animais silicóticos. **Discussão:** Nossos resultados mostram que a diabetes tipo I não foi capaz de alterar o comprometimento da funcionalidade e da resposta inflamatória pulmonares, fenômenos característicos da resposta silicótica, sugerindo que animais diabéticos mantêm a capacidade de reparo tecidual frente a uma resposta inflamatória crônica, embora sejam refratários à estímulos inflamatórios de ação aguda. Apoio Financeiro: CNPq, FAPERJ.

06.032

Estudo do perfil antiagregante plaquetário de uma nova série de derivados N-acilidrazônicos otimizados a partir do LASSBio 129. Costa, L. M. M.; Rodrigues, A. P. C.; Barreiro, E. J.; Fraga, C. A. M.; Miranda, A. L. P. UFRJ - Farmácia - FÁRMACOS - LASSBio

Introdução: As cardiopatias cardiovasculares estão frequentemente associadas à disfunção plaquetária e são responsáveis pelo maior índice de mortes naturais em todo o mundo. A agregação plaquetária (AP) não está apenas envolvida na formação de um tampão hemostático e no processo de trombose aguda, mas também exerce importante papel no processo inflamatório, incluído na patogênese da aterosclerose (WAGNER, *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 23:2131, 2003). Uma nova série de derivados N-Acilidrazônicos foi planejada a partir da otimização estrutural do LASSBio 129, protótipo que possui atividade antiagregante plaquetária significativa (ORMELLI, MSc, FF, UFRJ, 1999), utilizando as ferramentas da Química Medicinal de simplificação e hibridação molecular entre o protótipo LASSBio-129 e o derivado hidantoinico dantroleno (RODRIGUES, MSc, IQ, UFRJ, 2008). **Objetivo:** Este trabalho consiste na avaliação da atividade antiagregante plaquetária dos derivados NAH otimizados. **Métodos:** A AP foi monitorada *in vitro* utilizando o método turbidimétrico (BORN & CROSS *Nature*, 194, 1962). Foi utilizado PRP citratado de coelhos albinos e de voluntários. As substâncias teste, solubilizadas em DMSO, foram adicionadas ao PRP, incubadas por um período de 5 min antes da adição do agonista: ácido araquidônico (AA) (200µM); colágeno (5µg/mL); ADP (3-5µM); U-46619 (3µM). Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição comparados ao controle DMSO (*p<0,05; n=3-5 plasmas). Os valores de CI₅₀ foram determinados por regressão não-linear através do programa GraphPad Prism. **Resultados:** Seis derivados da série inibiram em 100%* a AP de PRP de coelho induzida por AA e colágeno na concentração de 100 µM, porém não apresentaram atividade frente ao ADP e ao U-46619. As CI₅₀ foram determinadas:

Substância	CI ₅₀ AA (µM)	CI ₅₀ Colágeno(µM)
LASSBio 129	30,6	-
LASSBio 1215	1,9	4,2
LASSBio 1220	2,2	5,5
LASSBio 1222	1,4	6,8
LASSBio 1223	9,7	26,0

Todos os compostos ativos, com exceção do derivado LASSBio 1276, inibiram em 100% a segunda onda da agregação induzida por ADP em PRP humano. Alguns compostos da série apresentaram efeito desagregante na presença dos três agonistas, tanto quando pré-incubados (agregação reversível) quanto quando adicionados 1 ou 2 min após o início da agregação. **Conclusão:** O conjunto de resultados sugere para alguns destes compostos um mecanismo de atividade antiplaquetária distinto da inibição de COX-1 e da inibição dos receptores P2Y ou menos dependente destas vias. Podemos concluir que a nova série representou uma otimização da atividade antiagregante plaquetária do protótipo. Apoio Financeiro: FAPERJ, PRONEX 2006, CNPq, FUJB

06.033

Participation of female sex hormones on lung inflammation in airmin and airmax mice in a model of experimental asthma. Ligeiro de Oliveira, A. P.¹; Accetturi B. G.¹; Ribeiro, O. G.²; Cabrera, W. H. K.²; Oliveira-Filho R. M.¹; Tavares de Lima, W.¹ ¹USP - Farmacologia; ²Instituto Butantan - Imunogenética

Sex hormones play a dual role in regulating allergic lung inflammation in mice (Riffo-Vasquez *et al.*, 2007). Thus, allergic lung inflammation was investigated in two female mouse lines, AIRmax and AIRmin, genetically selected for high or low acute inflammatory response (AIR). We used AIRmax and AIRmin in order to evaluate the relationship between the magnitude of inflammatory lung response with the hormonal imbalance in ovariectomized mice. Female AIRmax and AIRmin mice were ovariectomized or sham-operated and sensitized with OVA 7 days later. On days 14-16 mice were subjected to a single exposure of aerosolized OVA (1%). All measurements were performed 24 h after the last aerosol challenge. The cells of BAL and production of cytokines by lung explant (Proust *et al.*, 2003) were determined. Both AIRmax and AIRmin OVx-allergic mice showed reduced lung inflammation indicated by decreased number of total cells recovered in the BAL fluid compared to AIRmax (Naive: $10,4 \pm 0,9$ vs Sh: $27,5 \pm 2,5$ vs OVx: $10,4 \pm 0,9 \times 10^4$) and AIRmin (Naive: $4,0 \pm 0,4$ vs Sh: $15,8 \pm 2,9$ vs OVx: $8,3 \pm 1,0 \times 10^4$) sham-allergic mice, respectively. Both AIRmax and AIRmin OVx-allergic mice produced less IL-1beta (AIRmax= Naive: 286 ± 70 vs Sh: 645 ± 29 vs OVx: 350 ± 40 /AIRmin= Naive: 99 ± 20 vs Sh: 458 ± 44 vs OVx: 206 ± 14 pg/mg) and TNF-alpha (AIRmax= Naive: 349 ± 59 vs Sh: 721 ± 49 vs OVx: 440 ± 58 /AIRmin= Naive: 139 ± 10 vs Sh: 552 ± 33 vs OVx: 310 ± 30 pg/mg) when compared to respective sham-allergic animals. On the other hand, we observed increased IL-10 production in AIRmax (Naive: 227 ± 37 vs Sh: 383 ± 21 vs OVx: 614 ± 60 pg/mg) and AIRmin (Naive: 77 ± 10 vs Sh: 243 ± 40 vs OVx: 444 ± 53 pg/mg) OvX-allergic mice when compared to their controls. Altogether our data shows that AIRmax and AIRmin mice behaved as expected, with increased cellularity and cytokine production in AIRmax as opposed to AIRmin. Moreover, we observed that female sex hormones are able to modulate the acute allergic response in the asthma model, as both AIRmax and AIRmin OVx-mice showed a lower number of total infiltrated cells as well as a decreased secretion of inflammatory cytokines in the target organ when compared to sham-mice. Apoio Financeiro: FAPESP (06/55950-0, 04/14128-0 and 07/55631-4)

06.034
PRÊMIO INOVAÇÃO

06.035

Enhancement in Ca^{2+} mobilization and platelet adhesion at early times after antigen challenge in a rat model of asthma. Baldissera Jr., L.; Prada Morganti, R.; Monteiro, P. F.; Antunes, E. - UNICAMP - Farmacologia

Introduction: Platelets are reported to play an important role in allergic bronchial asthma (Kornerup and Page, 2007). A recent study has showed that platelets migrate extravascularly in a allergic mice (Pitchford *et al*, 2008). However, little is known about the mechanisms by which platelets are activated in allergic diseases. Therefore, in this study we have examined the *in vitro* platelet adhesion, aggregation and cytosolic Ca^{2+} mobilization in ovalbumin-(OVA) immunized and challenged rats. **Methods:** Male Wistar rats (180-200 g) were actively immunized with OVA (1 mg/ml, s.c.). Fourteen days after OVA sensitization, animals were intranasally challenged with OVA (5 mg/ml). At 0.5, 2 and 8 h post-OVA challenge, arterial blood was collected. Washed platelets was prepared in Krebs-Ringer solution for functional and biochemical assays. Adhesion assays were carried out in 96-well plates coated with fibrinogen, whereas aggregation was performed using an aggregometer. To measure Ca^{2+} mobilization, platelets were resuspended in free- Ca^{2+} Krebs-Ringer solution and incubated with Fura 2-AM (2 μM) for 45 min. Aliquots of platelet suspension were dispensed into cuvettes at 37°C equipped with a stirring device. To verify the total and internal storage Ca^{2+} mobilization, CaCl_2 (1 mM) were added to either ADP (20 μM)- or thrombin (100 (mU/mL)-stimulated platelets in absence and in presence of EGTA (500 μM). **Results:** Thrombocytopenia was observed at 0.5 to 12 h post-OVA challenge, returning to basal levels at 24 h. ADP (5 μM)-stimulated platelet adhesion was significantly increased at 0.5 h post-OVA challenge ($38.6 \pm 6.1\%$; $p < 0.05$) compared with the non-sensitized group ($16.0 \pm 3.6\%$). Similar data were obtained in thrombin (100 mU/ml)-stimulated platelet adhesion ($85.9 \pm 6.1\%$ and $47.1 \pm 6.1\%$ for sensitized and non-sensitized groups, respectively; $p < 0.01$). No significant differences in ADP- and thrombin-induced platelet aggregation were found in any studied time post-OVA challenge. A significant total and internal Ca^{2+} mobilization was observed in ADP-stimulated platelets (181.8 ± 4 vs 230.4 ± 4 nM for non-sensitized and sensitized groups, respectively). Similarly, in thrombin 100 (mU/mL)-stimulated platelets, a significant increase in Ca^{2+} mobilization was observed (77.7 ± 2.2 vs 91.1 ± 3.2 nM for non-sensitized and sensitized groups, respectively). **Discussion:** Early (but not late) platelet activation is observed in OVA-challenged rats resulting in an enhancement in Ca^{2+} mobilization and platelet adhesion. **References:** Kornerup K.N & Page C.P. *Platelets* 18:319-28, 2007. Pitchford S.C et al. *Am J Resp Crit Care Med.* 177:604-12, 2008. Apoio Financeiro: CAPES

06.036
PRÊMIO INOVAÇÃO

06.037

Participação do fator de agregação plaquetário (PAF) na mucosite intestinal induzida por 5-fluorouracil em camundongos. Soares, P. M. G.¹; Mota, J. M. S. C.¹; Brito, G. A. C.²; Cunha, F. de Q.³; Ribeiro, R. A.¹; Souza, M. H. L. P.¹ - ¹UFC - Fisiologia e Farmacologia; ²UFC - Morfologia; ³FMRP-USP

Introdução: Mucosite intestinal é um freqüente efeito colateral associado ao uso de 5-fluorouracil (5-FU), cuja fisiopatologia ainda não foi completamente elucidada. Dados da literatura demonstram a participação do PAF na patogênese da enterocolite necrozante e na colite experimental, porém, nenhuma evidência da sua participação na mucosite intestinal induzida por antineoplásicos. O objetivo desse trabalho foi investigar o papel do PAF na mucosite intestinal induzida por 5-FU em camundongos. **Métodos:** Camundongos selvagens para o receptor de PAF (PAFR +/+) ou deficientes para o receptor (PAFR -/-) foram tratados com 5-FU (450 mg/kg, i.p.). Outros grupos de camundongos foram tratados com salina ou BN52021 (antagonista do receptor de PAF, 20 mg/kg, s.c., diariamente). Após 03 dias, os animais foram sacrificados e amostras do duodeno (D), jejuno (J) e íleo (I) foi colhido para avaliação morfológica do dano ao epitélio intestinal. A mensuração da atividade de mieloperoxidase e a dosagem de citocinas foram avaliadas por ELISA a partir de amostras de duodeno. Significância estatística (testes ANOVA e Bonferroni) foi considerada quando $p < 0,05$. **Resultados:** 5-FU induziu ($p < 0,05$) dano ao epitélio intestinal (redução da razão altura dos vilos/profundidade das criptas) em todos os segmentos (duodeno-C= $2,88 \pm 0,19$, 5-FU= $1,35 \pm 0,10$; jejuno-C= $2,78 \pm 0,17$, 5-FU= $1,51 \pm 0,14$; íleo-C= $1,48 \pm 0,07$, 5-FU= $0,85 \pm 0,07$), aumento da atividade de MPO (n° neutrófilos/mg de tecido) (C= $988,40 \pm 204,50$, 5-FU= $1746,00 \pm 204,50$) e aumento da concentração de citocinas (pg/300 μ l) pró-inflamatórias (IL-1 β : C= $21,51 \pm 13,53$, 5-FU= $553,90 \pm 204,60$; KC: C= $98,58 \pm 21,67$, 5-FU= $357,10 \pm 108,40$; TNF- α : C= $6,90 \pm 0,96$, 5-FU= $16,62 \pm 4,27$). BN52021 protegeu ($p < 0,05$) o segmento duodenal da lesão induzida por 5-FU (D= $2,12 \pm 0,15$), porém não reduziu o aumento da atividade de MPO. Camundongos PAFR (-/-) apresentaram menos ($p < 0,05$) lesão ao epitélio intestinal em comparação aos camundongos selvagens, principalmente no duodeno (D= $2,62 \pm 0,21$) e jejuno (J= $1,77 \pm 0,15$), também apresentaram menor aumento na concentração de citocinas (IL-1 β : $159,30 \pm 72,31$; KC: $145,20 \pm 44,04$, TNF- α : $9,98 \pm 1,42$), porém não houve redução no aumento da atividade de MPO em comparação ao camundongos selvagens (PAR +/+). **Discussão:** Nossos resultados sugerem que o PAF por um mecanismo independente de neutrófilos participa na fisiopatologia da mucosite intestinal induzida por 5-FU em camundongos. Apoio Financeiro: CNPq

06.038

Fever induced by intraperitoneal injection of *S. aureus* depends on prostaglandin E₂ (PGE₂). Martins, J. M.¹; Soares, D. de M.¹; Figueiredo, M. J.¹; Souza, G. E. P.² - ¹FMRP - USP - Farmacologia; ²FCFRP - USP - Física e Química

Introduction: It has been shown that live *S. aureus* induces febrile response in rats^[1]. In this study we investigated the effect of sodium diclofenac (DICLO), indomethacin (INDO) or celecoxib (CELE) on fever induced by this bacterium. The effect of CELE on increase of CSF PGE₂ concentration induced by *S. aureus* was also evaluated. **Methods:** Male Wistar rats (200 g) received DICLO (1 and 2 mg/kg) or INDO (2 and 8 mg/kg) i.p. (0.5 ml) 30 min before the i.p. injection (2 ml) of *S. aureus* (10¹³ UFC/cavity) and body temperature (°C) was measured every 30 minutes for up to 12h by radio-telemetry system. Celecoxib (2.5 mg/kg) was given p.o. (0.5 ml) 30 min before i.p. injection of *S. aureus* (10¹³ UFC/cavity). Body temperature was monitored as above and cisternal CSF was collected at 2.5 h and 5 h for PGE₂ evaluation. **Results:** At doses used DICLO reduced the fever induced by *S. aureus* (2.5 h: Saline / *S. aureus* = 38.2 ± 0.16; Diclo 1 mg/kg / *S. aureus* = 37.6 ± 0.098; Diclo 2 mg/kg / *S. aureus* = 37.6 ± 0.1). INDO at dose of 2 mg/kg have not effect, while at 8 mg/kg it inhibited the fever induced by *S. aureus* (2.5 h: Tris / *S. aureus* = 38.6 ± 0.16; INDO 8 mg/kg / *S. aureus* = 37.6 ± 0.19). Celecoxib blocked both fever (H₂O / *S. aureus* - 2.5 h = 38.3 ± 0.23 and 5h = 38.7 ± 0.2; CELE / *S. aureus* - 2.5 h = 37.3 ± 0.22 and 5 h = 37.4 ± 0.18) and PGE₂ increase in the CSF (H₂O / *S. aureus* - 2.5 h = 2362 ± 411.8 and 5 h = 2569.1 ± 430.8; CELE / *S. aureus* - 2.5 h = 88.1 ± 31.43 and 5 h = 53.1 ± 15.9). **Discussion:** These data shown that the febrile response induced by *S. aureus* is accompanied by an increase in CSF PGE₂ concentration which explain its sensitivity to selective and non-selective cyclooxygenase inhibitors. ^[1] Longhi et al. 38 Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental. Livro de Resumos, p. 41, 2006. **Support:** FAPESP.

06.039

Blockage of nitric oxide synthases (NOS) activity modulates VAP-1 and PECAM-1 expression on endothelial cells. Hebeda, C. B.¹; Jalkanen, S.²; Farsky, S.¹ – ¹USP - Análises Clínicas e Toxicológicas; ²University of Turku - MediCity Research Laboratory

Introduction: Our previous results showed that oral and chronicle L-NAME treatment impairs leukocyte migration in different models of inflammation and the effect is dependent, at least in part, on reduced leukocyte L-selectin expression. Objectives: To extend our knowledge about the role of nitric oxide (NO) on modulation of leukocyte recruitment, here we evaluated the effects of acute or chronicle blockade of NOS on endothelial VAP-1 and PECAM-1 expressions.

Methods: Male Wistar rats were treated with L-NAME at a dose of 20 mg/kg/day during 14 days, administrated on drinking water, or received acute treatment of L-NAME (100 mg/kg, via i.p.). Control animals received equivalent volume of sterile saline by the same routes. 30 minutes after the treatments, animals were injected with LPS (5 mg/kg; 4hs; i.p.) and were killed by decapitation to remove cremaster muscle and liver. Using immunohistochemistry assay, VAP-1 expression was quantified on cremaster muscle and liver sinusoids and PECAM-1 expression was measured on cremaster muscle.

Results: We did not detect alterations on VAP-1 expression in both tissues studied without stimulation. However, after LPS-induced systemic inflammation, VAP-1 expression was reduced on liver (L-NAME-treated rats 39.40 ± 1.97 vs. control rats 48.97 ± 2.42) and cremaster muscle (L-NAME-treated rats 47.44 ± 2.18 vs. control rats 59.43 ± 3.43) obtained from L-NAME-treated rats for delayed period of time. Acute blockade of NOS impaired expression of VAP-1 only on cremaster muscle after LPS stimulation (L-NAME-treated rats 76.61 ± 1.23 vs. control rats 82.92 ± 2.69). Expression of PECAM-1 was reduced on cremaster muscle obtained from animals chronically treated with L-NAME, even on basal (164.6 ± 2.21 vs. 174.3 ± 1.86 control animals) or after LPS-stimulation (137.5 ± 1.04 vs. 146.3 ± 1.15 control animals) PECAM-1 expression was not altered on acute L-NAME treated rats. Discussion: Data presented here show the control exerted by NO on endothelial adhesion molecules expression and reveal for the first time the role of NO on VAP-1 expression. Together, these results corroborate our previous data which have shown the pro-inflammatory properties of NO on leukocyte mobilization. Apoio Financeiro: Financial support: 05/60329-0; Capes.

06.040

Influência dos hormônios sexuais femininos na produção de muco e colágeno em modelo murino de asma crônica. Rodrigues-Soares, C.; Golega, B.; Martins, I.³; Ligeiro de Oliveira, A. P.¹; Oliveira-Filho, R. M.⁴; Tavares de Lima, W.⁵ USP - Farmacologia

Objetivos: A asma é doença inflamatória pulmonar crônica caracterizada por obstrução das vias aéreas, hiperreatividade e migração de células tais como neutrófilos, eosinófilos, macrófagos e linfócitos. A presença de muco, colágeno e fibrose são características do processo inflamatório crônico e estão presentes no remodelamento das vias aéreas na asma. Nossos trabalhos sugerem a existência de um mecanismo de interferência seletiva dos hormônios sexuais femininos com o sistema imune dependente do período de tempo existente entre a remoção dos ovários e a sensibilização dos animais com o antígeno. Nestes estudos os hormônios sexuais femininos são potenciais determinantes da gravidade da asma. Assim, neste estudo avaliamos o papel dos hormônios sexuais femininos no remodelamento das vias aérea modelo murino de asma. **Métodos e resultados:** Fêmeas (C57Bl/ 6) submetidas a ovariectomia (OVx), confirmada pelo peso uterino e esfregaço vaginal, foram sensibilizadas com OVA (10 mg OVA/10 mg de alúmen, i.p) após 7 dias da cirurgia. Como controle utilizaram-se fêmeas falso-operadas (Sham). Decorridos 14 dias os animais foram desafiados por 15 min com solução de OVA 1%, durante 3 dias consecutivos. Este procedimento foi repetido por 3 semanas com 4 dias de intervalo entre um ciclo e outro de desafio com OVA. Decorridas 24h após o último desafio, os camundongos foram sacrificados e o lavado broncoalveolar (LBA), leucograma, lavado femural (LF) e análise histológica de amostras do pulmão foram realizadas. **Resultados:** Os dados obtidos indicam que o grupo OVx teve redução do número total de células no LBA em comparação com o grupo sham (Sham: $71,25 \pm 7,3$ vs OVx: $4,6 \pm 0,6 \times 10^4$). Por outro lado verificamos aumento no grupo OVx da celularidade total do sangue (Sham: $365 \pm 59,2$ vs OVx: $580 \pm 38,7 \text{ mm}^3$) e do LF (Sham: $54,2 \pm 4,0$ vs OVx: $124 \pm 17,5 \times 10^6$). Observamos também redução na produção de muco (Sham: $66,6 \pm 2,6$ vs OVx: $26,0 \pm 3,8\%$) e colágeno (Sham: $7,9 \pm 0,36$ vs OVx: $5,71 \pm 0,25 \mu\text{m}^2$) no grupo OVx em relação ao grupo Sham. **Conclusão:** A presença dos hormônios sexuais femininos influencia o curso da inflamação alérgica de forma a modular positivamente celularidade pulmonar e remodelamento das vias aéreas após o desafio crônico com o antígeno. Apoio Financeiro: CNPq

06.041

Mediators of febrile response induced by *E. coli* in rats. Soares, D. de M.¹; Martins, J. M.¹; Kanashiro, A.²; Figueiredo, M. J.¹; Melo, M. C. C.²; Malvar, D. do C.³; Sorgi, C. A.⁴ ¹FMRP-USP - Farmacologia; ²USP - Física e Química; ³UFRRJ - Ciências Fisiológicas; ⁴FCFRP-USP Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas

Introduction: ET-1, BK, IL-1, TNF- α and IL-6 which are important mediators on lipopolysaccharide from gram-negative bacteria (LPS)-induced fever. Nowadays we investigated the involvement of these mediators on live *E. coli*-induced fever in rats. **Methods:** *E. coli* (2.5×10^8 , i.p., 0,5 ml), ET-1 (100 fmol), BK (10 nmol), TNF- α (250 ng) or IL-1b (3.12 ng,) or IL-6 (300 ng) was injected i.c.v., in 2 ml, in male Wistar rats (200 g). Pre-treatment were done i.c.v. (2 ml) with: 3 pmol of ET_A or ET_B receptor antagonists, BQ-123 and BQ-788, respectively; 20 nmol of B₁ or B₂ receptor antagonists DALBK and HOE, respectively; TNF soluble receptor (TNFsr) (500 ng), IL-1 receptor antagonist (IL-1ra) (200 mg) or monoclonal anti IL-6 antibody (5 μ g) 15 min before pyrogenic stimuli. The bT ($^{\circ}$ C) was measured by biotelemetry, every 30 min, during 6 or 24h. Peritoneal exudates, serum and CSF from rats receiving *E. coli* was collected 0.5, 3, and 24 h after (2.5×10^8 or 10^9 CFU) and cytokines concentration was measured by ELISA. **Results:** TNF- α , IL-1b and IL-6, were detected 3 h after the i.p. injection of 2.5×10^8 CFU of *E. coli* on serum of animals (145.6 ± 31.1 ; 950.5 ± 206.9 ; 942 ± 354 ; pg/ml, respectively). In the peritoneal exudates 0.5 and 3 h after 2.5×10^8 CFU of *E. coli* it was detected: TNF- α (606 ± 190 ; 193.5 ± 24.9 pg/ml, respectively), IL-1b (3564 ± 748.5 ; 2899 ± 829 pg/ml, respectively) or IL-6 (2706.5 ± 1105 ; 5252.6 ± 1073.2 pg/ml, respectively). Cytokines were not found in the CSF from rats receiving 2.5×10^8 CFU. On the other hand, high levels of TNF- α , IL-1b and IL-6 were found in the serum (450.8 ± 89 ; 4029.1 ± 685 ; 7427.6 ± 279.5 pg/ml, respectively) and exudates (403.8 ± 97.5 ; 6433.1 ± 510 ; 7712.6 ± 134.4 pg/ml, respectively) 3 h after 10^9 UFC of *E. coli*. TNF- α and IL-6 (57.5 ± 6.5 ; 2939.5 ± 539 pg/ml, respectively), but not IL-1b, were detected in the CSF 3 h after this stimulus. Pre-treatment with monoclonal anti IL-6 antibody reduced the fever to 2.5×10^8 UFC of *E. coli* (3h, $^{\circ}$ C: from 38 ± 0.2 to 37.2 ± 0.1) while IL-1ra, TNFsr, BQ-788, BQ-123, HOE-140 and DALBK did not alter this fever. **Conclusion:** Fever induced by *E. coli* seems to depend on central action of IL-6 but not on IL-1, TNF, ET or BK. Apoio Financeiro: CAPES, CNPq, FAPESP

06.042

Edema induzido pelo veneno da serpente *Bothrops fonsecai*: soroneutralização e laserterapia. Guimarães-Souza, L.¹; Barbosa, A. M.¹; Gogo, J. C.²; Zamuner, S. R.¹ ¹UNIVAP - Fisiologia e Farmacologia; ²UNIVAP - Fisiologia

Introdução: O veneno das serpentes do gênero *Bothrops* induz uma reação inflamatória intensa no local da picada, caracterizada por formação de edema e migração leucocitária. Neste trabalho avaliamos a atividade edematogênica do veneno bruto da serpente *Bothrops fonsecai* (VBf), em músculo plantar de camundongos, bem como a capacidade do soro antibotrópico (SAB) em neutralizar esse efeito do veneno. Ainda, utilizamos a terapia Laser de baixa potência (LBP) como tratamento alternativo na neutralização do edema causado pelo veneno. **Metodologia:** Utilizaram-se camundongos Swiss machos, divididos aleatoriamente (n=5). O efeito edematogênico foi avaliado por pletismografia, nos tempos 15, 30 min, 1, 3, 6 e 24 h após a injeção de 0,05 e 1 mg/pata i.pl, do veneno ou salina (controle). O LBP foi utilizado nos comprimentos de onda de 685 e 830 nm, sendo, potência 3,0 e 16 mW, densidade de energia 22,9 e 11,2 J/cm², área 0,008 cm², tempo 61 e 56 s, respectivamente, com três aplicações, nos tempos: imediatamente, 1 e 3 h após a injeção do veneno ou salina. O SAB (0,1 mL/5mg; i.v.) foi aplicado imediatamente à injeção do veneno. **Resultado:** Para a avaliação do efeito edematogênico foi escolhida a dose de 1 mg /pata por ser a dose que melhor caracterizou o edema. O veneno de VBf foi capaz de causar um efeito edematogênico com pico máximo de 1 h, voltando a valores normais após 24 h. O SAB não foi eficaz em neutralizar o efeito edematogênico do veneno. No entanto, o tratamento com LBP nos comprimentos de onda 685 e 830 nm reduziu o edema na ordem 68 e 73%, respectivamente, no período de 1 até 6 horas da aplicação do veneno. **Discussão:** Embora o tratamento preconizado para o acidente botrópico seja o SAB, constatamos que este não reduziu o edema causado por VBf. Este dado corrobora com os obtidos para os venenos de *B. jararaca* e *B. asper*⁽¹⁾. Ademais, os resultados demonstraram que a terapia com o LBP apresentou efeito antiinflamatório, nos parâmetros utilizados. Resultado semelhante foi observado em modelo inflamatório de edema de pata induzido por carragenina⁽²⁾, reforçando assim, o benefício que o LBP oferece como terapia alternativa no tratamento de acidentes causados por serpente botrópica. 1. Chacur, M.; Picolo, G.; Gutiérrez, J. M.; Teixeira, C. F. P.; Cury, Y. *Toxicon*, 39: 1173-1181, 2001. 2. Honmura, A.; Ishii, A.; Yanase, M.; Obata, J.; Haruki, E. *Lasers Surg Med.* 12: 441-449, 1992.

06.043

Mikania glomerata reduces neutrophil migration via nitric oxide pathway. Alves, C.F.¹; Alves, V.B.F.¹; Assis, I. P.²; Clemente-Napimoga, J. T.¹; Uber-Bucek, E³; Dal-Secco, D³; Vieira, S. M.⁵; Cunha, F. de Q.³; Napimoga, M. H.¹ ¹UNIUBE - Biologia Molecular; ²UNIUBE - Ciências Farmacêuticas; ³FMRP-USP - Farmacologia; ⁵COPE-INPA

Introduction: In this study, we tested the potential useful of leaf extract of *Mikania glomerata* (popularly known in Brazil as “guaco”), to control neutrophil migration and evaluated the influence of the month in which the leaves were collected on anti-inflammatory property of the “guaco” extract. **Methods:** For the determination of neutrophil migration to peritoneal cavity, extract of “guaco” was administered subcutaneously 30 min before the administration of inflammatory stimuli by intraperitoneal injection of carrageenan at 500 ug/cavity in mice. It was used intravital microscopy to assess the rolling and adhesion of neutrophil to mesentery. **RESULTS:** Pretreatment of the animals subcutaneously (30 min before) with “guaco” extract inhibited neutrophil migration to the peritoneal cavity in a dose dependent fashion confirmed by an inhibition of rolling and adhesion of leukocytes by intravital microscopy. Orally administration of “guaco” extract was also effective to inhibit neutrophil migration. Also, the neutrophil inhibition was not influenced by the month in which the leaves were collected over the year. Pretreatment of mice with 3 mg/kg with “guaco” extract significantly ($P < 0.05$) reduced carrageenan-induced vascular permeability as compared with mice pretreated with saline and intraperitoneal injections of carrageenan. Specifically, pharmacological inhibitors for nitric oxide synthase (NOS; aminoguanidine) remarkably abrogated the guaco-mediated suppression of neutrophil migration to the inflammatory site. We also tested if the efficient dose possesses toxicity by exposing the mice to continuously administration of “guaco” extract for 14, 28 or 60 days. Disturbances in the hematological or biochemical parameters of mice were not observed, nor did it provide evidence of toxicity in the hepatic or renal systems. **Discussion:** We demonstrated that the inhibitory effect of “guaco” extract on neutrophil migration does not have influence with the month in which the leaves are collect and this effect is dependent of NO. Apoio Financeiro: PAPE-UNIUBE; FAPEMIG; CAPES

06.044

15-PGJ₂ reduz a migração de neutrófilos de maneira dependente da via Heme oxigenase-1/óxido nítrico. Severino, F. P.¹; Pena-dos-Santos, D.R.¹; Vieira, S. M.²; Freitas, A.³; Souto, F. O.⁴; Mestriner, F. L. A. C.⁵; Cunha, F. de Q.³; Napimoga, M. H.¹ ¹UNIUBE - Biologia Molecular; ²COPE-INPA; ³FMRP-USP - Farmacologia; ⁴UESC - Biologia; ⁵USP - Clínica Médica

Introdução: A 15d-PGJ₂ é um potente ligante endógeno do receptor de ativação de proliferação de peroxissomo- γ (PPAR- γ), sintetizado por diferentes tipos celulares. Recentemente, tem sido dada grande importância no papel da 15d-PGJ₂ na regulação do processo inflamatório, vislumbrando a possibilidade de intervenção farmacológica. **Métodos:** Para avaliar a migração de neutrófilos, os animais foram pré-tratados com 15d-PGJ₂ (1 mg/kg) na presença ou ausência de antagonistas de HO-1 em seguida, os animais foram desafiados intraperitonealmente (i.p.) com carragenina (500 μ g). O lavado peritoneal foi avaliado 4 horas após, para contagem dos neutrófilos. De outro grupo de animais, foi retirado o mesentério e as proteínas extraídas para realização de western blot para iNOS. Também foi avaliada a capacidade migratória de neutrófilos in vitro (câmara de Boyden) incubados com 15d-PGJ₂ na presença ou ausência de antagonistas de HO-1. **Resultados:** Na dose utilizada, a 15d-PGJ₂ mostrou um alto poder antiinflamatório reduzindo a migração de neutrófilos, porém este potencial foi abolido quando os animais foram pré-tratados com antagonistas de HO-1. O mesmo fenômeno foi observado em neutrófilos isolado pré-incubados com 15d-PGJ₂ e os antagonistas de HO-1. Análise da expressão de iNOS por *western blot* mostrou que a expressão desta aumenta nos animais pré-tratados com 15d-PGJ₂ e este efeito é revertido nos animais tratados com antagonista de HO-1. **Discussão:** Tem sido demonstrado em modelo de inflamação in vivo, que o efeito inibitório da resposta migratória dos neutrófilos dependente de NO é abolida quando a atividade da HO-1 é inibida. Assim, nós demonstramos evidências de que administração exógena de 15d-PGJ₂ pode ser útil na supressão de injúrias inflamatórias mediada pela migração de neutrófilos interferindo com a via HO-1/NO. Apoio Financeiro: PAPE-UNIUBE, CAPES, CNPq

06.045

Atividade antiedematogênica do sobrenadante etanólico do extrato aquoso obtido a partir do extrato hidroalcoólico da *Maytenus ilicifolia* Mart Ex Reissek (Celestraceae). Loureiro, F.S.¹; Coelho, D.S.¹; Cipriani, T. R.²; Iacomini, M.²; da Silva-Santos, J. E.¹ ¹UFPA - Farmacologia; ²UFPR - Bioquímica

Introdução: Este estudo trata da avaliação pré-clínica do potencial antiinflamatório da planta *Maytenus ilicifolia*, popularmente conhecida como espinheira-santa e que tem sua infusão aplicada na medicina empírica como contraceptiva, abortiva, anticancerígena, antiinflamatória, analgésica, antiulcerogênica e no tratamento de distúrbios gástricos. Baseados na indicação popular, avaliamos o efeito antiedematogênico de uma fração obtida a partir do extrato hidroalcoólico das folhas da *M. ilicifolia*. **Métodos:** Diferentes grupos de camundongos (20-40 g, $n = 5-8$ por grupo) foram pré-tratados com o sobrenadante etanólico do extrato aquoso das folhas da *M. ilicifolia* (SEEA) pela via oral (v.o.; 30, 100 e 300 mg/kg) ou intraperitonal (i.p.; 300 mg/kg) 30 min, 1, 3, 6, 12, 24 e 48 h antes da injeção intraplantar de carragenina (300 μ g/pata). A formação de edema foi mensurada por pletismometria, 30 min, 1, 2, 3 e 4 h, 1, 2 e 7 dias após a injeção da carragenina. **Resultados:** Embora a administração oral do SEEA não tenha reduzido o edema induzido pela carragenina, sua administração i.p. 30 min, 1, 3, 6, 12 ou 24 h antes da carragenina reduziu significativamente a formação de edema nas primeiras 4 horas após a CAR. Por exemplo, o aumento no volume das patas dos animais foi reduzido de $56,8 \pm 5,4$, $83,9 \pm 6,7$ e $70,9 \pm 6,9$ mL (na 2^a, 3^a e 4^a h) no grupo controle para $21,9 \pm 3,7$, $25,6 \pm 4,3$ e $20,6 \pm 3,6$ mL no grupo de animais pré-tratado com SEEA (300 mg/kg, i.p.) uma hora antes da injeção da carragenina ($p < 0,05$). Por sua vez, a administração do SEEA 48 h antes da carragenina não alterou a formação de edema. **Discussão:** Esses resultados demonstram que o SEEA, obtido a partir das folhas da planta *M. ilicifolia*, apresenta uma ou mais substâncias com atividade anti-edematogênica potente e com meia-vida farmacológica relativamente longa, porém com pouca (ou nenhuma) biodisponibilidade após administração oral, mesmo após o tratamento durante três dias consecutivos. Novos experimentos estão sendo realizados a fim de se avaliar o mecanismo farmacológico envolvido nesse efeito. **Agradecimentos:** Profa. Dra. Maria Elena Crespo López, Profa. Dra. Setsuko Noro dos Santos e Profa. Dra. Socorro Aguiar (ICB/UFPA), Sr. Amarildo Melo (Biotério/UFPA). Apoio Financeiro: PIBIC - CNPQ

06.046

Inflammatory oedema induced by *Lachesis muta muta* (surucucu) venom and its phospholipase A₂, LmTX-I, in the dorsal skin. Ferreira, T.¹; Camargo, E.²; Damico, D. C.³; Marangoni, S.³; Antunes, E.¹; Nucci, G. de¹; Landucci, E. C. T.¹ ¹UNICAMP - Farmacologia; ²USP - Farmacologia; ³UNICAMP - Bioquímica

Introduction: Human envenoming by *Lachesis muta muta* snake venom is severe, being characterized by pain, oedema, swelling, hemorrhage and coagulopathy. However, there are no studies attempting to characterize the inflammatory effects induced by *L. m. muta* venom. Secretory phospholipases A₂ (PLA₂s) are a broad group of enzymes intensely studied due to their potential involvement in the production of inflammatory mediators, such as arachidonic acid metabolites and PAF. Therefore, we have investigated the ability of *L. m. muta* crude venom and LmTX-I (PLA₂) to induce skin and paw oedema in rats. **Methods:** The *L. m. muta* crude venom and LmTX-I were isolated and purified as reported by Damico *et al.* (2005). Male Wistar rats (180–250 g) were used. Local plasma protein extravasation in response to intradermally injected test agents (100 µl/site in Tyrode solution) was measured in the dorsal skin at 30 min after injection, as the accumulation of intravenously injected ¹²⁵I-human serum albumin. Animals were pretreated (15 to 60 min before) with following drugs in order to investigate the mechanisms involved in venom- and LmTX-I-induced oedema: cyproheptadine (5-HT/histamine antagonist; 2 mg/kg), mepyramine (histamine antagonist; 6 mg/kg), indomethacin (COX inhibitor; 5 mg/kg), icatibant (bradykinin B₂ antagonist; 0.6 mg/kg), PCA 4248 (PAF antagonist; 5 mg/kg). The NO synthesis inhibitor L-NAME (100 nmol/site) or the tachykinin NK₁ antagonist SR140333 (1 nmol/site) were co-injected with venom or LmTX-I. The histamine release from venom- and LmTX-I-stimulated peritoneal mast cells was also evaluated. **Results:** Intradermal injection of crude venom (0.03-10 µg/site) or LmTX-I (0.003–0.3 µg/site) in the dorsal skin resulted in dose-dependent plasma extravasation. Crude venom-induced plasma extravasation was significantly inhibited by mepyramine, cyproheptadine, L-NAME, SR140333 and icatibant, whereas indomethacin had no effect. LmTX-I-induced plasma extravasation was significantly inhibited by mepyramine, cyproheptadine, indomethacin and PCA4248, whereas L-NAME, SR140333 and icatibant had no significant effect. Additionally, both *L. m. muta* venom (0.3-10 µg/ml) and LmTX-I (0.1-3 µg/ml) concentration-dependently induced histamine release from rat peritoneal mast cells. **Conclusion:** We have shown that *L. m. muta* venom and LmTX-I increase microvascular permeability by mechanisms involving *in vivo* mast cell activation. Crude venom-induced responses involve substance P, nitric oxide and kinin release, whereas LmTX-I-induced responses involve arachidonic acid metabolites and PAF. **Reference:** Damico, D.C. *et al.* Biochim Biophys Acta 1726(1), 75-86, 2005. Apoio Financeiro: FAPESP

06.047

Rat Airway inflammation induced by a Kunitz-Type inhibitor isolated from *Dimorphandra mollis* seeds. Mello, G. C.¹; Ruiz, K. F.¹; Desouza, I.¹; Macedo, M. L. R.²; Antunes, E.¹ ¹UNICAMP - Farmacologia; ²UNICAMP - Bioquímica

Introduction: DMTI-II is a Kunitz-type serine proteinase inhibitor isolated from the seeds of *Dimorphandra mollis*, a widespread Leguminosae-Mimosoidea tree found in the savannah-like ecosystem, popularly known in Brazil to be toxic to cattle. Preliminary data in our laboratory have shown that DMTI-II causes a marked eosinophil influx into the rat peritoneal cavity as early as 4 h after injection, a time by which no such cells are usually seen with classical inflammatory agents. This study aimed to investigate the ovalbumin (OVA)-induced pulmonary cell recruitment in rats exposed to DMTI-II. **Methods and Results:** Male Wistar rats were sensitized by subcutaneous injection of OVA. Fourteen days later, sensitized rats were submitted to intranasal instillations of DMTI-II (10 µg) or sterile PBS buffer (control group). OVA-challenge was performed 16 h after DMTI-II (or PBS) exposure. Bronchoalveolar lavage (BAL) fluid was collected at 24 h thereafter. The neutrophil and eosinophil counts in BAL fluid from rats pre-exposed to DMTI-II (10 µg, n = 6) were significantly enhanced (3.3- and 5.0-fold increase, respectively; P < 0.001) after OVA-challenge when compared with control group. No significant differences were found for the mononuclear cells. **Conclusions:** The airways pre-exposure to DMTI-II exacerbates the allergic pulmonary polymorphonuclear cell influx. This capacity of DMTI-II to recruit eosinophils is likely to reflect the allergen properties of proteinase inhibitors belonging to the Kunitz family. Apoio Financeiro: FAPESP

06.048
PRÊMIO INOVAÇÃO

06.049

Mecanismos envolvidos na redução da migração de neutrófilos após quimioterapia em pacientes com câncer de mama. Mendonça, M. A. O.¹; Souto, F. O.²; Alves-Filho, J. C.²; Cunha, F. de Q.²; Murta, E. F. C.³; Tavares-Murta, B. M.¹ ¹UFTM - Ciências Biológicas; ²FMRP-USP - Farmacologia; ³UFTM - Ginecologia e Obstetrícia

Introdução: A quimioterapia pode alterar funções de neutrófilos, mesmo após o período de recuperação da aplasia medular, acarretando aumento na incidência e/ou gravidade de infecções. O objetivo deste estudo é avaliar possíveis mecanismos envolvidos na redução da migração de neutrófilos após tratamento quimioterápico (QT) em pacientes com câncer de mama. **Métodos:** Foram avaliadas 24 mulheres com câncer de mama em estádios II a IV (*Committee of the International Union against Cancer*), nos tempos pré- e pós- (21 dias após o término do 3° ou 4° ciclo) tratamento quimioterápico contendo antraciclina e ciclofosfamida. Foi realizada coleta de sangue venoso periférico para purificação de neutrófilos e obtenção do soro. Em 16 pacientes (53,3 ± 2,5 anos) foram quantificados os níveis séricos de metabólitos de óxido nítrico (NO, Reação de Griess) e das citocinas IL-6, IL-8, IL-10 e TNF- α (ELISA). Os resultados das dosagens de NO e citocinas foram expressos em micromolar e picogramas/mL, respectivamente. Em 9 pacientes (46,2 ± 3,2 anos) os neutrófilos purificados foram avaliados quanto à polimerização da actina através de microscopia de fluorescência. Após tratamento das células (1×10^6) com IL-8 (10^{-7} M) foram preparadas lâminas e os filamentos de F-actina foram corados pela faloidina-TRITC. Os resultados foram expressos em intensidade média de fluorescência (IMF), quantificada através do *software ImageJ*. **Resultados:** Houve redução da polimerização de actina (mediana, percentis 25-75 da IMF) no tempo pós-QT (8854, 4717 – 10817) comparado ao tempo pré-QT (9231, 7159 - 12120) ($p=0,001$, teste de Wilcoxon). Foi observado aumento das concentrações de NO (mediana, percentis 25-75) no tempo pós-QT (33,4; 23,6 – 57,4) comparado ao tempo pré-QT (22,8; 11,8 – 37,6) ($p=0,054$, teste de Wilcoxon). Não foram verificadas alterações significativas entre as concentrações das citocinas (mediana, percentis 25 -75) nos momentos pré- e pós-QT respectivamente, para IL-6: (12; 0 – 107,5 e 78,3, 0 – 101), IL-8: (34,8; 0 – 100,5 e 8,8; 0 – 30,5), IL-10: (26,2; 0 – 89,5 e 24,5; 0 – 116), TNF- α : (36,5; 0 – 195 e 34,5; 0 – 92,5). **Conclusões:** Após tratamento quimioterápico foi observada associação entre redução da polimerização dos filamentos de actina de neutrófilos e aumento da produção sistêmica de NO em pacientes com câncer de mama. Apoio Financeiro: FAPEMIG, CAPES

06.050

Tecido adiposo perinodal: sinalização da insulina via IRS/AKT. Acedo, S. C.¹; DeOliveira, C. C.¹; Saad, M. J. A.²; Pedrazzoli Jr, J.¹; Gambero, A.¹ ¹UNIFAG-USF; ²UNICAMP - Clínica Médica

Introdução: O tecido adiposo perinodal consiste de depósitos de tecido adiposo que envolvem firmemente linfonodos. Possui propriedades sítio-específicas que contribuem para o funcionamento do linfonodo, modificando-se inclusive durante a resposta inflamatória. O objetivo deste trabalho foi estudar a sinalização da insulina (via IRS/AKT) no tecido adiposo perinodal (TAP) mesentérico em uma situação fisiológica e durante a inflamação intestinal.

Métodos: Foram usados ratos Wistar que receberam 3 mg de ácido trinitrobenzenosulfônico (TNBS; via intracolônica) em intervalos de 14 dias. Os controles receberam salina. Amostras de TAP foram coletadas antes e após a administração de 10U de insulina i.v. A análise da via de sinalização da insulina (IRS/AKT) foi feita por Western blot. A atividade funcional do TAP foi analisada pela lipólise basal (determinação de glicerol em sobrenadante de cultura de curto-prazo). **Resultados:** Utilizando animais controle, a fosforilação em tirosina de IRS-1 foi avaliada após 1, 2,5, 5 e 10 min. da administração da insulina e não foi possível observá-la em nenhum momento. Entretanto, nos animais com colite, a insulina foi capaz de induzir a fosforilação de IRS-1 após 2,5 min. ($1,1 \pm 0,2$ e $1,8 \pm 0,1$ Unidades Arbitrárias (UA) para fosfo-IRS-1/IRS-1 no TAP de controle e colite, respectivamente, $n=5$; $p<0,01$). O mesmo foi observado para IRS-2 ($0,9 \pm 0,1$ e $1,3 \pm 0,1$ UA para fosfo-IRS-2/IRS-2 no TAP de controle e colite, respectivamente, $n=5$; $p<0,05$). A AKT também apresentou fosforilação somente nos animais com colite ($0,6 \pm 0,0$ e $1,1 \pm 0,1$ UA para fosfo-AKT/AKT no TAP de controle e colite, respectivamente, $n=5$; $p<0,05$). Avaliamos a disponibilidade do receptor de insulina e dos substratos nos animais e observamos que não havia modificação da expressão do receptor, mas um aumento na expressão dos substratos, principalmente de IRS-1 nos animais com colite ($0,5 \pm 0,1$ e $0,9 \pm 0,1$ UA para IRS-1/b-Actina no TAP de controle e colite respectivamente, $n=5$, $p<0,01$). A lipólise basal, uma avaliação funcional dos adipócitos, mostrou que estes encontram-se mais ativos nos animais com colite ($0,083 \pm 0,016$ e $0,216 \pm 0,072$ mg glicerol/mg de tecido para controle e colite, respectivamente, $n=5$, $p<0,05$). **Discussão:** Os resultados sugerem que o TAP seja resistente a sinalização da insulina via IRS/AKT em uma situação fisiológica, mas torna-se sensível durante a vigência de um processo inflamatório que envolve a participação do linfonodo. É possível que esta mudança de sensibilidade à insulina esteja relacionada a novas necessidades nutricionais do linfonodo ou da modificação do suprimento de lipídeos imunomoduladores. Apoio Financeiro: FAPESP

06.051

Efeito do EHNA sobre a enterite induzida pela toxina A do *Clostridium difficile* (TxA) em camundongos. Barboza, D. R. M. M.; Barreto, L. R. F.; Junqueira, A. F. T.; Vale, M. L.; Ribeiro, R. A.; Gomes, A. S.; Dias, A. A.; Brito, G. A. C. UFC - Fisiologia e Farmacologia

Recentemente vem sendo descrito um aumento da incidência e da gravidade da infecção pelo *Clostridium difficile*. A toxina A (TxA) é o principal fator de virulência do *C. difficile*, provocando inflamação e destruição tecidual aguda em intestinos de animais experimentais e de pacientes com a doença induzida pela bactéria. Em sítios de injúria tecidual, adenosina é produzida em altas concentrações, exercendo efeitos antiinflamatórios, limitados por sua rápida degradação pela enzima adenosina deaminase. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da inibição da enzima adenosina deaminase pelo EHNA (eritro-9-(2-hidróxi-3-nonil)-adenina) sobre a enterite induzida pela TxA do *C. difficile* em alça ileal de camundongos. **Metodologia:** Foram utilizados camundongos machos pesando 25-30g. EHNA (90 $\mu\text{mol/kg}$) ou PBS foi injetado no lúmen da alça ileal isolada 30 minutos antes da injeção de TxA (10 a 100 μg) ou PBS. As razões peso/comprimento da alça e volume de secreção/comprimento da alça foram calculadas 3 horas depois. Amostras de tecido foram coletadas para histopatologia, dosagem de atividade de mieloperoxidase (MPO), dosagem de TNF- α , IL-1 β e IL-10 por ELISA, imunohistoquímica para TNF- α , IL-1 β , NOS induzível e PTX3, e PCR para TNF- α , IL-1 β e PTX3. **Resultados:** A injeção de TxA (10 a 100 μg) nas alças ileais aumentou significativamente ($p < 0,05$) as razões peso/comprimento da alça e volume de secreção/comprimento da alça com resultados consistentes a partir de 50 μg . A TxA promoveu destruição tecidual, edema, infiltração de células inflamatórias, aumento da dosagem das citocinas TNF- α e IL-1 β no tecido ileal medido por ELISA e do RNAm para estas citocinas e PTX3. TxA aumentou a imunomarcagem do tecido para TNF- α , IL-1 β , iNOS e PTX3. Todos esses parâmetros foram revertidos pelo EHNA ($p < 0,05$). TxA não alterou os níveis de IL-10 em relação ao controle, mas o pré-tratamento com EHNA promoveu uma elevação nos níveis desta citocina. **Discussão:** O EHNA demonstrou um potente efeito antiinflamatório, reduzindo a lesão tecidual, a infiltração neutrofilica, a expressão e os níveis de citocinas próinflamatórias (TNF- α , IL-1 β) e produzindo um aumento nos níveis de IL-10. A administração de TxA induziu um aumento na expressão de PTX3 e no número de células imunomarcadas para iNOS no tecido ileal, sendo estes efeitos também revertidos pelo EHNA. Nossos dados sugerem pela primeira vez na literatura um importante papel da adenosina/adenosina deaminase na patogenia da enterite induzida pela TxA em camundongos e abrem perspectiva para novos estudos sobre a modulação desta via no manejo da doença induzida pelo *C. difficile*. Apoio Financeiro: CNPq

06.052

Efeito do inibidor seletivo da fosfatidilinositol-3 quinase G, AS605240, na resposta edematogênica causada pela tripsina em camundongos. Pereira, P. J. S.¹; Leal, P. C.²; Calixto, J. B.³; Morrone, F. B.¹; Campos, M. M.⁴ ¹PUC-RS - Farmácia; ²QMC-CFM-UFSC; ³UFSC - Farmacologia; ⁴PUC-RS - Cirurgia-Odontologia

Introdução: Tem sido demonstrado que a tripsina é capaz de evocar os sinais clássicos da resposta inflamatória, especialmente através da ativação de receptores PAR-2 e da produção secundária de diversos mediadores da inflamação (Paszczuk et al., Eur. J. Pharmacol., 581, 204, 2008). O presente estudo avaliou a participação da fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K) no edema de pata causado pela tripsina em camundongos. **Métodos:** Foram utilizados camundongos Suíços machos (N=8 por grupo; 25-30 g). O edema de pata foi induzido pela injeção intraplantar de tripsina (30 µg/pata, 50 µl) na pata direita. A pata esquerda recebeu o mesmo volume de solução salina e foi usada como controle. O edema foi determinado em pletismômetro, em vários intervalos de tempo (0,5 – 6 h), como a diferença de volume entre as patas direita e esquerda. Os animais foram pré-tratados com o inibidor seletivo da PI3K, AS605240 (3 – 30 mg/kg), por via oral, 30 min antes da aplicação de tripsina. Animais controle receberam solução salina, também por via oral. **Resultados:** A injeção intraplantar de tripsina (30 µg) causou edema de pata marcante e tempo-dependente em camundongos (área sob a curva = 686 ± 4). A administração oral de AS605240 causou uma redução significativa e dose-dependente do edema de pata induzido pela tripsina. As percentagens de inibição, calculadas com base nas áreas sob a curva, foram: $39 \pm 1\%$, $51 \pm 2\%$ e $37 \pm 1\%$; para as doses de 3, 10 e 30 mg/kg, respectivamente. **Discussão:** Os resultados do presente trabalho sugerem que a ativação da PI3K representa um dos mecanismos responsáveis pelas respostas inflamatórias causadas pela tripsina. Outros estudos estão sendo desenvolvidos a fim de melhor caracterizar a relevância PI3K nos efeitos inflamatórios de outras proteases. Apoio Financeiro: CNPq, PRONEX, BPA-PUCRS.

06.053
PRÊMIO INOVAÇÃO

06.054
PRÊMIO INOVAÇÃO

06.055

Efeito do veneno de *Bothrops insularis* (VBi) sobre a liberação de prostaglandina E₂ (PGE₂) e a expressão da ciclooxigenase-2 (COX-2) por leucócitos peritoneais. Souto, P.; Moreira, V.; Teixeira, C. F. P. Instituto Butantan - Farmacologia

Introdução: A serpente *Bothrops insularis* apresenta características genéticas e comportamentais diferenciadas, em relação às espécies continentais do mesmo gênero. Dados anteriores, demonstraram a capacidade do VBi induzir influxo leucocitário para o local de sua injeção. No entanto, os mecanismos envolvidos nas ações pró-inflamatórias deste veneno, particularmente em relação à liberação de prostanóides e a expressão protéica de COX-2, não foram esclarecidos. Neste estudo, avaliamos a capacidade do VBi induzir a liberação de PGE₂ e a expressão protéica de COX-2 por leucócitos peritoneais de camundongos. **Métodos:** O VBi (0,05 µg/g) foi administrado por via intraperitoneal (i.p.), em camundongos Swiss machos (18-20g). Após 1, 3, 6, 12, 24 e 48 h dessa administração, efetuou-se a lavagem da cavidade peritoneal com 2 mL salina apirogênica, seguida de centrifugação do exsudato coletado a 500 x g por 6 min., a 22°C. No precipitado de leucócitos analisou-se a expressão protéica de COX-2 por *western blotting* e no sobrenadante, a dosagem imunoenzimática de PGE₂. **Resultados:** O VBi causou aumento significativo da concentração de PGE₂ no exsudato peritoneal, em relação ao controle, desde aos 30 min. até a 48^a h de sua injeção. A concentração deste mediador foi máxima na 12^a hora (VBi=19094 ± 2969 pg/mL; controle=8697 ± 1465 pg/mL). Ainda, o VBi induziu o aparecimento de bandas correspondentes à COX-2, desde 1^a até a 12^a h de sua injeção. **Discussão:** Os dados obtidos indicam que o VBi é capaz de induzir a liberação de PGE₂ por período prolongado de tempo e a expressão protéica da COX-2, por leucócitos peritoneais. A COX-2 pode ser uma isoforma importante para a produção de PGE₂, causada pelo VBi. Estes estudos adicionam conhecimento aos mecanismos da ação inflamatória deste veneno. Apoio Financeiro: Apoio Financeiro: FAPESP, CNPq

06.056

Estudo da serinoproteinase PA-BJ, isolada do veneno da serpente *Bothrops jararaca*, sobre a viabilidade, integridade e liberação de prostaciclina por células endoteliais em cultura. Lima, S. A.; Matsubara, M. H.; Moreira, V.; Teixeira, C. F. P. Instituto Butantan - Farmacologia

Introdução: Os distúrbios da coagulação estão entre os efeitos mais graves do envenenamento causado pelas serpentes da família Viperidae. Dentre os componentes desses venenos, as serinoproteinases são as principais enzimas envolvidas nas alterações da hemostasia que ocorrem no envenenamento. No entanto, seus efeitos no endotélio não foram esclarecidos até o presente. Do veneno da serpente *Bothrops jararaca*, foi isolada a serinoproteinase PA-BJ, reconhecida como enzima trombina-símile. Esta enzima induz agregação plaquetária por meio dos receptores PAR-1 e -4. Este estudo avaliou os efeitos da PA-BJ sobre células endoteliais, em cultura, quanto à: a) viabilidade celular, b) integridade das monocamadas e c) liberação de prostaciclina. **Métodos:** As células endoteliais murinas, da linhagem tEnd, foram cultivadas em meio de cultura RPMI-1640 com 10% soro fetal bovino (SFB) e semeadas em microplacas de 96 poços, para a formação das monocamadas. Após atingirem confluência (48 horas), as CEs foram incubadas com PA-BJ, nas concentrações de 0,01, 0,1, 0,5 e 1 μ M ou TRITON X-100 0,1% (controle positivo), ou RPMI somente (controle), por 3 e 24 horas. Decorridos estes períodos de tempo, a citotoxicidade foi avaliada pelo ensaio enzimático da lactato desidrogenase (LDH), a atividade metabólica pela redução do sal de tetrazolium (MTT), a integridade pelo ensaio do cristal violeta e a prostaciclina por ensaio imunoenzimático. **Resultados:** A PA-BJ, nas concentrações e períodos avaliados, não afetou a viabilidade nem a integridade das monocamadas de CEs. Entretanto, na maior concentração, esta serinoproteinase induziu aumento da liberação de prostaciclina (66,7%), em relação às monocamadas de CEs controles, na 24^a hora. **Discussão:** Em conjunto, esses dados mostraram que a PA-BJ não alterou parâmetros como viabilidade e integridade de monocamadas de CEs em cultura. Por outro lado, essa serinoproteinase induziu, por ação direta, a produção de PGI₂ pelas CEs em cultura. Esta resposta do endotélio pode ser relevante na hemostasia, sob a ação da PA-BJ. Apoio Financeiro: Apoio financeiro: FAPESP e CNPq.

06.057
PRÊMIO INOVAÇÃO

06.058

Lipoxin A₄ mediates the effect of crotoxin on lymphocytes. Farom, S.¹; Sampaio, S. C.¹; Zambelli, V. O.¹; Zychar, B. C.¹; Carvalho, L. V.²; Gonçalves, L. R. C.¹; Sant Anna, O.²; Cury, Y.¹ ¹Instituto Butantan - Fisiopatologia; ²Instituto Butantan - Inumoquímica

Background: Experimental data have indicated that crotoxin (CTX), the main toxin of the venom of the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*, modulates the immune and inflammatory responses, interfering with the activity of macrophages and lymphocytes. Previous results showed that CTX decreases the number of lymphocytes in circulating blood and lymph. In addition, this toxin promotes leukocyte adherence to endothelial cells of blood microcirculation and to high endothelial venules of lymph nodes. Lipoxygenase(LO)-derived mediators mediate these effects, however, the type of eicosanoid involved in the action of the toxin was not characterized yet. This study aimed to investigate the involvement of lipoxin A₄ (LXA₄), an anti-inflammatory eicosanoid, LO-derived lipid mediator, in the effect of CTX on lymphocytes. **Material and Methods:** The number of lymphocytes in peripheral blood and the leukocyte–endothelium interactions, evaluated by intravital microscopy in cremaster venules, were determined 2 h after s.c. injection of CTX (18µg) or saline (control) in male Wistar rats. In addition, the effect of crotoxin administration (s.c.) on the expression of adhesion molecules in circulating lymphocytes and on endothelial cells was determined by flow cytometry and immunohistochemistry, respectively. The effect of CTX on lymphocyte proliferation and antibody anti-bovine serum albumin (BSA) production was also evaluated. **Results:** CTX reduced (35%) the number of circulating lymphocytes and promoted leukocyte adherence to endothelial cells of blood microcirculation. This toxin increased the expression of the adhesion molecule LFA-1 in lymphocytes, which might contribute to the drop in the number of these cells in blood circulation. CTX decreased (50%) concanavalin A-dependent lymphocyte proliferation and also induced a significant reduction (40%) in the level of anti-BSA IgG antibodies. Boc-2 (5 mg, i.p.), a LXA₄ receptor antagonist blocked the decrease in the number of circulating lymphocytes and avoided changes observed in leukocyte-endothelial interactions induced by crotoxin. Boc-2 also reversed the inhibitory effect of CTX on lymphocyte activities. **Discussion:** These findings indicate that lipoxin A₄ mediates the effect of crotoxin on lymphocyte mobilization and activities. Supported by: FAPESP and CNPq

06.059

Nitric oxide mediates lung vascular permeability and lymph-borne IL-6 after an intestinal ischemic insult. Breithaupt-Faloppa, A. C.; Vitoretti, L. B.; Rodrigues Coelho, F.; Lino dos Santos Franco, A.; Domingos, H. V.; Sudo-Hayashi, L. S.; Tavares de Lima, W.; Oliveira-Filho, R. M. ICB-USP - Farmacologia

Introduction: Lung injury following intestinal ischemia/reperfusion (I/R) is an issue of clinical concern that depends on neutrophil-endothelial cell interactions and on cytokines drained from the gut through lymph. Among the mediators detected upon acute lung injury, increased serum levels of interleukin (IL) 6 and nitric oxide (NO) are also found. In the present study we have investigated the putative presence of IL-6 in lymph after intestinal I/R and its role on the endothelial injury. The involvement of NO and IL-6 on vascular permeability (VP) and on the in vitro endothelial injury induced by intestinal I/R was also studied. **Methods:** Upon anesthesia, male rats were subjected to occlusion of the superior mesenteric artery (SMA) during 45 min, followed by 2 hr of intestinal reperfusion. Groups of rats were treated with the non-selective NO synthase inhibitor, L-NAME (N^w-nitro-L-arginine methyl ester, 5 mg/kg iv) 1 hr before occlusion of SMA. Lung vascular permeability was assessed by the Evans blue dye extravasation method. IL-6 was quantified by ELISA in samples of lymph collected from the thoracic duct. The detachment of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) in cell culture upon a 4 hr contact with lymph samples was evaluated. **Results:** Intestinal I/R caused an increase of lung VP, and this was reinforced early during the period of SMA occlusion upon treatment with L-NAME, which additionally induced release of IL-6 into the regional lymphatic flow. Lymph was able to cause a significant detachment of the HUVECs layer. **Discussion:** Our study indicates that the local and distant (pulmonary) injury due to intestinal I/R is triggered as early as the intestinal ischemia is installed and that NO blockade might exert a deleterious effect, probably by increasing both lung vascular permeability and the intestinal release of IL-6 that in turn may reach lungs by means of lymphatic draining. Apoio Financeiro: This study was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq). Ana Cristina Breithaupt-Faloppa was recipient of CNPq fellowship and Wothan Tavares de Lima is a fellow investigator of CNPq.

06.060

Anti-spasmodic activity of mangiferin, a xantone isolated from *Mangifera indica* L. Coelho, L. P.¹; Cardozo, S. V. S.¹; Silva, P. M. R. e¹; Cordeiro, R. S. B.¹; Dos Santos, M. H.²; Martins, M. A.¹ ¹FIOCRUZ Fisiologia e Farmacodinâmica; ²UNIFENAS – Farmácia

Aim: Plant isolated compounds have been screened in our laboratory in a systematic effort to discover new antiasthma substances. This study was undertaken in order to investigate the spasmolytic action of mangiferin and its possible mechanisms of action, using, as experimental model, the classical *ex vivo* systems of guinea pig trachea contraction. **Methods:** Guinea-pig isolated tracheal rings were contracted with carbachol (2,5 µM) or 5-HT (10 µM) and, once the contractions had reached a plateau, various concentrations of mangiferin (0.1–1000 µM) were added. All relaxations are expressed as a percentage of carbachol or 5-HT-induced contractile responses. In other experiments, guinea-pig was previously sensitized with 50 µg ovalbumin and the tracheal rings were mounted in isolated organ bath. At the end of the equilibration period, the response to carbachol (2.5 µM) was recorded. After washout of carbachol and re-establishment of stable baseline tone, tissues were exposed to antigen (ovalbumin, 1 ng-100 µg/mL), histamine (0,1-1000 µM), carbachol (0,01-100 µM) or 5-HT (0,01-10 µM) in the presence or absence of mangiferin (0,01-10 µM). The preparations were pre-incubated with mangiferin 15 min before addition of the spasmodic agents. All responses were expressed as percentage of response to 2.5 µM carbachol. Calcium cumulative in despolarized tissues by KCl (60 mM) was also investigated (0,01 - 30 mM). In order to clarify the spasmolytic mechanisms of mangiferin, the relaxation effect was investigated by epithelium removal, the presence of 100 µM L-NAME, 10 µM ODQ or 10 µM TEA given 10 min before 1 µM mangiferin treatment. **Results:** We found that mangiferin induced concentration-dependent relaxation responses in guinea-pig epithelium-intact trachea pre-contracted with carbachol or 5-HT (24,2 and 100% of relaxation, respectively). Mangiferin (10 µM) also inhibited the tracheal constrictions evoked by antigen, histamine, carbachol and 5-HT (88,3; 16,3; 39,06 and 63,6% of inhibition, respectively). It inhibited contraction-evoked by cumulative concentrations of Ca²⁺ in despolarized tissues (46,5%). We also found that antispasmodic effect of mangiferin (10 µM) was completely abolished in segments with denuded epithelium or pretreated with L-NAME, ODQ or TEA. **Conclusion:** These findings indicate that mangiferin relaxes and inhibits tracheal smooth muscle contraction induced by immunologic and non-immunologic stimulus. This effect is probably accounted for by epithelium-, nitric oxide- and sGC/cGMP-dependent mechanisms. Apoio Financeiro: FAPERJ, PAPES and CNPq

06.061

Role of sensory innervation in the rat pulmonary neutrophil recruitment induced by staphylococcal enterotoxins Type A (SEA) and B (SEB)

Desouza, I.¹; Camargo, E.¹; Mariano, N. S.¹; Optiz-Neto, J. B.²; Resende, J. L.²; Costa, S. K. P.³; Nucci, G. de¹; Antunes, E.¹ ¹UNICAMP - Farmacologia; ²FMJ - Biologia e Fisiologia; ³ICB-USP - Farmacologia;

Introduction: Rat airways exposure to Staphylococcal enterotoxin A (SEA) and B (SEB) induces marked neutrophil influx. Since sensory neuropeptides play important roles in cell infiltration, in this study we have investigated its contribution in triggering SEA- and SEB-induced pulmonary neutrophil infiltration. **Methods and Results:** Male Wistar rats were exposed intratracheally with SEA (3 ng/trachea) or SEB (250 ng/trachea). Animals received different *in vivo* pretreatments, after which the neutrophil counts and levels of substance P and IL-1 in BAL fluid were evaluated. Alveolar macrophages and peritoneal mast cells were incubated with SEA and SEB to determine the IL-1 and TNF- α levels. Capsaicin significantly reduced SEA- and SEB-induced neutrophil influx in BAL fluid, but this treatment was more effective to reduce SEA responses. Treatments with SR140333 (NK₁ antagonist) and SR48968 (NK₂ antagonist) decreased SEA-induced neutrophil influx, whereas SEB-induced responses were inhibited by SR140333 only. Mepyramine (histamine H₁ antagonist) significantly inhibited SEA (but not SEB)-induced neutrophil influx. Cyproheptadine (histamine/5-HT antagonist) markedly reduced SEA- and SEB-induced neutrophil influx, whereas MD 7222 (5-HT₃ antagonist) reduced SEA (but not SEB) responses. The substance P (SP) (PBS: 39.2 \pm 10.2; SEA: 112.0 \pm 16.5 and SEB: 60.6 \pm 6.9 ng/ml de BAL) IL-1 (PBS: 87.8 \pm 25.0; SEA: 670.3 \pm 136.0 and SEB: 337.5 \pm 74.0 pg/ml de BAL) levels in BAL fluid of SEA-exposed rats were approximately 2-fold higher than SEB. In addition, SEA (but not SEB) significantly released mast cell TNF- α . Increased production of TNF- α and IL-1 in alveolar macrophages was observed in response to SEA and SEB. **Conclusions:** Sensory neuropeptides contribute significantly to SEA- and SEB-induced pulmonary neutrophil recruitment, but SEA requires in a higher extent the airways sensory innervation, and participation of mast cells and alveolar macrophage products. Financial Support: FAPESP.

06.062
PRÊMIO INOVAÇÃO

06.063

Papel dos mastócitos na reabsorção óssea em camundongos diabéticos submetidos à doença periodontal. Freire, I.R.¹; Salzedas, L. M. P.²; Oliveira, S. H. P.³ ¹UNESP - Odontologia Infantil e Social - Ciências Básicas; ²UNESP-Araçatuba - Radiologia; ³UNESP-Araçatuba - Odontologia - Ciências Básicas

O objetivo do estudo foi avaliar os níveis de reabsorção óssea em camundongos diabéticos com doença periodontal (DP) e o papel dos mastócitos (MAST) no processo. Além disso, avaliamos a enzima mieloperoxidase (MPO) no tecido gengival desses animais. Camundongos balb/c foram pré-tratados com dose única de estreptozotocina (STZ) (170 µg/g) para indução de diabetes. Sete dias após o tratamento, uma alíquota de sangue foi coletada para determinação da glicemia. Animais com valor igual ou superior a 250 mg/dl de glicose foram considerados diabéticos. Para avaliar o papel dos MAST no controle da DP, camundongos foram depletados, sistemicamente, de MAST pelo tratamento com composto 48/80 (48/80), i.p, administrado no 1º, 2º e 3º dias, em duas doses diárias de 0.6 mg/kg e no 4º dia em duas doses de 1.2 mg/kg (intervalo de 12hs entre as doses). No 5º dia foi realizada a ligadura dos primeiros molares homólogos com fio de seda para indução da DP nos camundongos diabéticos e controles. Os NE acumulados no tecido gengival foram determinados pela presença da MPO, onde realizamos a dosagem através do ensaio enzimático de MPO por ELISA. As mandíbulas foram dissecadas para determinar os níveis de reabsorção óssea, radiografadas e analisadas pelo software *Digora*. Observamos, por meio das análises radiográficas, a ocorrência de DP nos animais normais (Média 34,76 ± EPM 2,51; p <0,001) e diabéticos submetidos à ligadura, comprovada pela presença da reabsorção óssea. Os animais diabéticos com DP apresentaram uma perda óssea significativa (Média 25,34 ± EPM 2,26; p <0,001) quando comparado ao grupo controle. Esta perda foi potenciada nos animais diabéticos com DP tratados com o 48/80 (Média 18,62 ± EPM 1,24; p <0,001). Observamos elevados níveis de MPO nos animais normais (Média 22,73 ± EPM 2,03) e diabéticos (Média 20,32 ± EPM 1,17), onde a coleta de gengiva foi realizada 14 dias após a indução da DP. Nos animais diabéticos com DP tratados com 48/80 observamos uma redução parcial dos níveis de MPO (Média 11,50 ± EPM 0,27), no entanto nos animais normais com DP tratados com 48/80 não observamos essa redução (Média 22,5 ± EPM 2,34). Em conclusão nossos resultados preliminares sugerem que a diabetes favorece o aumento de perda óssea na DP, sendo mais agravante na ausência de MAST, sugerindo, portanto, o papel protetor do MAST na perda óssea. Quanto a MPO nos animais diabéticos com DP tratados com 48/80, mas não nos animais normais, a ausência do MAST diminuiu parcialmente o acúmulo de NE, sugerindo que na diabetes, possivelmente a atividade quimiotática para NE parcialmente depende de MAST, diferentemente dos animais normais com DP tratados com 48/80. Apoio Financeiro: FAPESP

06.064

Avaliação da hiperreatividade pulmonar em camundongos silicóticos: um papel para óxido nítrico? Dias, D. F.; Ferreira, T. P. T.; Ciambarella, B. T.; Arantes, A. C. S. de; Martins, M. A.; Silva, P. M. R. e FIOCRUZ - Fisiologia e Farmacodinâmica

Introdução: A silicose é uma doença pulmonar crônica, causada pela exposição prolongada a partículas de sílica na forma cristalina, sendo caracterizada por um processo inflamatório pulmonar intenso e conseqüente fibrose. Nesta doença, vários são os mediadores participantes dentre os quais destaca-se o óxido nítrico, que é tido como um marcador do quadro inflamatório na silicose. Considerando haver um importante comprometimento da função pulmonar causada pela silicose, no presente estudo investigamos a existência de hiperreatividade pulmonar em camundongos silicóticos e o potencial envolvimento do óxido nítrico neste processo. **Métodos:** Camundongos Swiss-Webster, C57/Bl6 (*wildtype*) e *knockout* para a enzima óxido sintase induzida (iNOS^{-/-}) foram anestesiados e instilados com sílica (10 mg/50 µL) por via intranasal, e as análises realizadas após 7 (fase aguda) e 28 dias (fase crônica). A resposta de hiperreatividade pulmonar foi avaliada através do sistema de pletismógrafo de corpo inteiro invasivo (Buxco) e o óxido nítrico quantificado no lavado broncoalveolar pela técnica de Griess. Tratamento com o inibidor de NOS L-NAME 30 mg/kg, v.o.) foi realizado uma vez ao dia durante 7 dias consecutivos, iniciando-se 6 h após a instilação da sílica. **Resultados:** Verificamos que camundongos silicóticos apresentaram níveis basais de resistência e elastância superiores aos observados nos animais normais, em ambos os tempos analisados. Na condição de aerolização com o agente broncoconstritor colinérgico metacolina, vimos que os animais silicóticos responderam de forma exacerbada em ambos os parâmetros, resistência e elastância, quando comparados aos animais normais, caracterizando assim um quadro de hiperreatividade pulmonar (7 e 28 dias). A quantificação de óxido nítrico revelou haver aumento significativo no conteúdo presente no lavado broncoalveolar dos animais silicóticos. Na etapa seguinte, demonstramos que camundongos iNOS^{-/-} quando instilados com sílica apresentaram clara atenuação do quadro de hiperreatividade pulmonar em comparação aos *wildtype*, tanto em 7 como em 28 dias após instilação com sílica. De forma coerente, vimos que o tratamento dos animais silicóticos com L-NAME inibiu de forma significativa a resposta de hiperreatividade à metacolina. **Discussão:** Nossos achados mostram que animais silicóticos apresentam-se claramente hiperreativos à estimulação com o agente broncoconstritor metacolina, e que este processo parece ser dependente da geração local de óxido nítrico decorrente, pelo menos em parte, da ativação da via da óxido nítrico sintase induzida. Apoio Financeiro: PAPES 4/FIOCRUZ, CNPq, FAPERJ (Brasil) e UNESCO (França).

06.065

Participação do fator inibitório da migração de macrófagos (MIF) na inflamação pulmonar induzida por sílica em camundongos. Gallois, K. D.¹; Ferreira, T. P. T.¹; Arantes, A. C. S. de¹; Bozza, M.²; Cordeiro, R. S. B.¹; Hogaboam, C.³; Martins, M. A.¹; Silva, P. M. R. e¹ ¹FIOCRUZ - Fisiologia e Farmacodinâmica; ²UFRJ - Imunologia; ³Universidade de Michigan - USA - Patologia

Introdução: Silicose, pneumoconiose de maior prevalência no Brasil, resulta da exposição à partículas de sílica cristalina, sendo caracterizada por infiltrado inflamatório, nódulos silicóticos e deposição de colágeno, em um contexto dependente de mediadores. O fator inibitório da migração de macrófagos (MIF) é uma citocina próinflamatória atuante em diversos tipos de patologias. Neste estudo investigamos a participação do MIF no modelo experimental de silicose murina. **Métodos:** Camundongos “wild-type” (Balb/c) e MIF “knockout” (MIF^{-/-}) foram submetidos à instilação de 10 mg de sílica (tamanho da partícula: 0,5-10 µm), diluídos em solução salina estéril, sendo as análises realizadas em 7 (fase aguda) e 28 dias (fase crônica) pós-sílica. A morfologia pulmonar foi avaliada por métodos clássicos de histologia e por morfometria. A quantificação de citocinas e quimiocinas foi realizada por ELISA e a quantificação de colágeno através da técnica de Sircol. **Resultados:** A análise tecidual mostrou intenso infiltrado de células inflamatórias 7 dias pós-sílica nos grupos de camundongos silicóticos, seguido da formação de granuloma de localização peribronquiolar e de fibrose tecidual com 28 dias. Verificamos, também, que camundongos silicóticos apresentaram aumento no conteúdo de colágeno no tecido pulmonar quando comparados ao dos controles. Por sua vez, camundongos MIF^{-/-} silicóticos apresentaram diminuição significativa da deposição de colágeno em comparação ao grupo “wild-type” silicótico, 28 dias pós-sílica. Aumento significativo nos níveis de MIP-1α e MIP-2, assim como de TNF-α e TGF-β nos grupos de camundongos silicóticos, foi detectado em ambos tempos de análise. Contudo, camundongos MIF^{-/-} silicóticos apresentaram redução nos níveis de MIP-1α e MIP-2 na fase aguda, juntamente com nódulos silicóticos de menor proporção. Em contraste, foi verificado processo exacerbado de granulomas no pulmão dos camundongos MIF^{-/-} silicóticos, 28 dias pós-sílica, ratificado através da detecção de marcado aumento na fração da área de granuloma e níveis mais elevados de TNF-α e TGF-β quando comparados ao grupo de camundongos “wild-type”. **Discussão:** Nossos resultados demonstram uma redução da resposta inflamatória pulmonar de fase aguda nos camundongos MIF^{-/-}, baseado na atenuação do infiltrado leucocitário e do quantitativo de mediadores inflamatórios, bem como uma exacerbação da fase crônica, indicando a participação modulatória do MIF na fisiopatologia da silicose. Apoio Financeiro: CNPq, FAPERJ, UNESCO.

06.066

JM 25-1, a non-anesthetic lidocaine derivative, inhibits airway remodeling in a murine model of acute allergic inflammation. Serra, M. F.¹; Couto, G. C.¹; Anjos-Valotta, E. A. dos¹; Santos, T. P. O.¹; Pires, A. L. de A.¹; Costa, J. C. S.²; Cordeiro, R. S. B.¹; Silva, P. M. R. e¹; Martins, M. A.¹
¹FIOCRUZ - Fisiologia e Farmacodinâmica; ²FIOCRUZ - Far-manguinhos

Background and aim: Local anesthetics, particularly lidocaine, have received interest as possible new class of pharmacological agents for the treatment of asthma. Recently, we have demonstrated that JM25-1, non-anesthetic lidocaine analogue, was effective in inhibiting allergen-induced lung eosinophilic inflammation and airway hyperreactivity in a murine model of allergy that expressed a certain degree of refractoriness to dexamethasone treatment. We sought to study here the effect of JM25-1 on allergen-evoked airway remodeling and mucus production. **Methods:** Mice of strain A/J were subcutaneously sensitized on days 0 and 14 by a mixture of Al(OH)₃ and ovalbumin (OVA) and challenged on days 19 and 20 by 25 µg OVA (25 µl, intranasal instillations i.n.). Nebulization with JM25-1 (1%, 30 min) was performed immediately after ovalbumin provocations. Subepithelial airway fibrosis, mucus production and peribronchial eosinophil infiltration were measured 24 h after the last provocation, by histomorphometry in formalin-fixed and paraffin-embedded lung sections stained with Trichrome Gomori, Periodic acid-Schiff (PAS) or Hematoxylin and Eosin (H & E). Lung levels of IL-4, IL-5, eotaxin-1 and eotaxin-2 were quantified by ELISA. **Results:** Histological analysis of the airways revealed that OVA-challenged mice developed a peribronchial fibrosis, marked goblet cell hyperplasia within the bronchi in the lung and peribronchial eosinophil cellular infiltration as compared to vehicle-treated mice. Morphometric analysis showed that JM25-1 significantly attenuated peribronchial fibrosis (2.81 ± 0.73 to $1.02 \pm 0.14 \times 10^4$ per μm^2 (Mean \pm SEM, n=5), the number of PAS⁺ cells / bronchus (0.07 ± 0.15 to $0.01 \pm 0.00 \times 10^4$ per μm^2 (Mean \pm SEM, n=5) and peribronchial eosinophil numbers (11.01 ± 2.36 to $4.98 \pm 1.62 \times 10^4$ per μm^2 (Mean \pm SEM, n=5). Furthermore, JM25-1 inhibited levels of IL-4, IL-5, eotaxin-1 and eotaxin-2 induced by OVA challenges. **Conclusion:** Our findings show that aerosolized JM25-1 inhibits peribronchial fibrosis, goblet cell hyperplasia and peribronchial eosinophil infiltration in a murine model of asthma. These effects seem to be close-related to the blockade of generation of Th2 cytokines and chemokines that play a pivotal role in the pathophysiology of asthma such as IL-4, IL-5, eotaxin 1 and eotaxin 2. Taken together, these results provide evidence that JM25-1 should be further investigated as a putative alternative for asthma therapy. Apoio Financeiro: FAPERJ, CNPq and PDTIS.

06.067

Participação da PKC, mas não das ciclooxigenases, na formação de corpúsculos lipídicos, induzida pela FLA₂ MT-III, isolada do veneno da serpente *Bothrops asper*. Leiguez Jr, E.¹; Zuliani, J. P.²; Gutiérrez, J. M.³; Teixeira, C. F. P.¹ ¹Instituto Butantan - Farmacologia; ²IPEPATRO - Bioquímica; ³Universidade da Costa Rica - Instituto Clodomiro Picado

Introdução: Os corpúsculos lipídicos (CLs) são inclusões citoplasmáticas, cuja formação é rapidamente induzida em processos inflamatórios. A gênese destas inclusões lipídicas está relacionada a vias de sinalização específicas. Estudos preliminares de nosso laboratório demonstraram que a MT-III, uma fosfolipase A₂, isolada do veneno da serpente *Bothrops asper*, além de induzir eventos inflamatórios relevantes, estimula a formação de CLs, em macrófagos. Diante disso, neste estudo, avaliamos a participação da proteína cinase C (PKC) e das ciclooxigenases (COX-1 e COX-2), na formação dos CLs, induzida pela MT-III, em macrófagos murinos isolados. **Métodos:** Os macrófagos foram obtidos da cavidade peritoneal de camundongos Swiss machos, após 96 horas da injeção de tioglicolato (3%). As células foram pré-tratadas com os inibidores da PKC, estaurosporina (1 mM) ou o composto H7 (6, 20 e 40 mM), por 15 min, ou com a indometacina (1 mg/ml), inibidor das COX-1 e COX-2 ou celecoxibe (1 mM) ou etoricoxibe (1 mM), inibidores específicos da COX-2, ou com seus respectivos veículos, por 40 min antes e concomitantemente com a MT-III (6,3 µg/mL), por 1 hora. A formação dos CLs foi mensurada por marcação com tetróxido de ósmio a 1% e contagem por microscopia de contraste de fase. **Resultados:** Os resultados obtidos mostraram que a MT-III induziu a formação de 3.22 ± 0.37 CLs/célula, significativo em relação ao controle (0.41 ± 0.09 CLs/célula). O tratamento dos macrófagos com estaurosporina causou uma diminuição significativa (69,75%) do número de CLs/célula, induzido pela MT-III, em relação ao controle. Da mesma forma, o composto H7 reduziu a formação de CLs/célula, induzida pela MT-III, na ordem de 86%, em relação ao controle, não tendo havido diferença significativa entre as concentrações utilizadas. No entanto, a indometacina, o celecoxibe e o etoricoxibe não modificaram o número de CLs/célula, sob ação da MT-III, em macrófagos, quando comparado aos controles. **Discussão:** Esses dados demonstram que a formação dos CLs, induzida pela MT-III, em macrófagos, é mediada pela PKC, mas não pelas ciclooxigenases -1 e -2.

Apoio Financeiro: FAPESP e CNPq

06.068

Diminuição da resposta edematogênica induzida por carragenina na pata em modelos de doença inflamatória intestinal em ratos. Barbosa, A. L. R.¹; Medeiros, J-V. R.¹; Soares, P. M. G.; Lima-Júnior, R. C. P.; Gomes, A. S.; Ribeiro, R. A.; Souza, M. H. L. P. UFC - Fisiologia e Farmacologia

Introdução: Recentemente foi demonstrado que portadores de Doença de Crohn apresentam uma diminuição da resposta inflamatória aguda, caracterizada por uma diminuição na infiltração de neutrófilos e da produção IL-8 (Marks D.J et al., *Lancet*. 2006 Feb 25;367-9511:668-78). Tendo em vista poucos dados experimentais que evidenciem a influência das doenças inflamatórias sobre o processo inflamatório agudo, o presente trabalho tem como objetivo avaliar no desenvolvimento experimental das doenças inflamatórias intestinais o edema de pata induzido por carragenina. **Métodos:** As doenças inflamatórias intestinais (colites) foram induzidas por TNBS (20 mg/animal, modelo de Crohn), iodoacetamida (IODO;6%, modelo de retocolite ulcerativa) ou álcool (50%, colite inespecífica) por via transanal. Três dias após a indução da colite, animais com ou sem colite receberam Carragenina (Cg; 300µg/pata direita) injetada na região intraplantar. O edema foi avaliado 1, 2, 3 e 4hs após o estímulo por pletismometria. No final o cólon dos animais foram retirados para análise macroscópica e mensuração do peso. **Resultados:** Nas colites induzidas por TNBS, iodoacetamida e álcool observou-se uma lesão colônica, com achados macroscópicos pontuados em escores (TNBS=9,5(8,0-15,0), IODO=9,5(6,0-11,0), Etanol=9,0(6,0-10,0) e aumento do peso (TNBS=190,70 ± 20,01 mg/cm de lesão, IODO=160,00 ± 34,47mg/cm de lesão, Etanol = 213,6 ± 26,92 mg/cm de lesão) em comparação ao grupo controle (Escore=0(0-0) , peso = 70,40 ± 6,06mg/cm de lesão). Tanto na colite por TNBS (Cg+TNBS - 1^ªh;0,03 ± 0,03 ml e 3^ªh;0,23 ± 0,04 ml), como por iodoacetamida (Cg+IODO - 1^ªh;0,06 ± 0,01 ml e 3^ªh;0,24 ± 0,06ml), mas não na colite por etanol (Cg+etanol - 1^ªh;0,19 ± 0,06ml e 3^ªh;0,56 ± 0,04ml), foi observado uma menor resposta edematogênica da Cg, quando comparado ao grupo controle (Controle 1^ªh;0,31 ± 0,07 ml e 3^ªh;0,72 ± 0,12ml). **Discussão:** Em modelos experimentais de doença inflamatória intestinal em ratos existe uma diminuição da resposta edematogênica na pata induzida pela carragenina, podendo assim inferir que a curso da doença inflamatória intestinal pode reduzir a resposta inflamatória aguda em sítios distantes do cólon..

06.069

Envolvimento do óxido nítrico derivado da óxido nítrico sintase induzida na patogênese da mucosite intestinal induzida por irinotecano em camundongos: ativação seqüencial via TNF- α . Lima-Júnior, R. C. P.¹; Freitas, H. C.¹; Leite, L. L.¹; Nunes, L. G.¹; Miranda, S. P.¹; Brito, G. A. C.²; Vale, M. L.¹; Cunha, F. de Q.³; Souza, M. H. L. P.¹; Ribeiro, R. A.¹ ¹UFC - Fisiologia e Farmacologia; ²UFC - Morfologia; ³FMRP-USP

Introdução: A Mucosite Intestinal (MI) e a diarreia severas são efeitos colaterais freqüentes (15-25%) e limitantes do tratamento do câncer de cólon com Irinotecano (CPT11). Devido às limitações no controle efetivo da MI e diarreia, bem como ao componente inflamatório envolvido, decidimos investigar o papel do óxido nítrico (NO) na patogênese da MI induzida por CPT11. **Métodos:** Animais *knockout* para a óxido nítrico sintase induzida (iNOS^{-/-}) e C57BL/6, machos, foram divididos em grupos (n=4-5). Grupo I: C57BL/6+salina; II: C57BL/6+CPT11 (60 mg/kg/4 dias, i.p); III: aminoguanidina (AG, 50 mg/kg, s.c, 2x/dia/4 dias)+CPT11 IV: iNOS^{-/-}; V: iNOS^{-/-}+CPT11; VI: C57BL/6+CPT11+pentoxifilina (1,7 mg/kg/4 dias, s.c) ou talidomida (60 mg/kg/4 dias, s.c). No 5º dia, avaliou-se a diarreia apresentada, e sangue foi coletado para a contagem de leucócitos (leucócitos $\times 10^3$ /mL). Após sacrifício, coletou-se duodeno para análise de mieloperoxidase (MPO, neutrófilos/mg de tecido), análise morfométrica (razão vilos/cripta), contratilidade *in vitro* induzida por acetilcolina (%contração comparada à contração por KCl60mM) e análise imunohistoquímica para iNOS. Os dados foram analisados com o teste ANOVA/Student Newman Keul ou Kruskal Wallis/Dunn's. P<0,05 foi aceito. **Resultados:** CPT11 induziu significativa leucopenia (p<0,05) nos grupos AG e iNOS^{-/-} (4638 \pm 488 e 3883 \pm 712, respectivamente) em comparação ao respectivos controles I e IV (9520 \pm 1476; 9367 \pm 2492). AG e iNOS^{-/-} tratados com CPT11 preveniram (p<0,05) o aumento da atividade da MPO (1814 \pm 327 e 231 \pm 103, respectivamente) e alterações morfométricas (284 \pm 8 e 241 \pm 19) comparados ao grupo que recebeu apenas CPT11 (3319 \pm 407 (MPO); 156 \pm 14 (morfometria)). O CPT11 induziu (p<0,05) aumento da contratilidade *in vitro* (176,1 \pm 54,7), não observado nos grupos AG (89,3 \pm 96) e iNOS^{-/-} (69,4 \pm 7,1) que receberam CPT11. Menor grau de diarreia (p<0,05) foi encontrado nos grupos AG e iNOS^{-/-} tratados com CPT-11 (1,5[1-2] e 1[1-1], respectivamente) vs CPT11 (3[3-3]). O tratamento com pentoxifilina inibiu significativamente (p<0,05) a imunomarcção para iNOS (1,5[1-2]) comparado ao grupo CPT11 (4[3-4]). Contudo, a talidomida foi ineficaz ao não prevenir esse efeito (2,5[2-4]) (P>0,05). **Conclusão:** Desse modo, sugere-se que o NO esteja envolvido na patogênese da MI induzida por CPT11 e que o TNF- α assume papel importante na cascata de ativação desse mediador. Apoio Financeiro: Capes/CNPq.

06.070

Papel da proteína de fase aguda hemopexina na falência da migração de neutrófilos na sepse grave. Spiller, F.¹; Costa, C.²; Souto, F. O.¹; Laure, H. J.³; Mestriner, F. L. A. C.¹; Orrico, M. I. L.¹; Alves-Filho, J. C.¹; Freitas, A.¹; Rosa, J. C.³; Ferreira, S. H.¹; Hirsch, E.²; Tolosano, E.²; Greene, L. J.³; Cunha, F. de Q.¹ ¹FMRP-USP - Farmacologia; ²Universidade de Torino - Biotecnologia Molecular; ³FMRP-USP - Biologia Celular, Molecular e Bioagentes Patogênicos

A proteína de fase aguda alfa-1-glicoproteína ácida (AGP) possui um papel inibitório sobre a migração de neutrófilos para o foco infeccioso durante a sepse em humanos (Mestriner FL. PNAS, 49, 19595, 2007). Na sepse experimental murina, os níveis plasmáticos de AGP são significativamente elevados somente 6 h após a indução da sepse grave. Entretanto, 2 h após a indução de sepse grave estes animais apresentam comprometimento em etapas fundamentais para a migração dos neutrófilos (Rios-Santos F. AJRCCM, 5, 490, 2007). Embora AGP seja um mediador importante para a falência da migração de neutrófilos na sepse em humanos, nossos dados sugerem que esta proteína não está envolvida nos estágios iniciais da sepse em camundongos. Uma vez que a intervenção terapêutica precoce nessa patologia pode inibir a disfunção múltipla de órgãos e conseqüentemente a alta incidência de mortalidade, o objetivo desse estudo é identificar mediadores da falência da migração de neutrófilos para o foco infeccioso na fase inicial da sepse grave em camundongos. O pré-tratamento (30 min) com *pool* de soro sanguíneo (40 mg/kg, iv), coletado 2 h após a indução de sepse grave em camundongos, inibe a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal induzida por carragenina (500 µg/cavidade) em camundongos *naïves*. Através das cromatografias com resina Blue-Sepharose e HPLC e pela eletroforese nativa nós isolamos as proteínas presentes nesse soro com atividade inibitória sobre a migração de neutrófilos. A análise por espectrometria de massa mostrou que uma dessas proteínas é a proteína de fase aguda hemopexina (Hx). Nesse contexto, *pool* de soro sanguíneo coletado 2 h após a indução de sepse grave em camundongos nocautes para Hx (Hx^{-/-}) não inibe a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal, diferentemente do *pool* de soro coletado no mesmo período de camundongos selvagens (Hx^{+/+}). A indução de sepse grave em camundongos Hx^{-/-} previne a falência da migração de neutrófilos para o foco infeccioso, diminui o número de bactérias no sangue e aumenta a sobrevivência em torno de 40%, quando comparado com camundongos Hx^{+/+}. Além disso, o pré-tratamento (30 min, i.v) com Hx inibe a migração de neutrófilos para o foco infeccioso e, conseqüentemente, aumenta a disseminação bacteriana e a taxa de mortalidade em camundongos submetidos a sepse não-grave. *In vitro*, Hx (1 µM) inibe a resposta quimiotática de neutrófilos induzida por C5a (100 nM) em câmara de Boyden. Os dados demonstraram um papel inibitório da proteína de fase aguda Hx sobre a migração de neutrófilos para o foco infeccioso durante a sepse grave. Portanto, a inibição farmacológica da atividade dessa proteína pode acarretar em aumento da sobrevivência nessa patologia, como sugerido pela indução de sepse nos camundongos Hx^{-/-}. Apoio Financeiro: FAPESP, CAPES, CNPq e FAEPA

06.071

Papel da caspase-1 e da interleucina-18 na patogênese da resposta inflamatória e das alterações morfofuncionais da mucosite intestinal induzida por irinotecano em camundongos. Freitas, H. C.¹; Lima-Júnior, R. C. P.¹; Medeiros, R. P.¹; Marques Neto, R. D.¹; Silva, L. R.¹; Vale, M. L.¹; Teixeira, M. M.²; Brito, G. A. C.³; Cunha, F. de Q.⁴; Souza, M. H. L. P.¹; Ribeiro, R. A.¹ ¹UFC - Fisiologia e Farmacologia; ²UFMG - Bioquímica e Imunologia; ³UFC - Morfologia; ⁴FMRP-USP

Introdução: A Mucosite Intestinal (MI) e a diarreia severas são efeitos colaterais frequentes (15-25%) da terapia do câncer de cólon com Irinotecano (CPT11). Dado o efeito pró-inflamatório da IL-18 e da caspase-1 na sua ativação, estudamos o papel da via caspase-1-IL18 na patogênese da MI por CPT11 e o envolvimento do óxido nítrico (NO) como produto dessa via. **Métodos:** Camundongos C57BL/6 (BL) e Caspase-1 *knockout* (Casp^{-/-}), BALB/c (BC) e IL18 *knockout* (IL-18^{-/-}), machos, 22 g, foram divididos em grupos (n=4-5) e tratados por 4 dias com salina (5 mL/kg, i.p) ou CPT11 (60 mg/kg, i.p). Um grupo BC recebeu IL-18bp (ligante de IL18, 200 µg/animal/4 dias, i.p.)+CPT11. No 5º dia, avaliou-se a diarreia, o leucograma (leucócitosx10³/mL) e, após sacrifício, coletou-se o duodeno para dosagem da atividade de mieloperoxidase (AtMPO) (neutrófilos/mg tecido) e de óxido nítrico sintase induzida (At-iNOS pM citrulina/h/mg proteína), morfometria (RVC, razão vilo/crípta) e contratilidade *in vitro* (Civ, %contração em relação ao KCl60mM). Para análise estatística utilizou-se ANOVA/Newman-Keuls ou Kruskal Wallis/Dunn. P<0,05 foi aceito. **Resultados:** O CPT11 induziu leucopenia (p<0,05) em animais BL (2238 ± 815), Casp^{-/-} (1175 ± 408), BC e BC+IL-18bp (1717 ± 291 e 1983 ± 552), IL-18^{-/-} (3281 ± 683) versus os tratados com salina 11980 ± 1848; 10790 ± 807; 7125 ± 883 e 6479 ± 1189, respectivamente. Animais BL+CPT11 e BC+CPT11, versus os respectivos controles salina, apresentaram significativo (p<0,05) aumento da AtMPO (10940 ± 830 e 15620 ± 940 vs 6097 ± 1028 e 11130 ± 800) e de At-iNOS (3,34 ± 0,56 e 3,03 ± 0,50 vs 0,88 ± 0,60 e 0,85 ± 0,15), redução na RVC (1,22 ± 0,15 e 1,02 ± 0,10 vs 3,71 ± 0,20 e 3,49 ± 0,19), aumento da Civ (155,8 ± 16,5 e 298 ± 51 vs 96,9 ± 2,5 e 119 ± 18) e da diarreia (3[1-3] e 1[1-2] vs 0[0-0] e 0[0-0]). Casp^{-/-}+CPT11 não apresentou alterações significativas (p>0,05) nos parâmetros citados (6169 ± 564; 0,73 ± 0,36; 2,10 ± 0,17; 118,2 ± 8,8; 1,5[1-3]) versus Casp^{-/-} (4573 ± 217; 0,97 ± 0,89; 2,37 ± 0,13; 101,9 ± 14,7 e 0[0-0], respectivamente). Além disso, IL-18^{-/-}+CPT11 não apresentou significativas alterações (p>0,05) nos parâmetros citados (10350 ± 1033; 0,89 ± 0,36; 2,55 ± 0,25; 127 ± 19; 0[0-2]) versus IL-18^{-/-} (8007 ± 579; 1,24 ± 0,43; 2,44 ± 0,20; 131 ± 9 e 0[0-0], respectivamente). Em adição, IL-18bp protegeu animais BC (p<0,05) contra essas alterações induzidas por CPT11 (1942 ± 842; 1,78 ± 0,03; 1,62 ± 0,11; 138,3 ± 5,8 e 1[0-2]) versus BC+CPT11. **Conclusão:** Sugere-se que a via caspase-1-IL-18 esteja envolvida na patogênese da MI induzida por CPT11, ativando iNOS e a síntese de NO. Apoio Financeiro: CAPES/CNPq.

06.072

Atrasentan, an endothelin ET_A receptor antagonist, attenuates acute experimental colitis in mice. Claudino, R. F.; Bento, A. F.; Marcon, R.; Chichorro, J. G.; Calixto, J. B.; Rae, G. A. UFSC - Farmacologia

Introduction: Endothelins (ETs) are endogenous peptides which exert potent and widespread effects via activation of endothelin ET_A and ET_B G protein-coupled receptors. Recent evidence suggests that inflammatory bowel disease (IBD) is associated with elevated intestinal concentrations of ETs and an up-regulation in ET receptor expression on intestinal vascular endothelium. Thus, the ET system may constitute a relevant therapeutic target in IBD.

Objectives: The aim of this study was to determine the susceptibility of colonic inflammation in a mouse model of TNBS-induced IBD to reversal by treatment with the selective ET_A receptor antagonist atrasentan. **Methods and Results:** Male Balb/c mice (20-25g) were fasted for 24 h and anesthetized with xylazine and ketamine. Colitis was induced by intracolonic administration of 1.5 mg TNBS in 0.1 mL of 50% ethanol. Starting 24 h after colitis induction, mice were treated with vehicle, atrasentan (1-10 mg/kg once daily, i.v.) or dexamethasone (1 mg/kg twice daily, s.c.). At later time points up to 72 h, mice were monitored for body weight loss and overall mortality. Mice were killed 72 h after TNBS treatment and the following parameters were evaluated: the macroscopic damage, colon weight, MPO activity and tissue cytokine levels (MIP-2 and KC). All experiment procedures were previously approved by the Committee on the Ethical Use of Animals of the UFSC. At later time points up to 72 h after TNBS administration, mice developed signs of a severe illness characterized by bloody diarrhea and a profound and sustained weight loss, which resulted in a high mortality rate (65 %), whereas control mice rapidly recovered weight after the starvation period and did not die. Atrasentan (10 mg/kg/day)-treated mice rapidly recovered from body weight loss and had a survival rate of 73 %. In contrast, most mice given dexamethasone (1 mg/kg/twice a day, s.c.) survived, but did not recover body weight. Macroscopic damage and MPO activity were increased 20-fold in colon tissue of TNBS-treated mice as compared to control values. Treatment with dexamethasone or atrasentan (3 and 10 mg/kg/day) reduced macroscopic damage. MPO activity was also reduced by dexamethasone or atrasentan (10 mg/kg/day, but not 1 or 3 mg/kg/day). TNBS-induced colitis markedly increased colonic MIP-2 and KC levels at 72 h (2.4 and 3.7-fold, respectively), and such increases were fully blocked by treatment with dexamethasone or atrasentan (10 mg/kg/day). **Conclusion:** Altogether, these results show that curative treatment with the highly selective ET_A receptor antagonist atrasentan significantly attenuated colonic injury and inflammation parameters induced by TNBS in mice. Experiments aiming to further elucidate the mechanisms underlying this effect are now in progress. Apoio Financeiro: CAPES, CNPq, PRONEX, FAPESC

06.073

Critical role of CXCR2 and KC in colonic damage in acute experimental colitis in mice. Bento, A. F.¹; Leite, D. F. P.¹; Hara, D. B.¹; Claudino, R. F.¹; Marcon, R.¹; Leal, P. C.²; Calixto, J. B.¹
¹UFSC - Farmacologia; ²QMC-CFM-UFSC

Introduction: Although neutrophils are strongly implicated in eliminating pathogens, excessive recruitment may cause tissue damage. Therefore, reducing cell influx during an inflammatory process may be a potential target for treating inflammatory bowel diseases (IBD). Since CXCR2 and its ligands (eg. KC and MIP-2) are involved in neutrophil migration, this study aimed to evaluate whether the systemic therapeutic treatment with selective CXCR2 antagonist, SB225002, or neutralization of KC ameliorates experimental colitis. **Methods:** Colitis was induced in mice by trinitrobenzene sulphonic acid (TNBS). Briefly, 24 hours-fasted male Balb/c mice (20-25g) were anesthetized with xylazine and ketamine. To induce colitis, animals received 0.1 mL of 1.5 mg TNBS in 35% ethanol into the colon via a catheter. After colitis establishment (24 h), mice were treated with SB225002. At later time points up to 72 h, mice were monitored for body weight loss and overall mortality. At the time of sacrifice, colonic tissues were scored for macro and microscopic damage and cytokine levels, myeloperoxidase (MPO) and eosinophil peroxidase (EPO) activity and some proteins expression were analyzed. Additionally, curative treatment with mouse anti-KC was performed and macroscopic damage and MPO activity were analyzed. Dexamethasone was used as a positive control in all experiments. The Ethics Committee of the Universidade Federal de Santa Catarina (Florianópolis, SC, Brazil) approved all experimental protocols used in this study. **Results and Discussion:** TNBS administration induced macro and microscopic damage in colon tissue and body weight loss, leading in most cases to animal death. Curative treatment with SB225002 significantly reduced all the parameters analyzed, leading to an improvement of inflammatory signs. SB225002 reduced neutrophil influx, MPO activity, IL-1beta, MIP-2 and KC levels, the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF), inducible nitric-oxide synthase (iNOS) and cyclooxygenase-2 (COX-2) proteins into colon. Levels of IL-4, IL-10 and IL-13 were significantly increased in the colons of animals treated with SB225002. Besides, we have also demonstrated that KC increment in colonic tissue was more prominent than MIP-2. Once those chemokines do not bind mouse CXCR1 with a high affinity, we next analyzed the involvement of CXCR2 by treating animals with mouse anti-KC and observed that this treatment greatly reduced MPO activity and tissue damage, thus suggesting a minor role of CXCR1 in this subject. These results taken together demonstrate that selective blockade of CXCR2 or neutralization of KC consistently reduced TNBS-induced colitis, suggesting that the employment of SB225002 is a potential therapeutic approach for the treatment of IBD and other related inflammatory disorders. Apoio Financeiro: CAPES, CNPq and FAPESC

06.074

Participação do TNF-alfa na inflamação e dor articulares induzidas pela BaP1 E mecanismos envolvidos na produção e liberação dessa citocina em macrófagos (Mfs). Fernandes, C. M.¹; Rocha, F. A.²; Leite, A. C. R. M.²; Cunha, F. de Q.³; Gutiérrez, J. M.⁴; Teixeira, C. F. P.¹
¹Instituto Butantan - Farmacologia; ²FM-UFC - Clínica; ³FMRP-USP; ⁴Universidade da Costa Rica - Microbiologia

Introdução: Metaloproteinases de venenos (MVs) induzem inflamação local e são homólogas às de mamíferos (MMPs), encontradas em níveis elevados em pacientes com artrite reumatóide (AR). Porém, o papel das MMPs na inflamação articular não é conhecido. O TNF- α é um importante mediador inflamatório da AR, liberado por Mfs. Neste estudo avaliou-se a capacidade da MV BaP1, isolada do veneno de *B. asper*, induzir eventos inflamatórios articulares, analisando o influxo leucocitário, a incapacitação articular, a liberação de TNF- α e a participação dessa citocina nesses eventos. Ainda, investigou-se os efeitos da BaP1, em Mfs isolados, quanto à liberação e expressão gênica e protéica de TNF e a participação do complexo de Golgi (CG) e do NF- κ B nesses efeitos. **Métodos:** Ratos Wistar machos foram injetados via intra-articular com BaP1 ou BSA (controle)(5 μ g/articulação). Entre 30min e 12h, avaliou-se o influxo leucocitário pela contagem total e diferencial das células, a liberação de TNF por citotoxicidade (células L929) e a incapacitação articular pelo método da roda giratória, em animais pré-tratados ou não com anti-soro anti-TNF- α (50 μ L). Para estudos *in vitro*, Mfs RAW264-7 foram incubados com 12.5 μ g BaP1/mL ou RPMI, (5min a 24h) e avaliou-se a liberação de TNF, sua expressão gênica (RT-PCR em tempo real) e protéica (*W.blot*) e co-localização com o CG (microscopia confocal). A participação do CG, na liberação de TNF, foi avaliada por incubação dos Mfs com brefeldina A (BFA-10 μ g/mL) ou monensina (MON-2 μ M) e a participação do NF- κ B, na expressão protéica por incubação com TPCK (50 μ M) ou TLCK (500 μ M). **Resultados:** A BaP1 induziu acúmulo de leucócitos totais (1-12h), com predomínio de células PMN até 6h e MN após 12h, a liberação de TNF- α , a partir de 30min e pico na 6^ah e a incapacitação articular (1-6h). O pré-tratamento com anti-TNF reduziu a dor e o influxo leucocitário, induzidos pela BaP1. *In vitro*, a BaP1 induziu a liberação (5min-24h), a expressão gênica (5 min-3h) e protéica (15 min-12h) de TNF. A análise por microscopia confocal revelou *pools* citoplasmáticos de TNF, aumentados pela BaP1 e co-localizados com o CG. A incubação com BFA ou MON reduziu a liberação de TNF e a inibição do NF- κ B aboliu a expressão protéica, induzidas pela BaP1. **Discussão:** A BaP1 desencadeia eventos inflamatórios articulares e o TNF- α é um mediador relevante para esses eventos. O Mf é alvo da BaP1 para liberação de TNF e tanto o CG quanto o NF- κ B participam das ações desta MV. A BaP1 pode ser uma ferramenta útil para estudos de mecanismos inflamatórios, desencadeados pelas MMPs. Apoio Financeiro: FAPESP (03/08529-9; 06/50723-5)

06.075

Hydrogen sulfide augments neutrophil migration through enhancement of adhesion molecules expression and prevention of CXCR2 internalization: role of atp-sensitive potassium channels. Dal-Secco, D.¹; Cunha, T. M.¹; Freitas, A.¹; Alves-Filho, J. C.¹; Fukada, S. Y.¹; Souto, F. O.²; Grespan, R.³; Alencar, N. M. N. de⁴; Neto, A. F.⁵; Rossi, M. A.⁶; Ferreira, S. H.¹; Hothersall, J. S.²; Cunha, F. de Q.¹ ¹FMRP-USP - Farmacologia; ²FMRP-USP – Cirurgia e Anatomia; ³UEM - Farmácia e Farmacologia; ⁴UFC - Fisiologia e Farmacologia; ⁵FCFRP-USP - Ciências Farmacêuticas; ⁶FMRP-USP - Patologia;

Introduction: Hydrogen sulfide (H₂S) is a gaseous mediator synthesized by two enzymes: cystathionine-γ-lyase and cystathionine-β-synthetase. Recent studies have shown that H₂S might counteract inflammatory events. Thus, we have addressed the role of H₂S in modulating neutrophil migration in either innate (LPS-challenged naive mice) or adaptive (mBSA-challenged immunized mice) immune responses. **Methods and Results:** The treatment of mice with H₂S synthesis inhibitors, DL-Propargylglycine (PAG; 1.0 mmol/kg) or β-cyano-alanine (BCA; 0.4mmol/kg) reduced (50%; n=5, *P*<0.05, *t*-test) neutrophil migration induced by LPS (100ng/cavity) or mBSA (30 microg/cavity) into either the peritoneal cavity or femour/tibial joint of immunized mice. This effect was associated with leukocyte rolling, adhesion, P-selectin and ICAM-1 expression inhibition on venular endothelium. In contrast, the animals' treatment with the H₂S donors, sodium hydrosulfide (NaHS; 30microM/kg) or Lawesson's reagent (30 microM/kg) enhanced (60%; n=5, *P*<0.05, *t*-test) these parameters. Neither PAG (300 microM) nor NaHS (300microM) treatments changed LPS (1.0microg/mL)-induced CD18 expression on neutrophils. Furthermore, *in vitro* MIP-2 (30ng/mL)-induced neutrophil chemotaxis was decreased (40%; n=5, *P*<0.05, *t*-test) by PAG and enhanced (55%; n=5, *P*<0.05, *t*-test) by NaHS treatments. In according, MIP-2-induced CXCR2 internalization was enhanced by PAG (33%; n=5, *P*<0.05, *t*-test) and reduced (44%; n=5, *P*<0.05, *t*-test) by NaHS treatments. Moreover, NaHS prevented MIP-2-induced CXCR2 desensitization. The PAG and NaHS effects correlated with the enhancement (58%; n=5, *P*<0.05, *t*-test) and reduction (65%; n=5, *P*<0.05, *t*-test) of MIP-2-induced G protein coupled receptors kinase (GRK)-2 expression, respectively. The NaHS effects on neutrophil migration either *in vivo* or *in vitro* and on CXCR2 internalization and on GRK2 expression were prevented by glybenclamide (40 microM/kg-*in vivo* or 100 microM-*in vitro*), a K⁺_{ATP} channel blocker, whereas the diazoxide (300 microM/kg), a K⁺_{ATP} channel opener increased (62%; n=5, *P*<0.05, *t*-test) neutrophil migration *in vivo*. **Discussion:** These results demonstrate a role for the H₂S as a modulator of key inflammatory events occurring at the interface of leukocytes and the vascular endothelium during both innate and adaptive immune responses. Furthermore, the pro-inflammatory effects of H₂S appear to be mediated via activation of K⁺_{ATP} channels. Together, the results identify H₂S synthesis and K⁺_{ATP} channels as potential targets for novel anti-inflammatory therapies. Apoio Financeiro: CNPq, CAPES, FAPESP

06.076
PRÊMIO INOVAÇÃO

06.077

Efeito do corticóide flunisolida sobre a ativação de macrófagos derivados de medula *in vitro*. De Almeida, A. G.; Gallois, K. D.; Pires, A. L. de A.; Abreu, A.; Carvalho, V.; Cordeiro, R. S. B.; Martins, M. A.; Silva, P. M. R. e ¹FIOCRUZ - Fisiologia e Farmacodinâmica

Introdução: A silicose é uma doença de caráter ocupacional, caracterizada por um componente inflamatório na fase aguda seguido por intensa fibrose na fase crônica. Neste contexto, os macrófagos desempenham papel relevante uma vez que liberam uma ampla gama de mediadores incluindo citocinas como TNF- α , um fator que possui reconhecida atividade prófibrótica. Tomando por base que o corticóide flunisolida mostrou-se eficaz em inibir de forma curativa a resposta fibrótica no modelo experimental de silicose murina, neste trabalho objetivamos avaliar o potencial efeito da flunisolida sobre a ativação de macrófagos por sílica *in vitro*. **Métodos e resultados:** Macrófagos foram obtidos a partir de células da medula óssea (fêmur e tibia) de camundongos Swiss-Webster, que foram cultivadas durante 7 dias em meio contendo 30% de meio condicionado de células da linhagem L929 - fonte do fator estimulante de colônia de macrófagos (M-CSF). A caracterização fenotípica dos macrófagos diferenciados foi realizada através de citometria de fluxo mediante incubação das células com anticorpos marcados com FITC e PE e com capacidade de reconhecimento para F4/80 e CD11b, respectivamente. Os macrófagos foram estimulados com partículas de sílica (tamanho 5 - 10 μ m) (5 - 400 μ g/mL), por diferentes intervalos de tempo (6 - 48h). Quantificação de TNF- α foi realizada a partir do sobrenadante celular através de ELISA. Inicialmente verificamos que o perfil das células correspondeu ao esperado para macrófagos, com percentual de pureza em torno de 90 - 95% e viabilidade de 98%. A estimulação dos macrófagos com sílica determinou elevação nos níveis de TNF- α liberado, em comparação com as células controles, fenômeno que se mostrou ser dose- e tempo-dependente. A resposta máxima foi obtida com a concentração de 400 μ g/mL e 6 h após a estimulação. Valores de TNF- α aumentaram de 91,72 \pm 6,94 pg/mL (média \pm EPM) em células controle, para 229,0 \pm 6,14 pg/mL ($p < 0.0001$) nas estimuladas com sílica, 6 h após. A incubação dos macrófagos com a flunisolida (2,5 - 250 nM), realizada 1 h antes da estimulação com sílica, inibiu de forma significativa a liberação de TNF- α no meio. **Discussão:** Em conjunto nossos dados mostram que macrófagos derivados de medula óssea apresentaram-se sensíveis à ativação direta por partículas de sílica *in vitro* e que a flunisolida foi capaz de inibir esta resposta. Indicam, portanto, que os macrófagos podem constituir alvos terapêuticos importantes responsáveis pelo efeito inibitório da flunisolida sobre a resposta fibrótica associada ao quadro silicótico. Apoio Financeiro: Apoio: PAPES 4/FIOCRUZ, CNPq, FAPERJ (Brasil) e UNESCO (França).

06.078

Fração protéica do látex de *Calotropis procera* (PI/LCP) inibe resposta inflamatória celular: envolvimento de óxido nítrico. Gonçalves, I.B.¹; Bitencourt, F. S.¹; Carmo, J.R.F.¹; Oliveira, J. S.²; Barroso-jr, J.E.A.³; Bezerra, C. C. R.¹; Dal-Secco, D.⁴; Cunha, F. de Q.⁴; Ramos, M. V.⁸; Alencar, N. M. N. de⁵ ¹UFC - Fisiologia e Farmacologia; ²UFC - Bioquímica e Biologia Molecular; ³UNIFOR - Fisiologia e Farmacologia; ⁴FMRP-USP - Farmacologia; ⁵UFC - Bioquímica

Introdução: *Calotropis procera* é uma planta encontrada na África, Ásia e América do Sul, sendo de forma abundante no Nordeste do Brasil. Tem como uma das principais características a produção de uma secreção denominada látex. Objetivamos investigar o envolvimento de uma fração protéica isolada do látex de *Calotropis procera* (PI/LCP) sobre as etapas envolvidas na quimiotaxia de neutrófilos (rolamento e adesão) e na liberação de mediadores inflamatórios durante a migração de neutrófilos (MN) induzida por carragenina (Cg). **Métodos:** Peritonite foi induzida pela administração i.p. de Cg (500µg/cav) em camundongos Swiss (n=6/20-25g) 30 min após a injeção e.v. de salina (grupo Cg) ou PI/LCP (10 mg/kg). O tratamento com a PI/LCP foi feito em animais pré-tratados (15 min. antes da fração) ou não com inibidores da síntese de NO (L-Nitro-Arginina:L-Nitro e Aminoguanidina: Amino; 50 mg/kg; s.c.). Após 4 h da administração da Cg, os animais foram sacrificados e coletados: fluído peritoneal, para quantificação de neutrófilos, citocinas e quimiocinas (TNF-α; IL-1β e IL-10, KC e MIP-2) por ELISA e sangue, para NO (reação de Griess). Os resultados foram expressos como média ± E.P.M de células x10⁶/mL, pg/mL de citocinas ou quimiocinas e µM de NO₂⁻. O rolamento e adesão dos leucócitos ao endotélio vascular foram avaliados por microscopia intravital, 2h após a Cg em animais tratados ou não com PI/LCP. ANOVA (teste de Bonferroni; p<0,05). **Resultados:** PI/LCP reduziu a MN induzida pela Cg (PI/LCP:0,84 ± 0,1; Cg:10,45 ± 1,2), sendo este efeito inibido por Amino, inibidor específico de iNOS (3,73 ± 1,1), mas não por L- nitro, inibidor inespecífico. Além disso, PI/LCP aumentou os níveis de NO no sangue (PI/LCP: 100,61 ± 5,5; Cg: 13,17 ± 2,2) e reduziu TNF-α (Cg:633,0 ± 107,0; PI/LCP:228,3 ± 61,0) e IL-1β (Cg: 80,7 ± 14,4;PI/LCP:31,0 ± 6,0) no fluido peritoneal, sem alterar IL-10, KC e MIP-2. Em acréscimo, PI/LCP diminuiu o rolamento (PI/LCP: 3,17leucócitos/10 µm/min e Cg: 25,5) e adesão (PI/LCP: 0,68 células aderidas/100 µ² e Cg: 1,98) dos leucócitos ao endotélio vascular. **Discussão:** PI/LCP apresentou atividade antiinflamatória, diminuindo o rolamento e adesão de leucócitos; esta atividade pode ser explicada via produção de NO, uma vez que este também reduz esses eventos inflamatórios no endotélio, além da redução de citocinas pró-inflamatórias na cavidade inflamada (TNF-α e IL-1β). Apoio Financeiro: Capes, Funcap, CNPQ

06.079

NOD-2, an intracellular pattern recognition receptor, is potentially involved in the process of the inflammatory response in arthritis. Vieira, S. M.¹; Grespan, R.²; Lemos, H. P.²; Zamboni, D. S.²; Cunha, F. de Q.² ¹COPE-INPA / FMRP-USP; ²FMRP-USP

NOD-2 (nucleotide-binding oligomerization domain containing 2) is a protein, also known as the caspase recruitment domain family, member 15 (CARD15), which plays an important role in the immune system. It is an intracellular pattern recognition receptor that recognizes molecules containing the specific structure called muramyl dipeptide (MDP). The nucleotide-binding and oligomerization domain (NOD)-like receptors (NLRs) sense pathogens, products of damaged cells or endogenous metabolites and could potentially be involved in the initiation, amplification and progression of the inflammatory response in rheumatic diseases. Recent data suggest NOD-2/RIP-2's in the pathogenesis of autoinflammatory as well as inflammatory rheumatic diseases such as rheumatoid arthritis. In this work, adult C57BL/6 (WT), NOD-1^{-/-}, NOD-2^{-/-}, caspase-1^{-/-} and RIP-2^{-/-} mice weighing 18-23 g were used. Arthritis was induced in mice with 500 µg of methylated bovine serum albumin (mBSA) in an emulsion of phosphate-buffered saline (PBS; 0.1 mL) and complete Freud's adjuvant (CFA; 0.1 mL) through subcutaneous (s.c.) injection. Twenty-one days after the initial injection, arthritis was induced in the immunized animals by intra-articular (i.a.) injection of mBSA (10µg) dissolved in PBS (10µL). Migration assays and histological analysis were used to evaluate neutrophil recruitment to knee joints and cartilage loss. Proteoglycan content of cartilage was measured by dimethylmethylene blue assay of papain digests. T cells and antigen-presenting cells (APCs) from lymph nodes of arthritic mice were cultured in the presence of MDP (NOD-2 agonist; 100µg/mL) or mBSA (10µg/mL). IL-17, IL-23, TNFα, IL-1β, LIX, and IL-2 levels were assessed by ELISA. Mononuclear cells from rheumatoid arthritis (RA) patients were also taken for RT-PCR or stimulated with MDP (100 µg/mL) for ELISA assays. mBSA-induced arthritis, neutrophil migration and cartilage loss were completely abrogated in NOD-2^{-/-} and caspase-1^{-/-} and markedly reduced in RIP-2^{-/-} mice in comparison with C57BL/6 or NOD-1^{-/-} mice. mBSA-induced i.a. production of IL-17, IL-1β and LIX was significantly reduced in NOD-2^{-/-}, caspase-1^{-/-} and RIP-2^{-/-} mice. T cells and APCs from the lymph nodes of immunized WT, NOD-2^{-/-}, caspase-1^{-/-} or RIP-2^{-/-} mice were stimulated with MDP or mBSA. MDP and mBSA induced IL-17, IL-23 and IL-1β production by WT lymph node cells but production of these cytokines was significantly reduced in NOD-2^{-/-}, caspase-1^{-/-} or RIP-2^{-/-} cell cultures. Mononuclear cells purified from the peripheral blood of healthy donors or RA patients were stimulated with MDP *in vitro*. MDP induced IL-17 and IL-1β synthesis by mononuclear cells of RA patients, but not by mononuclear cells of healthy control donors. RT-PCR analysis shows that NOD-2 mRNA expression from mononuclear cells of RA patients is elevated in comparison with healthy donors. These data suggest that NOD-2 through caspase-1 and RIP-2 pathway might have an important role in the inflammatory modulation of RA and that this receptor could be a new therapeutic target. Apoio Financeiro: FAPESP, FAPESP & FAPESP

06.080

Tityus serrulatus venom (Tsv)-induced fever is independent of prostaglandin E₂ (PGE₂). Malvar, D. do C.¹; Pessini, A. C.²; Soares, D. de M.¹; Machado, R. R.²; Figueiredo, M. J.¹; Kanashiro, A.²; Souza, G. E. P.²¹FMRP-USP - Farmacologia; ²FCFRP-USP - Física e Química

Introduction: It has been shown that Tsv, injected intraperitoneally in rats, causes an integrated febrile response dependent on kinins, IL-1 and NO, as well as the activation of the vagus nerve. Moreover, this response was abolished by dipyrone but was not altered by ibuprofen or celecoxib given the notion that prostaglandins are not involved in this response. Thus, the aim of this study was to evaluate the involvement of PGE₂ on Tsv-induced fever. For that, the relationship between Tsv-induced fever and the levels of PGE₂ in the CSF and hypothalamus as well as the effect of indomethacin and dipyrone in this interaction were investigated. **Methods:** Male Wistar rats (200 g) received vehicle, dipyrone (120 mg kg⁻¹) or indomethacin (2mg kg⁻¹) i.p. 30 min before the i.p. injection (0.5 ml) of Tsv (150 mg kg⁻¹) or saline (control group) and the body temperature (°C) was measured every 30 minutes for up 1h by telemetry. Immediately after the last measure, the animals were anesthetized with xilazina and ketamine and both CSF and hypothalamus was collected from each animal. PGE₂ was measured using ELISA kits. Dipyrone but not indomethacin, inhibited (1h: from 1.3 ± 0.2 °C to 0.1 ± 0.07 °C) Tsv-induced fever. The CSF PGE₂ concentration remained undetectable in all groups. However, the basal hypothalamic PGE₂ content of control group (390.4 ± 41.58 pg/g of tissue) which was not altered after Tsv injection was reduced by pre-treating the animals with indomethacin (97.7%) and dipyrone (88.4%). **Discussion.** These results indicate that PGE₂ is not involved in the Tsv-induced fever and that constitutive cyclooxygenase might be responsible for the basal PGE₂ concentration in the hypothalamus. These results also suggest that the antipyretic effect of dipyrone on Tsv- induce fever relies on the blockage of synthesis/effects of mediators others than prostaglandins. 1Pessini AC, Santos DR, Arantes EC, Souza GE. *Toxicon*. 48(5):556-66, 2006. Apoio Financeiro: CAPES, CNPq, FAPESP.

06.081

Effect of celecoxib on fever/survival induced by cecal ligation and puncture (CLP) in rats. Figueiredo, M. J.¹; Yamashiro, L. H.²; Soares, D. de M.¹; Martins, J. M.¹; Machado, R. R.²; Pessini, A. C.²; Malvar, D. do C.³; Torres, D.¹; Cunha, F. de Q.⁷; Souza, G. E. P.⁴¹FMRP-USP - Farmacologia; ²FCFRP - Físico-Química; ³UFRRJ - Ciências Fisiológicas

Introduction: Sepsis is the systemic response to severe infection in which the fever is the most frequent manifestation. In this study we investigated the effect of celecoxib in body temperature and survival after CLP-sepsis induction. The levels of PGE₂ in the CSF of these animals were also investigated. **Methods:** The animals were anesthetized with tribromoethanol and submitted to cecal ligation and puncture (CLP, four punctures, 16-gauge needle) or sham surgery. Body temperature (bT) was measured by biotelemetry in male Wistar rats (200-250 g b.w.), every 30 min, during 48 h, after surgical procedure (sham or CLP). The survival was monitored by 7 days. CSF was collected from each animal according to the method described by Consiglio and Lucion¹. PGE₂ was measured using ELISA kits. **Results:** Rats received celecoxib (1; 2.5 and 5 mg/kg per os) 1h after CLP. Celecoxib 5 mg/kg did not alter bT of control animals. Celecoxib 5 mg/kg attenuated (6th h: from 38.6 ± 0.23 to 37.8 ± 0.09 °C; *p* < 0.05) while 1 and 2.5 mg/kg did not modify the fever induced by CLP. In spite of that, 2.5 and 5 mg/kg reduced the PGE₂ level 6 h after CLP (from 908.5 ± 167.3 pg/ml to 116.7 ± 62.73pg/ml and 88.33 ± 57.04pg/ml, respectively). In addition, celecoxib at dose of 2.5 mg/kg increased the survival of septic animals (from 37.5 to 62.5%). **Conclusion.** CLP induces fever and increases the CSF PGE₂ level. At both doses used celecoxib reduced the PGE₂ CSF level although only at the highest dose it reduced the fever showing that besides inhibit PGE₂ synthesis it acts in different pathways of fever development. The increase of survival when PGE₂ was reduced indicates that this eicosanoid does not play a role on survival after CLP. ¹ Consiglio & Lucion, *Brain Res Protoc*, v.5, p.109-114, 2000

06.082
PRÊMIO INOVAÇÃO

06.083

Effect of the annexin-1 derived peptide AC 2-26 on the acute phase of silicosis in mice. Trentin, P. G.¹; Santos, T. P. O.¹; Ferreira, T. P. T.¹; Pires, A. L. de A.¹; Flower, R. J.²; Martins, M. A.¹; Silva, P. M. R. e¹ ¹FIOCRUZ - Fisiologia e Farmacodinâmica; ²The William Harvey Institute - Biochemical Pharmacology

Introduction: Silicosis is a chronic occupational disease caused by inhalation of free crystalline silica particles and is characterized by an intense inflammatory response followed fibrosis and granuloma formation. **Objective:** Considering that there is no specific treatment for this disease yet, in this study we investigated the effect of Ac2-26, an N-terminal derived peptide of antiinflammatory protein annexin-1, on the acute phase of silicosis. The classical steroid dexametasone was used as control. **Methods:** Anesthetized Swiss-Webster mice received intranasal (i.n.) instillation of silica (10 mg/50 µL) or vehicle (saline). Treatment consisted of intranasal administration of the Ac2-26 peptide (200 µg) or dexamethasone (DEXA) (25 µg) during 7 consecutive days, starting 6 h after silica instillation and the analyses were made 24 h later. Lung function (resistance and elastance) and hyperreactivity to aerosolized metacholine (3 -27 mg/ml) were measured by whole body invasive plethimography. Morphological alterations were analyzed by histological techniques including staining with Hematoxylin-Eosin and Picrus-Sirius for granuloma quantification and collagen deposition, respectively. Cytokines and chemokines were quantified by ELISA. **Results:** We found that silicotic mice exhibited an inflammatory response with leukocyte infiltration, collagen deposition and granuloma formation. Higher levels of chemokines (KC and MCP-1) and cytokines (TGFβ) were detected in silicotic lung tissue as compared to controls. Silicotic mice also exhibited an increase in the basal levels of lung resistance and hyperreactivity in response to bronchoconstriction induced by methacholine. Local treatment with the peptide Ac 2-26 almost abolished leukocyte infiltration and granuloma formation in silicotic mice, under conditions where DEXA only partially affect both phenomena. Generation of cytokines and chemokines were significantly inhibited by the peptide Ac 2-26 but not altered by DEXA. Increased lung resistance and hyperreactivity to methacholine were suppressed by both peptide Ac 2-26 and DEXA. **Discussion:** Altogether our results show that leukocyte infiltration and granuloma formation noted in the acute phase of silicosis were markedly inhibited by the peptide Ac 2-26 and only partially affected by the steroid DEXA, suggesting that the peptide may constitute a promising anti-inflammatory compound for the treatment of chronic pulmonary diseases such as silicosis. Apoio Financeiro: Financial support: FIOCRUZ, CNPq, FAPERJ, UNESCO.

06.084

Role of annexin-A1 in the regulation of lung fibrosis induced by bleomycin. Damazo, A. S.¹; Oliani, S. M.¹; Perretti, M.³ ¹IBILCE-UNESP - Biologia; ³The William Harvey Research Institute - Biochemical Pharmacology

Introduction: Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is a progressive form of lung disease. This process is known to involve activation of many cells, like fibroblast and leukocytes, resulting in cytokine release and collagen deposition¹. Several studies have shed light on biochemical pathways centered on endogenous inhibitors. Our focus has been the protein annexin-A1 (AnxA1), an inhibitor of leukocyte trafficking. The aim of this study was to explore the effects of the AnxA1 absence, using the transgenic mice, AnxA1 null, in the regulation of the mechanisms involved in the pulmonary fibrosis. **Methods:** Pulmonary fibrosis was induced by i.t. administration of bleomycin (Bleo) at 0.15 U/kg in both wild-type (WT) and AnxA1 null mice. Control mice received PBS only. At 0, 7 or 21 days, lung fragments were collected, fixed in 4% paraformaldehyde, dehydrated in ethanol and embedded in paraplast. Sections were cut and stained with Masson's Trichrome for connective tissue analysis. AnxA1 expression was analyzed by immunogold labeling and *AnxA1* gene promoter activity was analysed by LacZ gene expression. **Results:** The immunohistochemistry showed intracellular localization for AnxA1/gold particles under basal conditions in the lungs of WT mice. However, at day 21 post-bleomycin injection the immunostain for AnxA1 protein was drastically reduced in all cell types. In the AnxA1 null mice, the *AnxA1* promoter gene activity was positive in the bronchiole epithelium and neutrophils. In contrast to the WT mice, after 21 days, significantly higher LacZ expression was measured in those cells, indicating a markedly up-regulation in *AnxA1* gene promoter response. Also, our data revealed that bleomycin administration induced a high rate of mortality in the AnxA1 null mice. The sham groups of both WT and AnxA1 null mice showed no abnormal deposition of collagen around the bronchiole, vessels or the alveoli. Furthermore, at day 21 post-bleomycin, WT mice developed severe fibrosis and displayed greater destruction of alveolar architecture, at perivascular and peribronchiolar sites. However, the trichrome stain revealed a more severe fibrosis increasement not only in the perivascular and peribronchial sites but also in the interstitial spaces of bleomycin-treated AnxA1 null mice. **Discussion:** The phenotype we describe here shows several relevant features in the role of AnxA1 in the lung fibrosis. The AnxA1 absence in the bleomycin-induced lung fibrosis model suggests that it may play important roles in this pathological condition. These findings warrant further studies in the AnxA1 biology as important therapeutic tool for treating fibrotic disease. 1. Fichtner-Feigl et al., *Nat Med*, 12, 99, 2006. Apoio Financeiro: FAPESP e CNPq

06.085

O papel do receptor CCR4 na resistência dos camundongos durante a sepse grave. Molinaro, R.C.¹; Pecli, C.¹; Alves-Filho, J. C.²; Cunha, F. de Q.²; Kunkel, S.³; Bozza, M.⁴; Benjamim, C. F.¹
¹UFRJ - Farmacologia Básica e Clínica; ²FMRP-USP - Farmacologia; ³Michigan University - Pathology; ⁴UFRJ – Imunologia

Introdução e Objetivo: As quimiocinas e seus receptores estão descritos como moléculas que participam na imunidade inata e adaptativa. O receptor CCR4 está presente em células do sistema imune, inclusive as células T regulatórias (Tregs). Estas células são capazes de modular negativamente a resposta imune inibindo células inflamatórias e proporcionar uma resposta eficaz do organismo frente às infecções. Dados na literatura demonstram que animais CCR4 deficientes (CCR4 *-/-*) são mais resistentes ao choque endotóxico. Nosso objetivo foi avaliar se animais CCR4 *-/-* submetidos à sepse grave por ligação e perfuração do ceco (CLP) são mais resistentes a uma infecção secundária após a sepse, e qual o papel do receptor sobre as células Tregs na evolução da sepse à imunossupressão. **Métodos e Resultados:** Camundongos CCR4 *-/-* e o controle selvagem (B6) foram submetidos ao modelo de CLP grave ou falso-operado (sham) e tratados com antibiótico até o 3º dia após a cirurgia. Após 4 dias do CLP, os animais foram desafiados com conídios de *A. fumigatus*. Camundongos CCR4 $-/-$ sépticos desafiados com *A. fumigatus* apresentaram uma maior taxa de sobrevivência (78%) quando comparados aos camundongos B6 (33%). O sobrenadante de células Tregs dos camundongos sépticos CCR4 $-/-$ não inibiu a produção de ROS e fagocitose de neutrófilos quando comparado ao sobrenadante de células Tregs de B6. Ainda, as Tregs provenientes de animais sépticos CCR4 *-/-* não inibiram a migração de neutrófilos tanto em ensaio “*in vitro*” como para o lavado broncoalveolar, quando comparadas às células Tregs do B6 sépticos frente a um estímulo infeccioso. Em relação a resposta inata, os animais CCR4 $-/-$ apresentaram significativa migração de neutrófilos para o peritônio, menor infiltrado neutrofilico para o pulmão, redução da contagem da bactéria no peritônio e sangue, e redução dos níveis de citocinas inflamatórias no sangue quando comparados ao camundongo B6. **Conclusão:** Estes resultados sugerem que as células Tregs dos animais CCR4 $-/-$ não apresentam resposta supressora significativa e possuem uma resposta inata mais eficaz ou mais rápida comparada as células obtidas dos animais B6. Os dados sugerem que o receptor CCR4 participa da sepse modulando a resposta imune inata e tardia em um quadro de sepse grave. Apoio Financeiro: Suporte Financeiro: CNPq / PIBIC, FAPERJ.

06.086

Nicotine ameliorates dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis and inhibits colitis-associated referred hypersensitivity in mice. Costa, R.; Motta, E. M.; Cola M; Calixto, J. B. UFSC – Farmacologia

Introduction: Acetylcholine (ACh) from the vagus nerve controls immune cell functions via the alpha-7 nicotinic acetylcholine receptor (nAChR). This 'cholinergic anti-inflammatory pathway' may have clinical implications as treatment with nicotinic agonists can modulate inflammatory signaling and the production of pro-inflammatory cytokines (Ulloa, *Nat Rev Drug Discov.*, **4**:673, 2005). The purpose of this study was to evaluate the curative effects of nicotine, a non-selective nAChR agonist, on the inflammatory responses induced by dextran sulfate sodium (DSS) in the mouse colon. **Methods:** Male adult Swiss mice (40 g, n = 6-8) were fed 4% DSS in their drinking water for up to 7 days. Nicotine (0.3 or 1.0 mg/kg, p.o., every 12 h) was administered starting from the day 3 after DSS (curative treatment). The severity of inflammation in the colon was assessed by daily clinical signs (weight loss, stool consistency and rectal bleeding), and by macroscopic damage scoring on the day 7. The abdominal and plantar referred mechanical hypersensitivity was evaluated every day by application of von Frey hairs (VFH; up and down method) to the mouse abdomen and right hind paw, respectively. **Results:** Swiss mice exposed to 7 days of 4% DSS developed severe acute colitis as previously described (Okayasu, *Gastroenterol.*, **98**:694, 1990). The acute colitis was accompanied by weight loss [p<0.01], gross rectal bleeding [p<0.01] and diarrhea [p<0.05] within 7 days. Moreover, 4% DSS-induced acute colitis was also associated with increased abdominal and plantar responsiveness to VFH (referred hypersensitivity) [p<0.01]. Clinical signs (gross rectal bleeding and diarrhea) and colonic macroscopic damage were significantly improved in animals given nicotine (0.3 or 1.0 mg/kg, p.o., every 12 h [p<0,05]). Also, nicotine in the lower dose (0.3 mg/kg, p.o., every 12 h) significantly decreased abdominal and plantar hypersensitivity to VFH [p<0.05]. **Discussion:** These findings provide evidences that nicotine reduces the severity of experimental acute colitis in mice and that there is an essential role for nAChR on the abdominal and plantar referred hypersensitivity accompanying the model (an indirect measure of visceral pain). Therefore, we might speculate that selective nAChR agonists can become potential drugs to treat active colitis and associated visceral pain and/or referred hyperalgesia. However, additional experimental studies are necessary to better clarify the mechanisms involved in this process, especially the participation of pro-inflammatory cytokines (such as TNF- α and IL-1 β) and the alpha-7 nAChR involvement. Apoio Financeiro: CAPES/CNPq/ FAPESC/FINEP/PRONEX

06.087

Modulação dos receptores B₁ para as cininas por fatores de virulência de *Porphyromonas gingivalis* em ratos. Dornelles, F. N.¹; Santos, D. S.²; Calixto, J. B.³; Batista Jr. E. L.⁴; Campos, M. M.⁴ ¹PUCRS - Biociências; ²PUCRS - Farmácia; ³UFSC - Farmacologia; ⁴PUCRS - Odontologia

Introdução: Tem sido demonstrado que os receptores B₁ para as cininas podem ser rapidamente induzidos em resposta à infecção bacteriana (Calixto *et al.*, Br. J. Pharmacol. 143, 803, 2004). Entretanto, pouco se sabe acerca dos efeitos da *Porphyromonas gingivalis*, um dos principais agentes etiológicos da doença periodontal, na modulação das respostas mediadas pelos receptores B₁. **Objetivos:** O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos do tratamento local com LPS de *Porphyromonas gingivalis* (Pg-LPS) ou com *Porphyromonas gingivalis* inativada por calor (HKPg) sobre a indução dos receptores B₁ em ratos. **Métodos:** Pg-LPS (3µg/pata) e HKPg (10⁸ células/pata) foram injetados localmente na pata de ratos (n=6/grupo). Após diferentes intervalos de tempo (1-72 h e 1-144 h, respectivamente), o edema foi induzido através da injeção intraplantar do agonista seletivo dos receptores B₁, des-Arg⁹-BK (100nmol/pata) e medido em pletismômetro (10-120 min). A expressão do RNAm para o receptor B₁ após a injeção local de Pg-LPS foi determinada pela técnica do PCR em tempo real (Real-time PCR). **Resultados:** A injeção de des-Arg⁹-BK (100 nmol/pata) induziu apenas um discreto edema em animais controle. Contudo, a injeção deste agonista causou uma resposta edematogênica marcante em animais pré-tratados com Pg-LPS ou HKPg. O aumento do edema de pata evocado pela des-Arg⁹-BK foi tempo-dependente, sendo máximo em 24 h (62 ± 11 %) e 72 h (118 ± 8 %) após o tratamento com Pg-LPS e HKPg, respectivamente. Ademais, o tratamento com Pg-LPS produziu um aumento significativo e tempo-dependente da expressão do RNAm para o receptor B₁ na pata de rato, que foi máximo em 3 h (17 vezes). O aumento do edema mediado pelos receptores B₁ em animais pré-tratados com Pg-LPS foi significativamente reduzido pelo glicocorticóide dexametasona (0.5 mg/kg, s.c., 2h antes da injeção de Pg-LPS), pelo anticorpo monoclonal quimérico anti-TNFα Infliximab (1 mg/kg, s.c., 15 min antes da injeção de Pg-LPS) ou pelo mediador lipídico pró-resolução da inflamação Resolvina E1 (300ng/animal, i.p., 30 min antes da injeção de Pg-LPS). As porcentagens de inibição foram: 47 ± 7 %, 33 ± 7% e 59 ± 5 %, respectivamente. **Conclusão:** Os resultados obtidos demonstram claramente que os receptores B₁ podem ser modulados *in vivo* por fatores de virulência de *P. gingivalis*. Assim, a regulação dos receptores B₁ para as cininas pode representar um mecanismo relevante nas alterações patológicas causadas por *Porphyromonas gingivalis*. Apoio Financeiro: CNPq (473012/2006-5)

06.088

Avaliação do potencial antiinflamatório e antinociceptivo da lectina isolada de sementes de *Canavalia grandiflora*. Nunes, B.S.¹; Rensonneth, N. S.¹; Dal-Secco, D²; Vieira, S. M.³; Cavada, B. S.⁴; Teixeira, E. H.⁵; Moura, T. R.⁶; Teixeira C. S.⁴; Clemente-Napimoga, J. T.¹; Napimoga, M. H.¹ ¹UNIUBE - Biologia Molecular; ²FMRP-USP - Farmacologia; ³INPA-COPE; ⁴UFC - Bioquímica e Biologia Molecular; ⁵UFC - Medicina Sobral; ⁶UECE – Biologia

Introdução: Os neutrófilos são leucócitos cruciais na resposta do hospedeiro contra microrganismos infecciosos e respostas inflamatórias, no entanto, existem situações em que a sua presença no foco inflamatório é deletéria para o organismo, uma vez que estas células são importantes fontes de substâncias que promovem lesões teciduais. Neste estudo nós avaliamos o potencial da lectina de sementes de *Canavalia grandiflora* (CGL) no controle da migração e hipernocicepção inflamatória. **MÉTODOS/Resultados:** Pré-tratamento intravenoso (15 minutos antes) com a CGL inibiu a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de maneira dose dependente, confirmado pelos resultados de inibição do rolamento e adesão de leucócitos avaliados por microscopia intravital. Em um diferente grupo de animais pré-tratados com CGL, foi observado que esta lectina tem a capacidade de inibir a hipernocicepção na segunda fase da formalina injetada na pata. Além disso, a CGL diminui a hipernocicepção induzida por uma administração intraplantar de carragenina, avaliada em analgesímetro digital. Este efeito antinociceptivo está correlacionado com o efetivo bloqueio do influxo de neutrófilos, quantificados pela mieloperoxidase no tecido plantar. Foi também avaliado se a dose eficiente de CGL possui efeito tóxico, para tal, administramos a dose efetiva por 7 dias consecutivos. Não foram observadas nenhuma alteração nos parâmetros hematológicos ou bioquímicos (AST, ALT e uréia) testados. **Discussão:** Pelo fato das lectinas possuírem a propriedade de reconhecer específica e reversivelmente resíduos de carboidratos diferenças de configuração dos carboidratos, e a capacidade de bloquear sítios específicos, estas podem ser potenciais drogas terapêuticas para uso antiinflamatório, diminuindo a migração leucocitária em doenças inflamatórias agudas ou crônicas por competir por sítios importantes no processo de diapedese como selectinas. A lectina de sementes de *C. grandiflora*, específica por glicose/manose, demonstrou uma eficaz inibição da hipernocicepção inflamatória e da migração de neutrófilos. Apoio Financeiro: PAPE-UNIUBE; CAPES

06.089

Estrogen and testosterone attenuate formalin-induced temporomandibular joint inflammation.

Torres-Chavez, K. E.¹; Sanfins J¹; Fischer, L.¹; Clemente-Napimoga, J. T.²; Pelegrini-Da-Silva, A.¹; Tambeli, C. H.¹¹FOP-UNICAMP Fisiologia; ²UNIUBE Biologia Molecular

The aim of this study was to evaluate the effect of estrogen, progesterone and testosterone on formalin-induced temporomandibular joint inflammation. We measured formalin-induced TMJ plasma extravasation, a major sign of acute inflammation, and neutrophil migration, an important event related to tissue injury, in ovariectomized (OVX) Wistar rats receiving vehicle, estrogen or progesterone and in orchidectomized (ORX) Wistar rats receiving vehicle, estrogen or testosterone. The intensity of plasma extravasation was determined by measuring the concentration of Evan's blue dye extravasated in the TMJ tissue and the intensity of leukocyte migration was determined by measuring Myeloperoxidase activity in the TMJ tissue. Data were analyzed by ANOVA and Tukey post hoc test ($p \leq 0.05$) and the results are expressed as mean \pm EPM. In vehicle-treated OVX females, formalin-induced TMJ plasma extravasation and neutrophil migration (52.69 ± 3.29 ; 2.74 ± 0.47 , respectively) was significantly reduced by estradiol (25.36 ± 2.25 ; 1.46 ± 0.22 , respectively) but not by progesterone (45.00 ± 5.44 ; 1.77 ± 0.15 , respectively) administration. In vehicle-treated ORX males, formalin-induced TMJ plasma extravasation and neutrophil migration (74.52 ± 1.56 ; 3.62 ± 0.64 , respectively) was significantly reduced by estradiol (56.34 ± 3.56 ; 2.09 ± 0.23 , respectively) and testosterone (46.62 ± 2.64 ; 1.91 ± 0.23 , respectively). These findings suggest that estradiol and testosterone reduce TMJ inflammation. Based on that we suggest that the attenuation of TMJ inflammation may be one of the mechanism underlying the attenuation of TMJ nociception induced by these hormones. Apoio Financeiro: Supported by CAPES and FAPESP.

06.090

NO modulates the expression of adhesion molecules on bone marrow eosinophils of allergic mice. Pelaquini, E. H.¹; Pallis, F. R.¹; Leal, A. B.¹; Fernandes, L. G. R.²; Tamashiro, W. M. S. C.²; Ferreira, H. H. A.¹ ¹USF - Inflamação; ²UNICAMP - Imunologia e Microbiologia

Introduction: The mechanism by which nitric oxide (NO) promotes allergic eosinophil (EO) influx is incompletely understood. NO may regulate cytokine production, chemotactic activity and adhesion molecules. $\alpha_4\beta_1$ (CD49d/CD29) and $\alpha_M\beta_2$ (CD11b/CD18) integrins are thought to be the most important adhesion molecules involved in EO accumulation in several allergic disorders. Vascular adhesion molecule 1 (VCAM-1) and Intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) expressed on endothelial cells are the receptors for $\alpha_4\beta_1$ and $\alpha_M\beta_2$, respectively. Previous studies of our lab revealed that the NO produced during the allergic inflammatory responses is also involved in the up-regulation of EO migration to mouse airways. **Objective:** Here, we investigated the influence of NO on the adherence and expression of adhesion molecules of EOs isolated from bone marrow (BM) and bronchoalveolar lavage (BAL) of allergic mice. **Material and Methods:** On days 0 and 7, BALB/c mice were immunized (s.c.) with 100 mg ovalbumin (OVA) and 4mg aluminium hydroxide. On day 14, mice were challenged with 10 mg of OVA, twice a day, by intranasal route. Two hours before and 4 and 12 hours after the antigenic challenge, mice were i.p. injected with the iNOS selective inhibitor 1400W (1 mg/kg). The control group received only saline via i.p. BAL and BM cells were collected 48 hours after the antigenic challenge. For *in vitro* adhesion assays, 96-well plates were coated with VCAM-1 or ICAM-1 and the number of attached EOs were estimated by the EPO method. For determining the expressions of adhesion molecules on EOs (CCR3+ cells), leukocytes isolated from BAL and BM were stained with FITC-conjugated anti-CCR3, PE-conjugated anti-CD49, APC-conjugated anti-CD11b and PeCy7-conjugated anti-CD11a. Flow cytometric analysis was performed with a FACS-Aria (Becton Dickson). **Results:** The acute treatment of allergic mice with 1400W resulted in a reduction of the *in vitro* adhesion of EOs to VCAM-1 (41% reduction) and in the elevation of their adhesion to ICAM-1 (30% elevation). In the BM of drug-treated animals, the frequency of CD49+EOs dropped 25% in relation to the control group, although the expression of adhesion molecules increased significantly (CD11a: 1.96x; CD49: 1.46x and CD11b: 2.15x). Discrete alterations in both the frequency of CCR3+ cells and in the expressions of adhesion molecules could be observed in cells from BAL. **Conclusions:** Taken together, these results indicate that the modulation by NO of adhesion molecules on EOs from bone marrow may be involved in the increased cell migration to the lungs of allergic mice, and that iNOS participates in this process. Apoio Financeiro: FAPESP

06.091

High-fat diet enriched with fish or soybean oil did not exacerbate experimental ulcerative colitis, in rats. Barros, K. V.¹; Xavier, R. A. N.¹; Cardinali, I. A.²; Abreu, G. G.¹; Martinez, C. A. R.³; Silveira V. L. F.⁴ ¹UNIFESP - Fisiologia; ²USF - Histologia; ³USF - Cirurgia; ⁴UNIFESP – Ciências Biológicas

Introduction: High-fat diets have been associated with an increased risk of ulcerative colitis (UC) development. However, fish oil-rich diet, but not soybean oil-rich diet, has a protective role on UC. The aim of this paper was to evaluate the effect of high-fat diet (20%) enriched with fish or soybean oil on colonic inflammation in experimental UC. **Methods:** Male Wistar rats (28-30 days) were fed for 47 days with control chow (C group) or AIN-93 diet with 10% of fish oil plus 10% of soybean oil (FS group), 20% of fish oil (F group) or 20% of soybean oil (S group). UC was induced in all animals since day 35 up to day 41 by administration of 3% Dextran sulfate sodium in drinking water. On day 47 the rats, food deprived for 24h, were anesthetized, a blood sample was collected by decapitation to corticosterone determination, and distal colon excised to quantify IL-4, IL-10 and INF- γ tissue concentration and histological analysis. The disease activity index (DAI) is a combined score of weight loss, stool consistency and bleeding that was recorded daily for each rat since day 35 up to day 47. Statistical analysis was performed by ANOVA followed by Bonferroni test with $p < 0.05$. **Results:** The DAI and the colonic inflammatory process were not different between the groups. No difference was also seen in tissue IL-4 and INF- γ but IL-10 was significantly increased by F diet in relation to C and S diets. The FS diet increased plasma corticosterone in relation to S diet. **Conclusions:** The high fat diets (20%) enriched with fish, soybean or both oils did not exacerbate the UC that could be associated with the elevated corticosterone level induced by FS diet or increased IL-10 level induced by F diet. Corticosterone has an anti-inflammatory effect and IL-10 has a role in maintaining gastrointestinal mucosal homeostasis. Apoio Financeiro: FAPESP, CAPES and CNPq

06.092

Soybean oil-rich diet does not result in more colonic inflammation as compared with fish oil-rich diet in experimental Ulcerative Colitis (UC). Barros K. V.¹; Xavier, R. A. N.¹; Cardinalli, I. A.²; Abreu, G. G.¹; Martinez, C. A. R.³; Silveira V. L. F.⁴ ¹UNIFESP - Fisiologia; ²USF - Histologia; ³USF - Cirurgia; ⁴UNIFESP – Ciências Biológicas

Introduction: It has been suggested a protective role of the dietary intake of fish oil and a deleterious effect of soybean oil-rich diet in the UC. The aim of this paper was to determinate if these diets with 5-8% of fat, could alter intestinal damage, corticosterone and cytokines levels in experimental UC. **Methods:** Male Wistar rats (28-30 days) were fed for 47 days with control chow (C group) or AIN-93 diet with fish plus soybean oil (FS group), fish oil (F group) or soybean oil (S group) as fat source. It was used 8% of fat during the growing phase and 5% afterwards. UC was induced in all animals since day 35 up to day 41 by 3% Dextran sulfate sodium in drinking water. On day 47 the rats, food deprived for 24h, were anesthetized, blood sample was collected by decapitation to corticosterone determination, and distal colon excised to histological analysis and determination of the anti-inflammatory cytokines, IL-4 and IL-10 and the pro-inflammatory cytokine, INF-g. The disease activity index (DAI) was recorded daily since day 35 up to day 47. Statistical analysis was performed by ANOVA and Bonferroni test with $p < 0.05$. **Results:** The DAI and the colonic inflammatory process were significantly decrease only in FS group, in which it was observed increased levels of IL-4 and a tendency towards increase in IL-10 ($p < 0.10$), in relation to C group. The INF- γ was higher in F and FS groups when compared to C group. There was no difference in corticosterone levels between the groups. **Conclusions:** The F diet did not improve and the S diet did not exacerbate the UC. Only the FS diet improved the intestinal damage that could be associated with the elevated IL-4 and IL-10 levels. The elevated anti-inflammatory cytokines could be balance the increased levels of pro-inflammatory INF-g, showing that the fat source balance should be the better for intestinal damage. Apoio Financeiro: FAPESP, CAPES and CNPq

06.093

Effect of fish or soybean oil-rich diets on pulmonary inflammation in experimental asthma. Xavier, R. A. N.¹; Barros, K. V.¹; Pedreira de Castro, M. A.¹; Abreu, G. G.¹; Silveira, V. L. F.²
¹UNIFESP- Fisiologia; ²UNIFESP- Ciências Biológicas

Introduction: Studies have demonstrated deleterious effects of soybean oil-rich diet on inflammatory processes. The present study aimed to determinate the effect of soybean or fish oil-rich diets on pulmonary inflammation and inflammatory cells migration to lung in experimental asthma. **Methods:** Male Wistar rats (28-30 days) were fed for 7 weeks with chow diet (Control), chow diet enriched with 15% of fish (Fish) or soybean oil (Soy). At the 5th week of feeding, rats were sensitized on days 0 and 7 by i.p. injection of ovalbumin-alumen in saline. At 14th and 21st days after the first immunization the animals were challenged by exposure to an aerosol of ovalbumin 2.5% for 20 min. The animals were killed 24 hours after the exposure to the second aerosol challenge when the bronchoalveolar lavage (BAL) and lungs were collected. It was quantified the total cell count, the percentage of eosinophil, neutrophil and monocyte, and the intensity of inflammation by histological analyzes and score of inflammation. Statistical analysis was performed by Kruskal-Wallis ANOVA and Dunn test with $p < 0.05$. **Results:** Both diets efficiently diminished the percentage of eosinophils and neutrophils in BAL, but only fish oil rich-diet decreased total cell count and increased monocyte percentage in BAL. The intensity of pulmonary inflammation was much diminished in Fish group while in Soy group the score of inflammation stayed between Fish and Control groups. **Conclusions:** Diet enriched with soybean oil does not increase the inflammatory process in experimental asthma, by the contrary, it diminishes the migration of inflammatory cells to the lung. The diet enriched with fish oil has a better anti-inflammatory effect, decreasing eosinophil and neutrophil and increasing monocyte infiltration, important cells for the inflammation resolution. Apoio Financeiro: FAPESP, CAPES and CNPq

06.094

Fish or soybean oil rich-diets decrease TH2 response in experimental asthma. Xavier, R. A. N.¹; Barros K. V.¹; Abreu, G. G.¹; Silveira, V. L. F.² ¹UNIFESP - Fisiologia; ²UNIFESP – Ciências Biológicas

Introduction: We have observed that both fish or soybean oil-rich diets decrease the pulmonary inflammation. This study was aimed to determinate if these diets could change the Th1 and Th2 profile in bronchoalveolar lavage (BAL) and lung tissue in experimental asthma.

Methods: Male Wistar rats (28-30 days) were fed for 7 weeks with chow diet (Control), chow diet enriched with 15% of fish (Fish) or soybean oil (Soy). At the 5th week of feeding, rats were sensitized on days 0 and 7 by i.p. injection of ovalbumin-alumen in saline. At 14th and 21st days after the first immunization the animals were challenged by exposure to an aerosol of ovalbumin 2.5% for 20 min. The animals were killed 24 hours after the exposure to the second aerosol challenge. The BAL, collected with 12 mL of PBS, and the lungs, homogenized in 8 mL of PBS, were used for Th1 (TNF- α , IFN- γ) and Th2 (IL-4, IL-10) cytokines determination by ELISA. Statistical analysis was performed by Kruskal-Wallis ANOVA and Dunn test with $p < 0.05$.

Results: The INF-g levels of the BAL were not detectable in any group and the levels of the others cytokines in BAL were lower in relation to that found in the lung. TNF- α and IL-10 levels in BAL as INF-g and TNF in the lung were not changed by fish or soybean diets. However the BAL IL-4 and IL-10 and lung IL-4 were significantly decreased by soybean and fish oil rich-diets.

Conclusions: Both diets rich in fish or soybean oil do not change Th1 cytokines levels (INF-g and TNF- α), but significantly decreases Th2 cytokines (IL-4 and IL-10) in experimental asthma. These observations suggest that the anti-inflammatory effect of fish and soybean diets is related to changes on Th2 response, which is the exacerbate response in asthma process. Apoio Financeiro: FAPESP, CAPES and CNPq

06.095

Different mechanisms underlie the effects of acute and chronic inhibition of nitric oxide synthases in antigen-induced pulmonary eosinophil recruitment in BALB/C mice. Lintomen, L.¹; Souza Filho, L. G.²; Ferreira, T.²; Camargo, E.²; Teixeira, S. A.²; Muscará, M. N.²; Landgraf, R. G.³; Jancar, S.³; Mendes, D. G.⁴; Nucci, G. de¹; Antunes, E.¹ ¹UNICAMP - Farmacologia; ²ICB-USP - Farmacologia; ³-USP - Imunologia; ⁴UNICAMP - Medicina

Introduction: Nitric oxide (NO) has been recognized as an important immunomodulatory mediator of inflammatory responses in the lung. Nitric oxide synthase (NOS) inhibitors have been largely used to evaluate the NO contribution to pulmonary allergy, but contrasting data have been obtained. In this study, pharmacological, biochemical and pharmacokinetic studies were performed to evaluate the effects of acute and chronic treatment of BALB/C mice with non-selective (L-NAME) and selective (aminoguanidine) NOS inhibitors in the pulmonary eosinophil recruitment of ovalbumin (OVA)-challenged mice. **Methods and Results:** Male BALB/c mice were sensitized and intranasally challenged with OVA. In chronic treatments, mice received L-NAME (50 and 150 mg/kg/day) or aminoguanidine (AG; 20 mg/kg/day) in the drinking water (3 weeks). In acute treatments, mice received L-NAME (50 mg/kg, gavage, 30 min prior to the first challenge). Chronic L-NAME treatment significantly increased the eosinophil (EO) number in bronchoalveolar lavage (BAL) ($0.34 \pm 0.03 \times 10^6/\text{BAL}$) compared with untreated animals ($0.13 \pm 0.02 \times 10^6/\text{BAL}$). Similarly, the EO number in peribronchiolar parenchyma was 48% higher in chronic L-NAME group compared with untreated mice. Acute L-NAME and AG rather reduced the EO number in BAL (0.04 ± 0.02 and $0.05 \pm 0.00 \times 10^6/\text{BAL}$, respectively). Chronic or acute L-NAME nearly abolished the constitutive NOS (cNOS) activity in brain and lungs. The inducible pulmonary NOS (iNOS) activity was significantly reduced by acute L-NAME compared with untreated mice (0.7 ± 0.05 and 1.2 ± 0.2 pmol/mim/mg protein, respectively), whereas chronic L-NAME failed to affect the iNOS activity (0.95 ± 0.4 pmol/mim/mg protein). AG (but not chronic LNAME) prevented the increased eotaxin levels in BAL. The NO_x reduction by acute LNAME ($68.4 \pm 7.3\%$) and AG ($74.9 \pm 6.1\%$) was higher compared with chronic L-NAME ($37.5 \pm 6.1\%$). The pharmacokinetic protocols showed that L-NAME is not bioavailable when given *per os*. The serum concentrations of its metabolite N^ω-nitro-L-arginine decreased from 30 min to 24 h after acute L-NAME intake. In the chronic treatment, the serum concentrations of this metabolite (16.2 ng/ml) was close to the limit of detection (10 ng/mL). **Conclusion:** 3-week treatment with LNAME yields low serum N^ω-nitro-L-arginine concentrations, causing preferential inhibition of cNOS activity. Therefore, EO influx potentiation by chronic LNAME reflects a removal of protective cNOS-derived NO, with no interference on the ongoing inflammation due to iNOS-derived NO. Apoio Financeiro: CAPES

06.096

A atividade antiedematogênica da galactana sulfatada da alga marinha vermelha *gelidium crinale* ocorre via inibição de histamina. Assreuy, A. M. S.¹; Sousa, A. A. S.¹; Xavier, P. A.¹; Martins, P. A.¹; Andrade, A. C. S.¹; Benevides, N. M. B.²; Pereira, M. G.¹ ¹UECE - Ciências Biomédicas; ²UFC - Bioquímica e Biologia Molecular

Estudos anteriores têm demonstrado que polissacarídeos sulfatados possuem atividades anticoagulante e antitrombótica (FARIAS, W.R.L. J. Biol. Chem., Europe, v. 275, p. 29299, 2000). Entretanto, estudos do papel de galactanas sulfatadas em modelos *in vivo* de inflamação são raros na literatura. Em experimentos anteriores demonstramos que a galactana sulfatada isolada da alga marinha vermelha *Gelidium crinale*, com atividade anticoagulante bem caracterizada (Carb. Research., Europe, 340: página, 2005), inibe o edema de pata em ratos induzido por dextrana, um agente flogístico que promove edema osmótico acelular via degranulação de mastócitos e liberação de histamina e serotonina. O presente trabalho se propôs a investigar o efeito anti-edematogênico da galactana sulfatada da alga marinha vermelha *G. crinale*, avaliando a participação de dois importantes mediadores (histamina e serotonina) envolvidos no edema causado por dextrana. Utilizaram-se ratos Wistar machos (150-250g) manipulados de acordo com os princípios do Comitê de Ética da UECE para o uso de animais de experimentação. A galactana sulfatada da alga vermelha *G. crinale* foi isolada e purificada por cromatografia de troca iônica (DEAE-celulose). Os animais foram pré-tratados com a galactana na sua melhor dose antiedematogênica (1 mg/kg) por via endovenosa (e.v.), antes da indução do edema de pata pelos mediadores químicos histamina (100mg/pata) e serotonina (20 mg/pata), ambos aplicados por via subcutânea (s.c.); o grupo controle recebeu salina (100 mL/100g) (s.c.). O edema foi avaliado por pletismometria, medindo-se o volume de líquido deslocado pelas patas antes (tempo zero), e 30min e de 1-4h após a aplicação do estímulo. Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M de n experimentos e analisados por ANOVA e teste t de Student. Valores para $p < 0,05$ foram considerados significantes. A galactana sulfatada apresentou atividade antiedematogênica significativa apenas sobre o edema de pata induzido por histamina ($42,3 \pm 9,63\%$), efeito não observado sobre o edema induzido por serotonina ($8,93 \pm 14,9\%$). A galactana sulfatada da alga vermelha *Gelidium crinale* possui atividade antiedematogênica sobre o edema induzido por histamina, sugerindo que este mediador de fase inicial pode estar envolvido em seu efeito antiinflamatório. A participação de outros mediadores inflamatórios no edema induzido por dextrana será investigada a fim de esclarecer o mecanismo de ação desta galactana. Apoio Financeiro: CNPq, CAPES e FUNCAP

06.097

Habilidade da suramina em inibir a resposta inflamatória induzida pelo veneno de *Apis mellifera*. El-Kik, C. Z.; Fernandes, F. F. A.; Fonseca, T. F.; Gaban, G. A.; Melo, P. A. UFRJ - Farmacologia Básica e Clínica

Avaliamos a habilidade da suramina, um derivado polisulfatado naftiluréia em antagonizar a resposta inflamatória e atividades enzimáticas do veneno de abelha *Apis mellifera*. Camundongos suíços adultos (20-25 g) foram utilizados nos experimentos *in vivo* para contagem de células inflamatórias no sangue. Duas horas após injeção intramuscular do veneno 0,1 – 1 mg/kg, foi observado redução de leucócitos totais em cerca de 68% quando comparados a valores controle. A suramina preveniu a redução dos leucócitos totais em cerca de 80%. Na avaliação diferencial das células inflamatórias, duas horas após a injeção do veneno, observamos redução de 20% dos linfócitos, aumento de 25% no número de neutrófilos e de 10% em monócitos. Em 24 horas, linfócitos e neutrófilos retornaram a valores controle, enquanto o número de monócitos permaneceu aumentado. Foram utilizados 3 protocolos de tratamento com suramina (30 mg/kg): pré-incubação, pré-tratamento e pós-tratamento. Foi observado, 2 e 24 horas após injeção do veneno (1 mg/kg), que a suramina inibiu as alterações na contagem de células inflamatórias. Para avaliação morfológica foi realizada injeção de veneno (0,5 mg/kg) no músculo EDL. O veneno induziu intensa degeneração, principalmente na região periférica do músculo, com presença de células edemaciadas e vacúolos claros. Os músculos que receberam injeção do veneno pré-incubado com suramina (10 mg/kg) apresentaram menor área de lesão, com sua região central preservada, sem células edemaciadas. Para avaliação das atividades enzimáticas foram utilizados protocolos *in vitro*. A atividade fosfolipásica foi avaliada de acordo o método modificado de Marinetti (1965). O veneno (0,1 – 10 µg/mL) mostrou atividade fosfolipase dependente da concentração. Esta atividade foi inibida pela adição de concentrações crescentes de suramina (1 – 30 µM). A atividade caseinolítica do veneno de abelha foi avaliada de acordo com Garcia e col (1978). O veneno (0,1 – 10 µg/mL) não produziu hidrólise da azocaseína, indicando ausência da atividade proteolítica nas condições utilizadas. A avaliação da atividade hialuronidase foi realizada através do método modificado de Reissig e col (1955). Neste protocolo, o veneno (10 µg/mL) hidrolisou o ácido hialurônico. A suramina (30 µg/mL) inibiu em 80% esta atividade. Os resultados obtidos sugerem que a inibição das atividades enzimáticas pela suramina podem estar relacionadas com a diminuição da resposta inflamatória induzida pelo veneno. Sendo assim, a propriedade antiinflamatória da suramina poderá contribuir na terapia de envenenamentos, principalmente contra venenos de *Apis mellifera*. Apoio Financeiro: CAPES, FAPERJ, CNPq -PRONEX.

06.098

Estudo da suramina na resposta inflamatória e citotóxica de venenos de *Bothrops*. Fonseca, T. F.¹; El-Kik, C. Z.¹; Gaban, G. A.¹; Fernandes, F. F. A.¹; Calil-Elias, S.²; Melo, P. A.¹ ¹UFRJ - Farmacologia Básica e Clínica; ²UFF - Farmácia

Neste trabalho avaliamos a capacidade da suramina, um derivado polisulfatado naftiluréia, em antagonizar a resposta inflamatória e citotóxica do veneno bruto de *B. jararacussu* assim como a atividade hemorrágica do veneno de *B. jararaca*. A atividade edematogênica do veneno (1 mg/kg) foi antagonizada pela suramina (10 mg/kg), a qual também preveniu as diminuições de leucócitos totais sistêmicos (duas horas) e de linfócitos (vinte e quatro horas) induzidas pelo veneno, bem como inibiu os aumentos de neutrófilos (duas horas) e de monócitos (vinte e quatro horas) após injeção do veneno. A atividade miotóxica do veneno foi antagonizada pela suramina (10 mg/kg) nos protocolos de pré-incubação, pré e pós-tratamento como redução da atividade plasmática de creatino kinase de 71%, 48% e 55% respectivamente e esta resposta não é dependente da dose. Vinte e quatro horas e vinte e oito dias após a injeção do veneno, os músculos foram dissecados e processados para a microscopia óptica. Vinte e quatro horas após a injeção observou-se completa degeneração das fibras musculares, desorganização fascicular e intenso infiltrado inflamatório. O pós-tratamento com suramina (10 mg/kg), em análise qualitativa, protegeu parte destas fibras restringindo a lesão à parte periférica do músculo, além de diminuir o infiltrado inflamatório. Vinte e oito dias após a injeção do veneno notou-se células com núcleo centralizado na parte central do músculo o que não foi observado nos grupos pós-tratados com suramina em doses crescentes (1 – 10 mg/kg). Estes resultados indicam que as propriedades antiofídicas da suramina podem contribuir com a melhora da terapêutica antiofídica, principalmente contra os venenos botrópicos. Palavras-chave: *Bothrops jararacussu*, *Bothrops jararaca*, Suramin, Resposta inflamatória, Miotoxicidade, Hemorragia. Apoio Financeiro: CAPES, FAPERJ, CNPq -PRONEX.

06.099

Papel protetor da anexina-A1 no dano pulmonar durante a isquemia/reperfusão intestinal. Guido, B. C.; Zanatelli, M.; Oliani, S. M.; Damazo, A. S. IBILCE-UNESP – Biologia

Introdução: Eventos isquêmicos no intestino, seguidos de reperfusão (I/R-i), são potenciais indutores de distúrbios pulmonares (1). Esta condição patológica é produzida por inúmeros eventos bioquímicos e celulares. Recentemente, investigações farmacológicas demonstraram que a proteína anexina-A1 (AnxA1) participa ativamente na I/R, particularmente inibindo a ação de células inflamatórias (2). O presente projeto avaliou o pulmão em modelo de I/R-i após o tratamento com o peptídeo mimético da AnxA1, Ac2-26. **Métodos:** Os grupos estudados foram: sham, I/R-i (oclusão da artéria mesentérica superior por 45 min seguido de 2 ou 24 h de reperfusão) e pré-tratamento com o peptídeo Ac2-26 (100 µg). O sangue foi coletado para a quantificação dos leucócitos. O tecido pulmonar foi coletado, fixado e incluído na resina LR Gold para análises histológicas e imunoistoquímicas. **Resultados:** A análise quantitativa dos leucócitos circulantes no sangue periférico após 2 e 24 h da I/R-i revelou uma redução significativa no número de linfócitos ($9,2 \pm 0,7$ e $8,2 \pm 0,8$) e monócitos ($4,4 \pm 0,5$ e $2,4 \pm 0,3$) em relação ao grupo sham ($30,1 \pm 2,4$, $9,0 \pm 1,0$). Já os PMN apresentaram um aumento em 2 h seguido de redução após 24 h ($18,2 \pm 1,5$ e $3,8 \pm 0,5$ - sham $6,1 \pm 0,8$). Após o tratamento com o Ac2-26, observamos aumento no número de monócitos ($8,2 \pm 0,9$) e PMN ($12,9 \pm 1,0$) circulantes 24 h após a I/R-i, comparado com o grupo I/R, porém sem afetar o número de linfócitos. Já os grupos tratados e submetidos a reperfusão por 2 h não apresentaram diferenças em relação ao grupo I/R. Os neutrófilos analisados qualitativamente nos fragmentos de pulmão após 2 ou 24 h da I/R-i foram observados em intensa migração celular. No entanto, após o pré-tratamento com o peptídeo Ac2-26 estas células foram observadas aderidas aos capilares pulmonares. A expressão da AnxA1 endógena foi avaliada imunoistoquimicamente no pulmão. Nos animais do grupo I/R-i, os neutrófilos transmigrados apresentaram intensa imunomarcagem para a AnxA1. Após o pré-tratamento com o peptídeo Ac2-26, os neutrófilos observados no tecido e nos vasos sanguíneos também expressaram a proteína AnxA1 endógena. **Discussão:** O tratamento com o peptídeo Ac2-26 exerce um papel protetor durante a I/R-i *in vivo*, ressaltando sua eficácia na regulação do dano tecidual pulmonar ocasionado pela migração de leucócitos para este órgão. O efeito da AnxA1 na fisiologia celular poderá fornecer subsídios para melhor compreensão da ação antiinflamatória desta proteína e para o desenvolvimento de novas terapias farmacológicas baseadas na ação anti-migratória da AnxA1. 1. Cavriani et al. *Shock*, 23, 330, 2005. 2. Gavins et al. *FASEB J.*, 19, 100, 2005. Apoio Financeiro: FAPESP e CNPq

06.100

Mast cell involvement in silica-induced pulmonary fibrosis in mice. Farias-Filho, F. A.; Lucena, S. L.; Martins, M. A.; Cordeiro, R. S. B.; Silva, P. M. R. e FIOCRUZ - Fisiologia e Farmacodinâmica

Introduction: Silicosis is an occupational disease characterized by the presence of chronic fibrosis in the lungs. Mast cells have been implicated in several fibrotic diseases. Thus, in this study we investigated potential qualitative and quantitative alterations in the lung mast cell population in the course of silicosis. Mast cell activation by silica particles *in vitro* was also assessed. **Methods:** Silica (10 mg) was administered intranasally into Swiss-Webster mice and the analyses were performed 7 - 28 days later. Lung morphology, mast cell number and expression of stem cell factor (SCF) were evaluated by means of staining and immunohistochemical techniques. For *in vitro* analyses, bone marrow-derived mast cells (BMMCs) were used and their activation was evaluated as the percentage of β -hexosaminidase (B-hex) release. **Results:** Lung examination revealed an extensive fibrotic response and presence of numerous granulomas, mostly of peribronchiolar distribution in silicotic mice, starting on day 7 and being maximal on day 28. This phenomenon paralleled with increased expression of the SCF in the lung tissue. A marked increase in the number of MCs on days 14 and 28 was noted in silicotic lungs, with a clear predominance of the connective-tissue phenotype. Cultured BMMC when exposed to silica showed clear signs of activation as attested by higher levels of β -hex release as compared to control cells. Incubation of BMMCs with pertussis toxin abolished the degranulation response, suggesting the involvement of Gi coupled receptors in this system. BMMCs were also shown to be sensitive to treatment with the inhibitor of PI3K wortmannin and of PKC calphostin C, implicating both enzymes in the silica-activated signaling pathway. In another set of experiments, we showed that silica-stimulated BMMC supernatant led to higher levels of the survival of lung fibroblasts from naive mice, reinforcing the idea that mast cells can generate factors which are active in the control of fibroblast function. **Discussion:** Our findings show that mast cell numbers increased in parallel to fibrosis progression in the lungs of silicotic mice, a phenomenon preceded by elevation of the SCF expression. In addition, mast cells exposed to silica responded with degranulation dependent on PI3K and PKC signaling and by means of generation of fibroblast activating factor(s), reinforcing the idea that MCs do contribute to fibrotic responses associated to several chronic diseases including silicosis. Apoio Financeiro: PAPES4/FIOCRUZ, CNPq, FAPERJ, UNESCO.

06.101

Synergic effect of the coumarin on intestinal anti-inflammatory activity of sulfasalazine. Luchini, A. C.; Cestari, S. H.; Orsi, P. R.; Seito, L. N.; Witaicenis, A.; Di Stasi, L. C. ¹IB-UNESP-Botucatu – Farmacologia

Introduction: Considering the adverse effects of the sulfasalazine, drug used in the treatment of ulcerative colitis in humans, the present study evaluated the synergic effect of coumarin on the intestinal anti-inflammatory activity of sulfasalazine. **Methods:** Colitis was induced with 10 mg TNBS in 50% ethanol. After 14 days animals were given a second dose of 10 mg of TNBS in an attempt to mimic relapses common in human. Rats were daily (p.o.) given with coumarin (5 mg/kg) and in combination with sulfasalazine at doses of 5 and 25 mg/kg. Colonic damage was evaluated macroscopically. Biochemical markers of colonic inflammation were also assayed, including myeloperoxidase (MPO) and alkaline phosphatase (AP) activities and glutathione (GSH) content level. Means were testes by ANOVA. Score (median-range) was analyzed with the Kruskal-Wallis test. **Results:** Treatment with coumarin, coumarin plus sulfasalazine (5+25 mg/kg) significantly counteracted GSH depletion (2349.01 ± 118.63 ; 2566.64 ± 183.99 ; 2352.05 ± 155.47 vs 1541.18 ± 156.26 TNBS-control) and reduced AP (9.90 ± 1.73 ; 8.57 ± 0.96 ; 11.05 ± 1.74 vs 17.32 ± 2.25 TNBS-control) the 1st week; moreover coumarin and coumarin plus sulfasalazine (5+5 mg/kg) reduced macroscopic colonic damage. Coumarin (5 mg/kg) and coumarin plus sulfasalazine (5+5 mg/kg) produced similar effect to sulfasalazine (25 mg/kg) on the MPO activity (121.39 ± 16.48 ; 159.98 ± 20.82 and 169.03 ± 23.68) at the 2nd week. In addition, administration of coumarin and coumarin plus sulfasalazine (5+5 mg/kg) to colitic animals prevented from the impact of the colitic relapse, evidenced by restoration in colonic GSH levels (2002.53 ± 91.47 and 1878.66 ± 120.05 vs 1399.8 ± 71.60 TNBS-control) and attenuated macroscopic colonic damage; moreover, after three weeks, coumarin plus sulfasalazine (5+5 mg/kg) demonstrated similar effect in the restoration of colonic GSH levels than sulfasalazine at the dose of 25 mg/kg (1878.66 ± 120.05 vs 1850.43 ± 125.91). **Discussion:** The associated treatments using coumarin plus sulfasalazine (5+5 mg/kg) promoted similar effects than sulfasalazine at the dose of 25 mg/kg suggesting a synergic effect of coumarin on the intestinal activity of sulfasalazine. This beneficial effect in the chronic intestinal inflammation was obtained using a dose 5 times smaller than the effective sulfasalazine positive control. The synergic effects observed indicate that coumarin plus sulfasalazine could be a new therapeutical option for complementary treatment of inflammatory bowel disease, permitting a reduction of the doses of sulfasalazine and their adverse effects. Apoio Financeiro: FAPESP (06/55209-8) and CNPq.

06.102

Kinin B₁ and B₂ receptor up-regulation by *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide via TLR2. Souza, P. P. C.¹; Costa-Neto, C. M.¹; Lundgren, I.²; Lerner, U. H.³ ¹FMRP-USP - Bioquímica e Imunologia; ²Umea Universitet - Oral Cell Biology

The aim of this study was to demonstrate that *Porphyromonas gingivalis* (*P.g.*) LPS, up-regulates kinin receptors (B1 and B2) in a model of primary culture of human gingival fibroblasts (HGF). For all the experiments, 10⁵ cells were seeded in 24-well plates overnight and the media was replaced by media with or without the test substances. The statistical analysis used was one-way ANOVA complemented by Bonferroni's test. Real time PCR analysis revealed that *P.g.* LPS (10 µg/mL) up-regulated B1 and B2 receptors after 3, 6 and 24 hours of exposition, with the peak observed after 6h (for B1, 3,46 ± 0,55 times and for B2, 2,78 ± 0,26 times, p<0,05). In order to confirm if the mRNA changes results in protein production, cells were exposed or not to LPS for 6h and than exposed to bradykinin (BK, B2 agonist) or des-Arg⁹-BK (B1 agonist) for 24 hours. The media was collected and prostaglandin E2 (PGE2) content was assessed by radioimmunoassay. In LPS-treated group, the exposition to BK and DABK enhanced PGE2 production in and 3,1 ± 0,3 times 3 ± 0,45 times comparing with non-pretreated cells, respectively. The knock down of TLR2 using small interfering RNA inhibited the effects of *P.g.*, confirming that the effect is *via* TLR2. We also demonstrated that this up-regulation is dependent on the production of TNF-α, because the treatment of the LPS-exposed cells with anti-TNF-α antibody completely blocked the up-regulation of B1 and B2 receptors. In conclusion, in HGF *P.g.* LPS binds to TLR2 and up-regulates B1 and B2 receptors, in a mechanism dependent on TNF-α production. [Supported by CAPES and Swedish Council of Medicine] Apoio Financeiro: Capes, CNPq, FAPESP, Swedish Council of Medicine

06.103

Avaliação temporal da inflamação pulmonar decorrente de isquemia e reperfusão intestinal em ratos. Vitoretto, L. B.; Breithaupt-Faloppa, A. C.; Floriano, S. M.; Tavares de Lima, W.; Oliveira-Filho, R. M. ICB-USP - Farmacologia

Introdução: A isquemia/reperfusão intestinal (I/R-intestinal) é um problema clínico que se associa ao desenvolvimento de inflamação sistêmica e a Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA), que se caracteriza por duas fases, uma mais aguda (exsudativa) e outra mais tardia (proliferativa). No contexto da drenagem linfática intestinal, o pulmão é o primeiro órgão exposto à linfa mesentérica e a obstrução do fluxo linfático atenua a lesão inflamatória pulmonar após a I/R intestinal. O objetivo do presente estudo foi investigar a repercussão inflamatória pulmonar de períodos prolongados de reperfusão em modelo de isquemia/reperfusão intestinal. **Métodos:** Ratos Wistar sob anestesia foram submetidos à oclusão da artéria mesentérica superior durante 45 min e mantidos em reperfusão por períodos de 2 e 120 h. Grupos de ratos tiveram o ducto torácico linfático ligado imediatamente antes da instalação da isquemia intestinal. A presença de neutrófilos foi determinada pela atividade de mieloperoxidase (MPO) no pulmão e no intestino. A permeabilidade vascular pulmonar (PV) e intestinal foi avaliada através do método de extravasamento do corante Azul de Evans. **Resultados:** Os dados indicaram que houve aumento de PV pulmonar após 2 e 120 h de reperfusão intestinal. Em relação à atividade de MPO pulmonar, houve aumento após 2 h de reperfusão e este aumento foi exacerbado 120 h após. A atividade de MPO intestinal aumentou significativamente somente após 2 h de reperfusão. A obstrução do fluxo linfático causou redução significativa da PV pulmonar e da atividade de MPO após 2 e 120 h de reperfusão. **Discussão:** Os dados apresentados sugerem que após eventos isquêmicos intestinais, os pulmões se tornam mais susceptíveis a estímulos inflamatórios, possivelmente derivados do intestino, os quais são transportados pelo sistema linfático. Apoio Financeiro: FAPESP (05/02271-5, 07/56872-5); CNPq.

06.104

Papel dos canais de potássio sensíveis ao ATP (K_{ATP}) e dos receptores TRPV1 NO efeito gastroprotetor do sulfeto de hidrogênio (H_2S) na lesão gástrica por etanol em camundongos. Medeiros, J. V. R.¹; Bezerra, V. H.¹; Torres, J. N. L.¹; Barbosa, A. L. R.¹; Gomes, A. S.¹; Soares, P. M. G.¹; Lima-Júnior, R. C. P.¹; Cunha, F. de Q.²; Souza, M. H. L. P.¹ ¹UFC - Fisiologia e Farmacologia; ²FMRP-USP

Introdução: Etanol é um importante agente agressor da mucosa gástrica. Demonstramos que o H_2S possui um efeito protetor na lesão por etanol em camundongos (Medeiros et al, Gastroenterology, 2008, 134-4, A-239-A-239).

Objetivos: Estudar o papel dos K_{ATP} , dos neurônios aferentes e dos receptores TRPV1 na proteção do H_2S sobre a lesão gástrica induzida por etanol em camundongos. **Metodologia:** Foram utilizados camundongos Swiss, machos com 25-30g. Para estudo dos K_{ATP} , inicialmente, os animais foram pré-tratados com glibenclamida (3 e 10 mg/kg, v.o.). Após 1h, foram administrados os doadores de H_2S , NaHS (150 μ mol/kg, v.o) ou o Reagente de Lawesson's (27 μ mol/kg, v.o). 30 min depois, o etanol 50% (0,5ml/25g, v.o) foi administrado. Depois de 1 h, os animais foram sacrificados e os estômagos foram abertos para determinação da área da lesão usando planimetria computadorizada. Para o estudo dos neurônios aferentes, foi realizado protocolo de ablação dos neurônios aferentes com doses neurotóxicas de capsaicina 25, 50 e 50 mg/kg, s.c) de 12 em 12 horas, num total de 3 aplicações. Após 8 dias, os animais receberam NaHS (150 μ mol/kg, v.o) ou o Reagente de Lawesson's (27 μ mol/kg, v.o). Decorridos 30 min, o etanol 50% (0,5ml/25g, v.o) foi administrado. Depois de 1 h, os estômagos foram abertos para determinação da área da lesão. Em outro protocolo experimental, os animais receberam capsazepina (antagonista seletivo dos receptores TRPV1, 10 mg/kg, i.p) e em seguida os doadores de H_2S como citado acima. **Resultados:** O etanol 50% induziu uma lesão gástrica ($110.0 \pm 17.6\text{mm}^2$). A administração de NaHS ($16.62 \pm 6.7\text{mm}^2$) e do Reagente de Lawesson's ($29.74 \pm 6.7\text{mm}^2$) preveniu significativamente a lesão por álcool no estômago. Entretanto, a glibenclamida na dose de 10 mg/kg reverteu completamente esse efeito protetor dos doadores de H_2S (NaHS= 97.83 ± 19.3 e Lawesson's= $117.3 \pm 7.6\text{mm}^2$). Nos animais depletados de neurônios aferentes por doses neurotóxicas de capsaicina, houve uma reversão do efeito protetor dos doadores de H_2S (NaHS= 73.35 ± 27.5 e Lawesson's= $131.0 \pm 20.11\text{mm}^2$). Efeito semelhante foi observado como pré-tratamento com capsazepina visto que a administração dessa droga também reverteu a proteção do NaHS ($67.23 \pm 17.82\text{mm}^2$) e do Lawesson's ($63.30 \pm 9.1\text{mm}^2$). **Conclusão:** O H_2S possui efeito protetor contra a lesão gástrica induzida por etanol em camundongos por um mecanismo depende da ativação dos canais de potássio ATP-dependentes e dos neurônios aferentes, possivelmente modulando receptores TRPV1. Apoio Financeiro: CNPq

06.105

Efeitos antiinflamatórios de extratos da casca de *S. adstringens* (Barbatimão) no edema de pata induzido pela carragenina em ratos. Dias Júnior, P. P.¹; Carvalho, T. B.²; Rodrigues, L. A.³; Fracasso, J. F.⁴ ¹UNIFEB – Farmácia-Bioquímica; ²UNIFEB - Farmacologia; ³UNIFEB - Ciências Fisiológicas; ⁴UNESP-Araraquara

Introdução: O edema é um dos sinais da inflamação. Dos fatores endógenos liberados em resposta à inflamação, a Histamina e a Bradicnina são os mais importantes. A avaliação do envolvimento destes mediadores no processo é importante, dado que a inflamação é uma ocorrência de incômodo e desconforto ao paciente. Neste estudo, avaliamos comparativamente os efeitos de extratos aquosos e etanólicos de casca de *S. adstringens* (Mart.), com o Ácido Acetil Salicílico (AAS), num modelo de inflamação (edema de pata) induzido pela carragenina (Carr) em ratos. **Métodos:** Ratos Wistar (220–300 gramas), distribuídos em 7 grupos de 5 animais/grupo foram injetados por via intra-plantar (i. pl.), com salina (Sal) ou Carr 100 µg/kg/pata veiculadas em 0,1 ml, na pata posterior direita. No GI injetamos Sal, nos grupos GII – GVII, Carr. Os animais foram pré-tratados com: GII-Extrato aquoso; GIII extrato hidroalcoólico (1:1); GIV-extrato hidroalcoólico (3:7); GV-etanol e GVI- AAS 30 mg/kg (intra-peritoneal 60 min. antes da injeção i.pl. de Carr) e GVII- Sal. Os extratos de casca de Barbatimão desidratada foram obtidos por maceração nos solventes extratores indicados. O edema foi medido com espessímetro (em mm) após a injeção i.pl.; após 1; 2; e 4 hr, e indicado pelo aumento da espessura da pata injetada. Os valores estão apresentados como a média ± erro padrão da média (m ± epm). As diferenças observadas nos grupos tratados e controle foram significativas (P < 0,05) pela Anova. **Resultados:** Valores de Edema (mm): medidos em 0, 1, 2 e 4 horas após a injeção i. pl. de Carr: GI: 0,1 ± 0,04; 0,1 ± 0,06; 0,1 ± 0,04; 0,1 ± 0,02; GII: 0,15 ± 0,05; 0,15 ± 0,05*; 0,15 ± 0,05* e 0,10 ± 0,05*; GIII: 0,15 ± 0,05; 0,30 ± 0,01*; 0,2 ± 0,05* e 0,15 ± 0,05*; GIV: 0,1 ± 0,05; 0,15 ± 0,05*; 0,20 ± 0,05* e 0,1 ± 0,05*; GV: 0,15 ± 0,05; 0,15 ± 0,05*; 0,15 ± 0,05* e 0,10 ± 0,05*; GVI: 0,10 ± 0,05; 0,30 ± 0,01; 0,90 ± 0,05* e 0,30 ± 0,05*; GVII: 0,10 ± 0,04; 0,40 ± 0,01; 1,20 ± 0,05; 0,30 ± 0,03. * P ≤ 0,05 para n = 5 animais/grupo. **Discussão:** Nossos resultados sugerem que os extratos aquoso e etanólicos de casca de Barbatimão, foram mais eficazes na proteção dos ratos contra o efeito edematogênico da Carr, comparados aos efeitos do AAS, que é um agente antiinflamatório classicamente empregado na clínica, na dose empregada neste modelo experimental. Apoio Financeiro: UNIFEB - Barretos/SP; FCFar – UNESP – Araraquara/SP

06.106

O pré-condicionamento isquêmico inibe a migração de neutrófilos à distância através de um mecanismo dependente de óxido nítrico. Souza-Filho, M. V. P.¹; Simão, A. F. L.²; Lemos, H. de P.³; Castro, N. C. M.²; Ribeiro, B. J.²; Cunha, F. de Q.³; Ribeiro, R. A.² ¹UFC - Cirurgia; ²UFC - Fisiologia e Farmacologia; ³FMRP-USP

Introdução: A lesão de reperfusão (LR) ocorre quando há retardo do restabelecimento do fluxo sanguíneo para órgãos e tecidos. O PCI, uma das estratégias propostas para atenuar a LR, consiste na indução de curtos períodos de isquemia seguidos de reperfusão realizados antes de uma isquemia prolongada. O objetivo do presente estudo foi avaliar a participação do Óxido Nítrico (NO) no efeito inibitório do PCI da pata posterior na migração de neutrófilos (MN) para cavidade peritoneal de camundongos. **Métodos:** O PCI foi induzido através da isquemia da pata posterior por 10 min seguidos de 30 min de reperfusão em camundongos selvagens e knockout para NO sintase induzida (NOSi -/-). O rolamento (RL) e adesão de leucócitos (AL), avaliados por microscopia intravital, bem como a MN, avaliada por contagem total e diferencial de céls. no exsudato, foram induzidos via administração ip de Carragenina (Cg, 500mg/cavidade), sendo os resultados expressos em número de leucócitos/min, número de células aderidas/100mm², e número de neutrófilos x 10⁶/cavidade, respectivamente. Diferentes grupos de animais foram tratados com salina (SAL), Aminoguanidina (AG, sc, 100 mg/kg), ODQ (ip, 8mmol/kg) ou Glibenclamida (GBC, sc, 20 mg/kg) 30 min antes da indução de PCI na pata posterior. Os grupos controles (C) receberam o mesmo tratamento, porém sem PCI. **Resultados:** O RL, AL e MN induzidos por Cg na cavidade peritoneal foram significativamente (p<0,01) inibidos pelo PCI da pata posterior dos animais selvagens (RL= 75,94%, AL= 56,51%, MN= 79,01%), o mesmo não sendo observado nos animais NOSi -/-. O tratamento dos animais selvagens com AG e ODQ, mas não com GBC, anularam o efeito inibitório do PCI sobre a MN induzida por Cg. Observou-se ainda que o PCI não alterou os níveis de TNF- α , IL1-b e quimiocinas induzidos por Cg na cavidade peritoneal. **Discussão:** Os resultados demonstram que o PCI apresentou um efeito inibitório na MN à distância, sendo o NO um importante mediador envolvido neste processo, provavelmente através da via guanilato-ciclase-solúvel/GMPc. Este efeito inibitório do PCI parece não depender da abertura de canais de potássio dependentes de ATP (K_{ATP}), nem da inibição da síntese e/ou liberação de citocinas pro-inflamatórias. O esclarecimento do mecanismo através do qual o PCI inibe a MN poderá trazer importantes contribuições em situações clínicas onde a infiltração neutrofílica constitui um fator complicador, podendo propiciar o desenvolvimento de novas abordagens profiláticas e/ou terapêuticas. Apoio Financeiro: CAPES, CNPq.

06.107

O pré-condicionamento isquêmico inibe a resposta inflamatória sistêmica induzida por LPS de *Escherichia coli*. Souza-Filho, M. V. P.¹; Castro, N. C. M.²; Ribeiro, B. J.²; Gomes, A. S.²; Souza, M. H. L. P.²; Ribeiro, R. A.² ¹UFC - Cirurgia; ²UFC - Fisiologia e Farmacologia

Introdução: A lesão de reperfusão (LR) ocorre em diversos tecidos durante o restabelecimento do fluxo sanguíneo. Dentre as estratégias propostas para atenuar a LR está o pré-condicionamento isquêmico (PCI), que consiste na indução de curtos períodos de isquemia seguidos de reperfusão realizados antes de uma isquemia prolongada. Na resposta inflamatória (RI) desencadeada pelo LPS ocorre liberação de citocinas pró-inflamatórias e aumento da produção de óxido nítrico (NO). O presente estudo avaliou a capacidade do PCI em inibir a RI induzida por LPS, através da dosagem de citocinas e da determinação de nitrito.

Métodos: O PCI foi induzido através da isquemia da pata direita de ratos machos Wistar (180-220 g) por 10 min seguidos de 30 min de reperfusão. Imediatamente após o PCI, LPS (dose letal - 10 mg/kg) ou salina foram administrados por via endovenosa. Os grupos controles receberam apenas salina ou LPS por via endovenosa. O sangue foi coletado trinta min, 3 e 6 horas após a administração do LPS ou salina e centrifugados para obtenção do soro. A detecção de TNF- α , IL-1 e IL-10 foi determinada por ELISA, usando o Kit DuoSet. A produção de NO foi obtida através da determinação do conteúdo total de nitrito presente no soro e medida pela reação de Griess. **Resultados:** Os níveis séricos de TNF-a e IL-1 aumentaram progressivamente após a administração de LPS, com pico máximo após 6 horas. O PCI inibiu significativamente ($p < 0.01$) a liberação destas citocinas pró-inflamatórias induzidas pelo LPS (3h - 50,02% e 59,33%; 6h - 67,61% e 46,72%, para TNF-a e IL-1 respectivamente). O nível sérico de IL-10 não alterou significativamente após a administração de LPS, entretanto o PCI foi capaz de aumentar significativamente ($p < 0.01$) a liberação desta citocina, mesmo quando os animais foram tratados com LPS (3h - 107,28%; 6 h 52,20%). A dosagem sérica de nitrito aumentou progressivamente após a administração de LPS, com pico máximo de 3 a 6 horas. O PCI inibiu significativamente ($p < 0.01$) a produção de NO induzida por LPS (3h - 57,00%; 6h - 59,51%). **Discussão:** O PCI foi capaz de modular negativamente a RI sistêmica induzida por LPS através da inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF-a e IL-1), do aumento de citocina com atividade antiinflamatória (IL-10), bem como através da inibição da produção de NO. O esclarecimento através do qual o PCI apresenta este potente efeito sistêmico pode trazer importantes contribuições em situações clínicas onde a RI sistêmica é a principal responsável pelo aumento de morbidade e mortalidade. Apoio Financeiro: CAPES, CNPq.

06.108

Ação protetora da proteína anexina-A1 durante a endotoxemia induzida por lipopolissacarídeos. Cunha, E. E.; Oliani, S. M.; Damazo, A. S. ¹IBILCE-UNESP - Biologia

Introdução: Muitos efeitos das infecções bacterianas induzidas experimentalmente com lipopolissacarídeo (LPS) podem ser atribuídos a fatores liberados na inflamação, podendo resultar em coagulação, lesão tecidual e falência múltipla dos órgãos. Um dos mediadores endógenos ativos durante o processo inflamatório é a anexina-A1 (AnxA1)¹. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos do tratamento com o peptídeo N-terminal da AnxA1, Ac2-26, na inflamação pulmonar local e sistêmica induzida pelo LPS em camundongos. **Métodos:** Um grupo de animais foi pré-tratado com o peptídeo Ac2-26 (5 mg/kg, i.p.). Após, a endotoxemia foi induzida pela administração de LPS i.n. ou i.p. nos camundongos (1 mg/kg) e a análise quantitativa dos leucócitos circulantes no sangue periférico e no lavado bronco-alveolar (BAL) realizada em câmara de Neubauer. Os pulmões foram fixados (paraformaldeído a 4% e glutaraldeído a 0,5%) e incluídos em resina LRGold para análise histológica. A proteína AnxA1 endógena foi analisada pela reação de imunistoquímica e Western blotting. **Resultados:** A análise quantitativa dos leucócitos no sangue periférico e no BAL demonstrou que, após a administração i.n. do LPS, ocorreu aumento no número de leucócitos circulantes e transmigrados para a cavidade alveolar. Já no modelo de inflamação sistêmica pulmonar, observamos leucopenia no sangue periférico e alta adesão dos leucócitos nos capilares pulmonares. O pré-tratamento com o peptídeo Ac2-26 reduziu o processo inflamatório local e sistêmico inibindo a transmigração leucocitária para o pulmão. Entretanto, nossos resultados indicaram que, no modelo de inflamação sistêmica, o tratamento com o peptídeo Ac2-26 não inibiu a leucopenia. No modelo de inflamação local, a expressão da proteína AnxA1 pela imunistoquímica aumentou nos neutrófilos e nos monócitos e macrófagos alveolares nos grupos LPS após a indução do processo inflamatório. Na inflamação pulmonar sistêmica, a imunomarcagem dos leucócitos para a AnxA1 foi menor do que no grupo controle. Após a administração do peptídeo, a expressão da AnxA1 endógena foi maior nas fases iniciais da inflamação. No grupo LPS houve aumento da expressão da AnxA1 no pulmão, apresentando fosforilação da região N-terminal desta proteína. Contudo, o grupo tratado com o peptídeo Ac2-26 apresentou baixos níveis de expressão da proteína endógena no pulmão. **Discussão:** Os dados obtidos sugerem que o peptídeo Ac2-26 inibe o processo inflamatório local e sistêmico induzido pelo LPS, indicando que a AnxA1 é um importante regulador do processo inflamatório endotoxêmico, atuando na regulação da transmigração leucocitária, reduzindo o dano tecidual, o que pode favorecer a pesquisa de novas terapias farmacológicas. ¹Damazo et al., *Am J Pathol* 166, 1607, 2005. Apoio Financeiro: FAPESP

06.109

Atividade antiinflamatória e antinociceptiva de frações ativas da espécie *Leonurus sibiricus* L. Arakawa, T. Y.; Roman-Duarte, B.; Nazato, V. S.; Melo, R. S.; Silva, M. G.; Lopes, L. C.
¹UNISO – Farmácia

Na composição química de extratos de *Leonurus sibiricus* L. foram encontrados alcalóides como leonurina, leonuridina, estaquidrina, o polissacarídeo estaquiase, glicosídeos apolares, iridóides, ácido ursólico, saponinas triterpênicas, diterpenos (leosibirina, isoleosibirina, leoribicina) e flavonóides glicosídeos p-coumaril como a apigenina e a luteolina. O extrato diclorometano da espécie *L. sibiricus* L. tem potencial antinociceptivo como demonstrado em estudos anteriores por nosso grupo. Nesta fase da pesquisa pretendeu-se fracionar o extrato diclorometano e detectar a efetividade antinociceptiva e antiinflamatória tópica. Para o fracionamento do extrato diclorometano utilizou-se cromatografia em coluna (CC). Os pós da planta seca apresentou um teor de 6,47% de cinzas, 8 % polifenólicos totais e 0,122% de flavonóides, calculados em pirogalol e quercetina, respectivamente. O rendimento obtido do extrato de diclorometano foi de 6,17%. Na cromatografia em coluna, foram obtidas três sub-frações. Estas foram testadas para avaliar a atividade antinociceptiva por um modelo de dor inespecífico (modelo de contorção abdominal por ácido acético 1,2%, i.p) e para a atividade antiinflamatória tópica foi utilizado o modelo de edema de orelha (óleo de cróton 2.5% v/v em acetona). As contorções foram reduzidas após os tratamentos com F₁ (600 mg/kg/vo – 44,0%), F₂ e F₃ (300 mg/kg/vo – 58,2% e 90,9%), dipirona (200 mg/kg/ip – 47,7%) em relação a Salina (p < 0,0001). Houve redução significativa do edema de orelha após os tratamentos tópicos (1 e 10%, 20 µl/orelha), F₁ (21,9 e 58,3%), F₂ (38,2 e 47,7%), F₃ (25,9 e 45,8%), dexametasona 2% (76, 4%) em relação ao controle – acetona 70% (p < 0,0001). A atividade antiedematogênica tópica está presente nas três frações estudadas, no entanto a atividade antinociceptiva parece estar relacionada às frações mais polares. Considerando a possibilidade da presença de ácido ursólico e iridóides, neste extrato a atividade antiinflamatória poderia ser explicada pela presença de ambos sobre a cicloxigenase, no entanto os estudos prosseguem para avaliar atividade sinérgica e identificação dos compostos presentes em cada fração.

06.110

Estudo da atividade gastroprotetora de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. em modelos de úlcera aguda. Passos, F. F. B.¹; Fernandes, H. B.¹; Amaral, M. P. M.¹; Oliveira, I. S.¹; Costa, D. A.³; Chaves, M. H.⁴; Meneses Oliveira, R. de C.⁵; Oliveira, F. de A.⁶ ¹UFPI-NPPM-CCS; ³UFBP - Ciências Farmacêuticas; ⁴UFPI - Química; ⁵UFPI-NPPM-CCS - Biofísica; ⁶UFPI - Bioquímica e Farmacologia

Introdução: Estudos anteriores demonstram que o extrato etanólico de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam (EEZR) apresenta proteção em vários modelos de úlcera gástrica. O presente estudo tem por objetivo avaliar o efeito gastroprotetor do EEZR nos modelos de úlcera induzido por etanol_{abs} em camundongos e isquemia e reperfusão em ratos. **Métodos:** Camundongos Swiss albinos (25-30 g, n=8), fêmeas, em jejum, foram pré-tratadas v.o. com salina, EEZR (125, 250 e 500 mg/kg) ou N-acetilcisteína (NAC- 750 mg/kg, i.p.). Após 1 h dos tratamentos, os grupos receberam (v.o.) 0,2 mL de etanol_{abs}. Decorridos 30 min da administração do etanol os animais foram sacrificados, os estômagos retirados, abertos pela grande curvatura e analisados por planimetria (mm²). No modelo de úlcera por isquemia e reperfusão, ratos Wistar (180-200 g, n=8), de ambos os sexos, foram pré-tratados com salina, EEZR (250 ou 500 mg/kg) ou NAC (750 mg/kg). 1 h após, foram anestesiados com tiopental sódico (50 mg/kg) e submetidos ao clampeamento da artéria celiaca por 30 min, seguido de reperfusão por 1 h, sendo em seguida sacrificados e seus estômagos retirados e abertos pela grande curvatura para determinação da área de lesão (mm²). **Resultados e Discussão:** No modelo de lesões gástricas induzidas por etanol_{abs}, o pré-tratamento com EEZR nas doses de 125, 250 e 500 mg/kg e o NAC na dose 750 mg/kg reduziu significativamente (p<0,01) a área ulcerada em 12,70 ± 1,30 mm², 9,48 ± 1,92 mm², 10,42 ± 1,47 mm² e 7,11 ± 0,70 mm², respectivamente, quando comparado ao grupo salina (25,26 ± 1,84 mm²). O pré-tratamento com EEZR na dose de 500 mg/kg e NAC (droga padrão) também foi capaz de inibir de forma significativa (p<0,01) as ulcerações induzidas por isquemia reperfusão (10,28 ± 3,28 mm²) e (10,42 ± 1,43 mm²), respectivamente, quando comparado ao grupo salina (38,27 ± 3,72 mm²). Os resultados demonstram atividade gastroprotetora de EEZR nos modelos estudados, sugerindo uma provável ação antioxidante do extrato. Apoio Financeiro: UFPI/PROCAD/CAPES

06.111

Efeito protetor da interleucina-33 sobre a resposta inflamatória e alterações morfofuncionais da mucosite intestinal induzida por irinotecano (CPT-11) em camundongos. Freitas, H. C.¹; Lima-Júnior, R. C. P.¹; Medeiros, R. P.¹; Vale, M. L.¹; Brito, G. A. C.²; Liew, F. Y.³; Cunha, F. de Q.⁴; Souza, M. H. L. P.¹; Ribeiro, R. A.¹

¹UFC - Fisiologia e Farmacologia; ²UFC - Morfologia; ³University of Glasgow - Immunology; ⁴FMRP-USP

Introdução: A Mucosite Intestinal (MI) e a diarreia severas são efeitos colaterais frequentes (15-25%) e limitantes do tratamento do câncer de cólon com Irinotecano (CPT11). Recentemente, um novo membro da família da IL-1 foi descrito, a IL-33. Similarmente à IL-18, a IL-33 possui propriedades imunomodulatórias. Devido à incidência de MI e à participação de citocinas da família IL-1 em doenças inflamatórias, investigamos o papel da IL-33 na patogênese da MI induzida por CPT-11. **Métodos:** Camundongos BALB/c, 20-25g, machos, 2 meses de idade, foram divididos em grupos (n=4): **I:** BALB/c+salina (5mL/kg, i.p.); **II:** BALB/c+CPT-11 (60 mg/kg/4 dias, i.p.); **III:** BALB/c+IL-33 (1µg/animal/4 dias, i.v.); **IV:** BALB/c+CPT-11 (60 mg/kg/4 dias, i.p.)+IL-33 (1µg/animal/4 dias, i.v, 1h antes do CPT-11). No 5º dia analisou-se a diarreia por escores e coletou-se sangue para contagem de leucócitos (leucócitosx10³/mL) e, em seguida, os animais foram sacrificados para coleta do duodeno para análise da atividade de mieloperoxidase (MPO neutrófilos/mg tecido), análise morfométrica (razão vilo/crípta) e contratilidade *in vitro* de duodeno (%contração em relação ao KCl60mM). Os dados foram analisados com ANOVA/Student Newman Keul ou Kruskal Wallis/teste de Dunn. P<0,05 foi aceito. **Resultados:** CPT-11 induziu leucopenia em animais tratados ou não com IL-33 (2125 ± 423; 1733 ± 316) quando comparados aos grupos tratados apenas com IL-33 ou com salina, 7100 ± 706; 5100 ± 883, respectivamente (p<0,05). O CPT-11 aumentou significativamente (p<0,05) a atividade de MPO (10890 ± 2912), a contratilidade *in vitro* (203,3 ± 27,7), os escores de diarreia (2,5[2-3]) e reduziu a razão vilo/crípta (1,09 ± 0,06) em comparação com o grupo tratado apenas com salina (4646 ± 636; 90,6 ± 14,7; 0[0-0]; 2,01 ± 0,08), o que foi prevenido significativamente (p<0,05) com a administração de IL-33 (4646 ± 375; 157,5 ± 6,6; 1[0-2]; 1,37 ± 0,07) a despeito da injeção de CPT-11. **Conclusão:** Esses dados sugerem que a IL-33 possui uma importante ação protetora contra o desenvolvimento de MI induzida por CPT-11. Apoio Financeiro: CAPES/CNPq

06.112

Avaliação do efeito da proteína quimérica IL-13PE sobre a inflamação pulmonar induzida por sílica em camundongos. Ferreira, T. P. T.¹; Arantes, A. C. S. de¹; Garcia, C. S. N. B.²; Rocco, P. R. M.²; Hogaboam, C.⁴; Puri, R.⁵; Martins, M. A.¹; Silva, P. M. R. e¹ ¹FIOCRUZ - Fisiologia e Farmacodinâmica; ²IBCCF-UFRJ - Investigação pulmonar; ⁴University of Michigan Medical School, USA - Pathology; ⁵Center for Biologics Evaluation and Research, EUA

Introdução: A interleucina 13 (IL-13) tem sido apontada como um dos principais mediadores atuantes em processos de ativação de fibroblastos e indução de fibrose pulmonar, sendo portanto considerada como um alvo terapêutico importante. A silicose é uma doença pulmonar inflamatória crônica, de caráter ocupacional, caracterizada por uma intensa resposta fibrótica e granulomatosa. Com base nestas observações, neste estudo investigamos o efeito da administração curativa da proteína quimérica IL-13-PE38QQR (IL-13PE) sobre a fase crônica da silicose. **Metodologia:** Camundongos Swiss-Webster foram anestesiados e instilados com sílica (10 mg), por via intranasal, recebendo tratamento com IL-13PE (200 ng/dia) em dias alternados, no período entre 21º ao 28º dia pós-sílica. Foram avaliados o componente inflamatório, a deposição de colágeno e a área de granuloma através de técnica histológica incluindo coloração com H&E e Picro-sírius, ou quantificação de colágeno pelo método de Sircol. Os componentes de matriz fibronectina e laminina foram avaliados por imunohistoquímica. Citocinas e quimiocinas foram quantificadas por ELISA. A função pulmonar e resposta de hiperreatividade foram avaliadas através de pletismografia de corpo inteiro, pelo método invasivo. **Resultados:** Verificamos que o tratamento dos animais silicóticos com IL-13PE inibiu o componente inflamatório pulmonar e resposta granulomatosa atestado pela marcada diminuição no conteúdo de depósito de colágeno e redução na área de granuloma. Importante redução da expressão de fibronectina e laminina foi também observada. A quantificação de quimiocinas (MIP-1 α , MIP-2, TARC, RANTES, MDC) e citocina (TNF- α , IFN γ e TGF- β) revelou uma marcada inibição na produção destes mediadores na condição do tratamento com IL-13PE. De forma coerente, vimos que animais silicóticos tratados com a molécula apresentaram nítida reversão do quadro de aumento de resistência e elastância pulmonares, bem como da resposta de hiperreatividade ao agente broncoconstrictor metacolina. **Discussão:** Nossos resultados mostram que a IL-13PE foi eficaz em inibir de forma curativa vários dos componentes inflamatórios da fase crônica da silicose, incluindo infiltrado leucocitário, deposição de componentes de matriz extracelular e formação de granuloma, bem como comprometimento da função pulmonar, indicando que a IL-13PE coloca-se como uma estratégia terapêutica inovadora e extremamente promissora a ser adotada no caso de doenças pulmonares fibróticas de caráter restritivo como a silicose. Apoio Financeiro: PAPES4/FIOCRUZ, CNPq, FAPERJ, UNESCO.

06.113

Efeito do inibidor SP600125, de C-JUN NH₂terminal quinase (JNK) na inflamação pulmonar em camundongos silicóticos. Arantes, A. C. S. de¹; Ferreira, T. P. T.¹; Garcia, C. S. N. B.²; Rocco, P. R. M.²; Lagente, V.⁴; Cordeiro, R. S. B.¹; Martins, M. A.²; Silva, P. M. R. e² ¹FIOCRUZ - Fisiologia e Farmacodinâmica; ²IBCCF-UFRJ - Investigação pulmonar; ⁴Université des Rennes - Faculté de Pharmacie;

Introdução: A silicose é uma doença pulmonar crônica causada pela inalação prolongada de partículas de sílica livre e cristalina. O JNK é um dos membros do grupo de proteínas de sinalização denominado MAPK, cujo papel na resposta inflamatória é extensamente aceito na literatura. Contudo, o papel da JNK na resposta fibrótica ainda não está satisfatoriamente esclarecido. Neste estudo, investigamos o potencial efeito antifibrótico do inibidor de JNK SP600125 no modelo experimental de silicose murina. **Métodos:** Camundongos Swiss-Webster foram anestesiados e instilados intranasalmente com sílica (10 mg/50 µL) e as análises realizadas 28 dias após. Os animais receberam administração diária do inibidor de JNK SP600125 (5 mg/kg, v.o), durante 7 dias, iniciando-se 21 dias após a estimulação com sílica. A avaliação da mecânica pulmonar foi feita através de sistema invasivo de oclusão ao final da inspiração, sendo avaliadas a resistência e a elastância pulmonares. Outros parâmetros de análise incluíram: i) análise morfológica por meio de histologia clássica (hematoxilina & eosina/tricômico de gomori) e morfometria, ii) quantificação de colágeno por Sircol, iii) quantificação de citocinas e quimiocinas por ELISA. **Resultados:** Verificamos que os camundongos silicóticos apresentaram resposta inflamatória pulmonar caracterizada por um intenso infiltrado leucocitário, aumento na deposição do colágeno e extensa formação de granulomas quando comparados aos controles. Detectamos, ainda, elevação nos níveis de quimiocinas (KC e MCP-1) e citocinas (TGFβ e TNF-α,) no tecido pulmonar dos animais silicótico. A análise da mecânica pulmonar revelou um importante aumento da resistência (vias aéreas centrais e periféricas) e da elastância no caso dos animais silicóticos. O tratamento com SP600125 inibiu de forma significativa a resposta fibrótica granulomatosa, conforme atestado pela diminuição da fração de área de granuloma, e do quantitativo de colágeno nos pulmões silicóticos. A geração de quimiocinas/citocinas também foi reduzida pelo composto testado. De forma complementar, porém coerente, vimos que as alterações da função pulmonar (aumento de resistência e elastância) foram igualmente sensíveis ao tratamento com SP600125. **Discussão:** Nossos achados mostram que o inibidor de JNK SP600125 foi efetivo em suprimir a resposta fibrótica pulmonar em camundongos silicóticos, indicando que esta classe de drogas coloca-se como uma ferramenta terapêutica promissora para casos de doenças pulmonares crônicas de caráter fibrótico como a silicose. Apoio Financeiro: Suporte financeiro: PAPES4/FIOCRUZ, CNPq e FAPERJ.

06.114

Efeito do nimesulide no edema de pata induzido pela ETX de *E. coli* e carragenina em ratos. Dias Júnior, P. P.¹; Carvalho, T. B.¹; Rodrigues, L. A.²; Fracasso, J. F.³ ¹UNIFEB - Farmacologia; ²UNIFEB - Ciências Fisiológicas; ³UNESP-Araçatuba

Introdução: A Endotoxina (Etx) de *E. coli* e a carragenina (Carr) apresentam propriedades edematogênicas quando injetadas localmente, produzindo edema local pronunciado. O edema sendo um dos sinais da inflamação é produzido por fatores endógenos liberados em resposta à inflamação, sendo a Histamina e a Bradicinina os mais importantes. A avaliação do envolvimento destes mediadores no processo é importante, dado que a inflamação é uma ocorrência de incômodo e desconforto ao paciente. Neste estudo, avaliamos comparativamente os efeitos edematogênicos da Etx e da Carr, bem como a ação antiinflamatória do Nimesulide (Nim), no edema de pata em ratos. **Métodos:** Ratos Wistar (220-300 gramas), foram distribuídos em 5 animais/grupo que foram injetados por via intra-plantar (i. pl.), com salina (Sal), Etx ou Carr 100 µg/kg/pata veiculadas em 0,1 ml, na pata posterior direita. No Controle injetamos Sal (0,1 ml), nos grupos GI e GII, GII e GIV, Carr e Etx. Os animais foram pré-tratados com: GII - Sal; GIII - Nim [20 mg/kg] + Etx e GIV- Nim [20 mg/kg] + Carr. O Nim foi injetado por via intra-peritoneal 60 min. antes da injeção i.pl. de Etx e Carr. O edema foi medido com espessímetro (em mm) após 1; 2; e 4 hr, e indicado pelo aumento da espessura da pata injetada. Os valores estão apresentados como a média ± erro padrão da média (m±epm). As diferenças observadas nos grupos tratados e controle foram significativas (P < 0,05) pela Anova. **Resultados:** Valores de Edema – espessura da pata (mm): medidos em 1; 2; 4 e 24 horas após a injeção i. pl. de Carr: e Etx * P ≤ 0,05 (para n = 5 animais/grupo).

Tempo (horas)	Controle				Nimesulide			
	1	2	4	24	1	2	4	24
Sal	0,04±0,01	0,03±0,02	0,02±0,02	0,03±0,01	0,02±0,01	0,03±0,01	0,04±0,02	0,03±0,01
Carr	0,45±0,02	0,78±0,03	0,90±0,04	0,03±0,01	0,20±0,03	0,50±0,04	0,68±0,02	0,03±0,01
Etx	0,36±0,05	0,59±0,03	0,77±0,03	0,05±0,01	0,35±0,04	0,59±0,05	0,75±0,01	0,04±0,01

Discussão: Nossos resultados sugerem que os efeitos edematogênico da Carr, e da Etx são distintos e revertidos parcialmente pelo Nimesulide, sendo ele um agente analgésico/antiinflamatório classicamente empregado na clínica, na dose indicada neste modelo experimental. Apoio Financeiro: UNIFEB - Barretos/SP; FCFar – UNESP – Araraquara/SP

06.115
PRÊMIO INOVAÇÃO

06.116

Efeito do tratamento do laser de baixa potência, LED vermelho e LED infravermelho no edema induzido pelo veneno da serpente *Bothrops asper*. Moura, K. M. B.¹; Barbosa, A. M.²; Lima, C. J.³; Gutiérrez, J. M.⁴; Zamuner, S. R.¹ ¹UNIVAP - Fisiologia e Farmacologia; ²UNIVAP - Pesquisa e Desenvolvimento; ³UNIVAP - Instrumentação Optobiomédica; ⁴Universidade da Costa Rica - Instituto Clodomiro Picado

Introdução: Envenenamento causado por serpentes botrópicas induz alteração patológica local caracterizada por intensa reação inflamatória. O tratamento mais usado para acidentes ofídicos é a soroterapia com antiveneno específico. Porém, o antiveneno mostra-se ineficaz em reverter o efeito local induzido pelo veneno¹. Cada vez mais tem sido crescente o número de pesquisas na busca de alternativas para combater os efeitos locais causado por acidentes botrópicos. O objetivo do presente estudo foi investigar o uso das terapias laser e Light Emission Diode (LED) para reverter a formação de edema, causada pelo veneno de *Bothrops asper*.

Métodos: Camundongos swiss machos foram injetados com veneno de *B. asper* (2,5 µg/pata) no coxim plantar de camundongos. O edema foi avaliado por pletismografia (Plethysmometer Ugo Basile, Itália), nos tempos 15, 30 min., 1, 2, 4 e 6 h após a injeção do veneno. O aumento percentual podal foi expresso entre o aumento de volume da pata (direita/veneno) comparado com o volume da pata contralateral (controle/salina). Os animais foram tratados com laser (laser de baixa potência, semiconductor, λ 632,8 nm, potência de 100 mW, densidade de energia de 4 J/cm², tempo de irradiação de 1,55 s. e área of 1,2 cm²) e LEDs (infravermelho, potência de 120 mW, λ 945 nm, densidade de energia de 4 J/cm², tempo de irradiação de 38 s. e área of 1,2 cm²; LED vermelho potência de 110 mW, λ 635 nm, densidade de energia de 4 J/cm², tempo de irradiação de 41 s. e área of 1,2 cm²) nos tempos: imediatamente, 1 e 2 horas após a injeção do veneno. Os animais foram sacrificados 6 horas após a injeção do veneno. Ainda foi utilizado a dexametasona (0,4 mg/kg, i.p.) como controle antiinflamatório.

Resultados: A formação edematogênica induzida pelo veneno de *Bothrops asper* foi significativamente reduzida por todos os tratamentos utilizados: laser 58 %; LED infravermelho 50 %; LED vermelho 70,5 % e dexametasona 69,4 %, comparando com os grupos que receberam somente veneno. **Discussão:** Embora a soroterapia, seja a única abordagem terapêutica usada para tratar acidentes ofídicos, ela pouco neutraliza os efeitos locais¹. Várias alternativas têm sido propostas como substituto da soroterapia². Neste trabalho as terapias com fotobioestimulação com laser de baixa potência, LED infravermelho e LED vermelho foram capazes de reduzir o edema causado pelo veneno total da serpente *Bothrops asper*. 1.Camey, K. U.; Velarde, D. T.; Sanchez, E. F. *Toxicon*, 40(5): 9-501, 2002. 2.Biondo, R., et al., *Bioquimie* 85(10), 1017–1025, 2003. Apoio Financeiro: FVE - Fundação Valeparaibana de Ensino

06.117

Atividade antiinflamatória do extrato de *Blutaparon portulacoides* no edema induzido pelo veneno de *Bothrops jararacussu* e duas miotoxinas isoladas deste veneno. Pereira, I.¹; Barbosa, A. M.²; Salvador, M. J.³; Soares, A. M.⁴; Zamuner, S. R.¹ ¹UNIVAP - Fisiologia e Farmacologia; ²UNIVAP - Pesquisa e Desenvolvimento; ³UNICAMP - Fisiologia Vegetal; ⁴FCFRP - Análises Clínicas Toxicológicas e Bromatológicas

Introdução: O envenenamento causado por serpentes do gênero *Bothrops* resulta em grave reação inflamatória local, com formação de edema intenso. A soroterapia não é eficaz em neutralizar os efeitos locais. Estudos farmacológicos têm demonstrado que extratos e frações de plantas possuem atividade antiinflamatória, antiviral e antiofídica. No presente trabalho foi avaliado a atividade do extrato etanólico da planta de *Blutaparon portulacóides* (BP) sobre o edema induzido pelo veneno de *Bothrops jararacussu* (VBjssu) e duas miotoxinas isoladas desse veneno. **Material e Métodos:** Camundongos swiss machos foram injetados com veneno de VBjssu (5 µg/animal) ou miotoxinas I e II (10 µg/animal). O edema foi avaliado por pletismografia, nos tempos 15, 30 min., 1, 2, 4 e 6 h após a injeção intraplantar do veneno ou miotoxinas. O extrato de BP foi administrado por via intraperitoneal, 1 h antes do veneno ou miotoxinas na dose de 500 mg/kg. **Resultados:** O Bjsu e as miotoxinas I e II causaram um aumento na formação de edema, com pico 1 h após sua injeção, de 102 %, 89 % e 160 %, respectivamente. O BP inibiu significativamente o edema induzido pelo VBjssu em 29 % e as miotoxinas I e II em 40 % e 62 %, respectivamente. **Discussão:** Embora a soroterapia, seja a única abordagem terapêutica usada para tratar acidentes ofídicos, ela pouco neutraliza os efeitos locais. O uso de extratos de plantas⁽¹⁾ pode ser uma alternativa para o tratamento de picados. Neste trabalho o extrato etanólico de *Blutaparon portulacóides* foi capaz de inibir o edema causado pelo veneno e miotoxinas isolados da serpente *Bothrops jararacussu*. ¹. Biondo, R., Pereira, A. M. S., Marcussi, S., Pereira, P. S., França, S. C., Soares, A. M., 2003. *Bioquímie* 85 (10), 1017–1025. Apoio Financeiro: FVP - Fundação Vale Paraibana de Ensino

06.118

Análise da resposta de hiperreatividade pulmonar em camundongos silicóticos. Ciambarella, B. T.; Santos, T. P. O.; Almeida, G. S.; Arantes, A. C. S. de; Trentin, P. G.; Ferreira, T. P. T.; Martins, M. A.; Silva, P. M. R. e FIOCRUZ - Fisiologia e Farmacodinâmica

Introdução: A silicose é uma doença ocupacional causada pela inalação de poeira contendo partículas de sílica cristalina. Esta doença gera um intenso processo inflamatório levando à alteração da estrutura fisiológica do pulmão com formação de granulomas e conseqüente perda da função. Até o momento pouco se sabe sobre o fenômeno de hiperreatividade das vias aéreas pulmonar na condição da silicose. **Objetivo:** Avaliar a ocorrência de hiperreatividade pulmonar em associação com o quadro silicótico e verificar a potencial correlação deste fenômeno com a presença de infiltrado inflamatório (neutrófilos) e com a fibrose. **Métodos:** Camundongos Swiss-Webster foram instilados com sílica (1,25-10 mg) por via intranasal e as análises realizadas em tempos variando de 12 h a 28 dias pós-sílica. Função pulmonar (resistência e elastância) foi avaliada em pletismógrafo de corpo inteiro invasivo e a hiperreatividade através da aerolização do agente broncoconstrictor metacolina. Análise morfológica foi realizada através de coloração com H&E e por morfometria para quantificação das áreas de granuloma. A presença de neutrófilos foi avaliada pela quantificação da enzima mieloperoxidase (MPO). **Resultados:** Verificamos que a cinética de resposta dos animais frente à instilação da dose padrão de 10 mg de sílica determinou, em todos os tempos de análise, um aumento nos níveis basais de resistência e elastância pulmonar bem como uma resposta aumentada à metacolina, caracterizando, assim, um quadro de hiperreatividade pulmonar. Em paralelo, detectamos níveis aumentados de MPO nos pulmão silicóticos em comparação com os dos animais controles, com máximo sendo verificado em 7 dias. A área de granuloma mostrou evolução progressiva em conformidade com a evolução do quadro da doença, sendo máximo notado em 28 dias. Em outro grupo experimental, foram testadas diferentes doses de sílica (avaliação em 7 dias), quando foi observado que apenas as doses de 5 e 10 mg foram capazes de induzir resposta de hiperreatividade pulmonar em paralelo com o infiltrado de neutrófilos e resposta inicial de formação de granuloma. **Discussão:** Nossos dados mostram, de forma original, a existência de hiperreatividade pulmonar associada ao quadro silicótico, fenômeno este que se mostrou presente tanto na fase aguda como na fase crônica da doença. Considerando-se o predomínio de um componente inflamatório na fase aguda e de fibrose na fase crônica, podemos sugerir que a resposta de hiperreatividade pulmonar na silicose parece ser um processo plurimediado. Novos estudos se fazem necessários para melhor compreensão acerca dos mecanismos determinantes deste processo. Apoio Financeiro: PAPES4/FIOCRUZ, CNPq, FAPERJ e UNESCO.

06.119

Avaliação do efeito antiinflamatório da lidocaína sobre a resposta pulmonar aguda induzida por sílica em camundongos. Guedes, V. G.¹; Ferreira, T. P. T.¹; Jurgilas, P. B.¹; Costa, J. C. S.²; Cordeiro, R. S. B.¹; Silva, P. M. R. e¹; Martins, M. A.¹ ¹FIOCRUZ - Fisiologia e Farmacodinâmica; ²FIOCRUZ - Far-manguinhos

Introdução: Silicose é uma doença de caráter restritivo, ocasionada pela inalação de poeiras contendo partículas de sílica, que tem como principal característica intensa resposta inflamatória seguida por resposta fibrótica, e para a qual não há um tratamento efetivo. Neste trabalho investigamos o potencial efeito antiinflamatório da lidocaína sobre a fase aguda da silicose. **Métodos:** Camundongos Swiss-Webster foram anestesiados e instilados com sílica por via intranasal. O tratamento com lidocaína (1 e 2%) foi realizado através de aerolização, iniciando-se 6 h após a instilação da sílica e mantendo-se 1 vez ao dia por 7 dias consecutivos. Como parâmetros de análise consistiram: i) função pulmonar (resistência e elastância) avaliada por plestimografia de corpo inteiro invasiva (Buxco), ii) resposta de hiperreatividade pulmonar à aerolização do agente broncoconstrictor metacolina, iii) morfologia do tecido pulmonar através de técnicas histológicas clássicas e morfometria, iv) quantificação de fibras colágenas pela técnica de Sircol e v) presença de metaloproteinases de matriz (MMP) por zimografia. **Resultados:** Verificamos que animais silicóticos apresentaram níveis basais de resistência e elastância pulmonares elevados em comparação ao dos controles. A estimulação com o agente broncoconstrictor metacolina induziu clara resposta de hiperreatividade pulmonar, fenômeno este que se mostrou sensível ao tratamento com lidocaína nas duas doses testadas. A análise histológica revelou a presença de granulomas, que representa uma área de comprometimento pulmonar de $14,5\% \pm 1,4$ (média \pm EPM, n=6). Um aumento no conteúdo de fibras colágenas foi também evidenciado. Em paralelo, através de zimografia foi detectado aumento nos níveis/atividade das enzimas MMP-2 e MMP-9 no pulmão de camundongos silicóticos em comparação aos controles. O tratamento com lidocaína inibiu de forma acentuada os parâmetros inflamatórios e a resposta granulomatosa. Valores de área de granuloma de $3,2\% \pm 1,1$ (n=5, p< 0,05) e de $2,8\% \pm 0,8$ (n=6, p< 0,05) foram detectados nos animais silicóticos e tratados com lidocaína na doses de 1 e 2 %, respectivamente. **Discussão:** Em conjunto, nossos achados mostram que a lidocaína foi eficaz em inibir o componente inflamatório e as alterações da função pulmonar associados à fase aguda da resposta silicótica, dando suporte à proposição da lidocaína como agente antiinflamatório e indicando que esta atividade se aplica também, à condição de doenças de caráter inflamatório fibrótico como a silicose. Apoio Financeiro: PAPES 4, PDTIS/FIOCRUZ, CNPq, FAPERJ e UNESCO.

06.120

Inhibitory effects of crotoxin from *Crotalus durissus terrificus* snake venom on inflammatory events and participation of glucocorticoids in these effects. Moreira, V.¹; Souto, P.¹; Nascimento, N. G.¹; Camillo M. A. P.²; Teixeira, C. F. P.¹ ¹Instituto Butantan - Farmacologia; ²IPEN – Biotecnologia

Introduction: Crotoxin (CTX) from *Crotalus durissus terrificus* venom snake is a potent neurotoxin consisting of a weakly toxic phospholipase A₂ subunit and a non-enzymic, non-toxic subunit. It is recognized that CTX exerts immunosuppressive effects on humoral system of mice through stimulation of the hypothalamic-pituitary axis. However, the inhibitory effect of CTX on inflammatory processes, mainly on prostaglandin (PG) production by cyclooxygenases (COXs), and the regulation of endogenous glucocorticoids (GC) in these effects are still unknown. The objective of this study was to investigate the effect of CTX on the LPS-induced acute inflammatory reaction, studying COX-2 expression and PGE₂ production *in vivo* and *in vitro* as well as the influence of endogenous GC in CTX-induced effects. Moreover, the effect of CTX on carrageenan-induced paw oedema was investigated. **Methods:** Male Swiss mice were treated with CTX (5 µg/0.2 mL, s.c.) or its vehicle 2h before LPS (0.05 mg/kg, i.p.) or carrageenan (0.5% v/v, i.pl) injection. After 1.5h LPS injection, COX-2 expression was determined in peritoneal leukocytes by western blot (WB) and PGE₂ production was quantified in exudate by enzymatic immune assay (EIA). Mice paw oedema induced by carrageenan was measured from 1 up to 6h using a plethysmometer. Another group was treated with the GC antagonist RU384869 (0.6 mg/kg, i.p.) or vehicle, 1h before CTX treatment. *In vitro* assays were used resting peritoneal macrophages collected from naive mice and cultured in RPMI-1640. 1x10⁶ cells were pretreated with CTX (0.1, 1 or 10 µg/mL) or RPMI alone for 2h and subsequently incubated with 1 µg/mL of LPS for 8h, for determination of COX-2 expression and PGE₂ production. **Results:** Treatment with CTX reduced LPS-induced COX-2 expression and PGE₂ released by peritoneal leukocytes around 50 and 43 % (p<0.05), respectively. This treatment also reduced carrageenan-induced paw oedema around 37 and 50% (p<0.05). These effects of CTX LPS- and carrageenan-induced inflammatory events were not observed in animal pretreated with RU 38486. On the other hand, neither COX-2 expression nor PGE₂ released by isolated macrophages in culture were altered by preincubation with CTX. **Discussion:** CTX treatment promotes an inhibitory effect on LPS- and carrageenan-induced inflammatory events and endogenous GC mediates these effects.

06.121

Avaliação farmacológica *in vivo* de novos derivados *N*-acilidrazônicos pirimidínicos candidatos a protótipos de fármacos. Porto, P. I.¹; Lopes, A. B.²; Fraga, C. A. M.²; Barreiro, E. J.²; Miranda, A. L. P.^{2,1}UFRJ - Farmacologia; ²UFRJ - Farmácia - LASSBio

Introdução: O processo inflamatório pode ser desencadeado por diversos estímulos resultando na liberação do ácido araquidônico que é convertido em prostaglandinas e tromboxanos pela via das ciclooxigenases, ou em leucotrienos, lipoxinas pela via das lipoxigenases. Os antiinflamatórios não esteroidais têm seu mecanismo de ação atribuído a diminuição da biosíntese de prostaglandinas pela inibição direta, reversível ou irreversível, da ciclooxigenase. Diante das atividades farmacológicas apresentadas por *N*-acilidrazonas funcionalizadas (Fraga e Barreiro, *Curr Med Chem*, 2006), uma nova série de compostos *N*-acilidrazônicos pirimidínicos foi planejada utilizando ferramenta de bioisosterismo não-clássico de abertura de anel. Este trabalho tem por objetivo investigar o perfil farmacológico desta série.

Metodologia: A atividade antiedematogênica da série foi avaliada pelo modelo de edema de pata de rato induzido por carragenina seguindo o seguinte protocolo: Ratos Wistar pesando 120 a 180 gramas foram tratados com a substância LASSBio a 300 mmol/kg por via oral, após 1 hora foram injetados via intraplantar 100 µl de carragenina 1% e 100 µl de salina (NaCl 0,9%) na pata contralateral. Os volumes das patas foram medidos 3 horas após e o edema consiste na diferença entre os volumes da pata com carragenina e a pata com salina em µl. Para avaliar a atividade analgésica foi empregado o modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético, onde camundongos suíços pesando 18 a 21 gramas foram tratados com a substância LASSBio a 100 mmol/kg por via oral, após 1 hora o ácido acético foi injetado via i.p. na proporção de 0,1 µl/20 g de animal. O número de contorções foi contado e comparado com o grupo controle. Em ambos experimentos foi utilizada goma arábica 5% como veículo. **Resultados:** Quinze compostos da série foram ativos significativamente no modelo de edema de pata de rato induzido por carragenina. Destacamos as atividades observadas para LASSBio 1081, LASSBio 1088, LASSBio 1089, LASSBio 1120 e LASSBio 1121 que inibiram a formação do edema em 52%*, 47%*, 48%*, 43%*, 42%*, respectivamente. Estes compostos apresentaram melhor atividade antiedematogênica que o celecoxibe (30%), empregado na mesma dose. No ensaio de contorção destacamos a inibição significativa apresentada por LASSBio 1278 (60%*), LASSBio 1277 (44%*) e 1083 (54%*). Os demais compostos apresentaram inibição na ordem de 27-37%. Os compostos com destacadas atividades nos modelos foram selecionados para investigação quanto à potência e eficácia analgésica e antiinflamatória. **Conclusão:** Os resultados encontrados nesta fase de triagem farmacológica apresentam novo padrão estrutural associado à *N*-acilidrazona com atividade biológica *in vivo*, fortalecendo o caráter farmacofórico da *N*-acilidrazona como antiinflamatório e analgésico. Estudos sobre possível mecanismo das atividades observadas estão em andamento.

06.122

Functional analysis of LPS-sensing machinery on rat pinealocytes - immunolocalization of constitutive toll-like receptor 4 (TLR4). Armelin, M. A.¹; Fernandes, P. A. C. M.¹; Cecon, E.¹; Tamura, E. K.¹; Queiroz, D. B. C.²; Honda, L.²; Avellar, M. C. W.²; Markus, R. P.¹; Ferreira, Z. S.¹ ¹IB-USP - Fisiologia; ²UNIFESP - Farmacologia

Introduction: The pineal gland, one important controller in the temporal organization of vertebrates, is an integral player of the defense system, as it expresses NF κ B, a two-protein transcriptional complex activated in response to LPS, among others. Toll-like receptor 4 (TLR4) is considered to be central in conveying LPS signaling which induces expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and subsequent nitric oxide (NO) formation. An attempt has been made to demonstrate the expression of TLR4 in the rat pineals as well as the characterization of functional response and the transduction pathway following LPS challenge. **Methods:** Male or female Wistar rats (1-2 months) were used. Conjugated-LPS Alexa Fluor 594, *E. coli* (1 mg/ml, 2h) were used in pineals cryosections (8mm) from perfused animals (Lana's fixative, 4% PAF, 15min) followed by fixation (4% PAF, 30min). For immunohistochemistry, the pineals cryosections were used with an antibody against rat TLR4, being the negative control performed in the absence of primary antibody. Total RNA was extracted from control pineals and used in RT-PCR with specific primers against *Tlr4* transcripts and housekeeping gene *Gapdh* (internal control). Pinealocytes were obtained by trypsinization followed by mechanical dispersion. NO production was measured by confocal microscopy in cells loaded with the fluorescent dye DAR-4M-AM (5 μ M, 30min, 37°C, 5%CO₂). NF κ B in nuclear extracts of pinealocytes challenged with LPS (1 mg/ml, 15min) was assayed by EMSA. **Results:** Fluorescently conjugated LPS revealed LPS binding on pinealocytes. RT-PCR revealed specific constitutive *Tlr4* mRNA levels in rat pineals. Immunohistochemistry (n=4) indicated TLR4-positive and -negative immunostaining in the nuclear and cytoplasmic compartments of cells. All TLR4-positive immunostaining was significantly decreased when experiments were performed in the absence of the primary antibody. Rat pinealocytes answered to an *in vitro* treatment with LPS with changes in the NO production. In LPS-treated pinealocytes (1 mg/ml) a marked increase in NO production was time- and concentration-dependent manner. The maximal production peaks at 2h stimulation (100.58 \pm 6.53 % basal, n=70-92 cells, 4 experiments) following by a decline to basal levels at 4~6 h. LPS (0.1–10 mg/ml) induced NO production ranging from 65.3 \pm 12.3 to 167.0 \pm 26.4 % basal (n=56-84 cells). This stimulatory effect was fully abolished in the presence of L-NAME (0.1mM, 30min before, n=32 cells). An increase in nuclear translocation of NF κ B was observed in LPS challenged cells. **Conclusion:** Our data show constitutive expression of mRNA and protein TLR4 in rat pineals. These cells are instrumented for answering to LPS challenge through TLR4-induced NF κ B pathway. In addition we observed that this stimulation induces significant production of NO. These data corroborates to the hypothesis of an immune-pineal-axis. Apoio Financeiro: FAPESP, CAPES, CNPq.

06.123

Papel dos mastócitos na resposta inflamatória induzida pelo veneno de *Bothrops moojeni*. Sampaio, M. C.; Nascimento, N. G.; Fernandes, C. M.; Teixeira, C. F. P. Instituto Butantan – Farmacologia

O veneno da serpente *Bothrops moojeni* (VBm) causa uma reação inflamatória intensa no local de sua picada. As células residentes possuem um importante papel na resposta inflamatória, dentre eles, os mastócitos (MCs). Essas células, após sua ativação, liberam uma grande quantidade de mediadores inflamatórios pré-estocados em grânulos citoplasmáticos e são reconhecidos como a primeira linha de ativação da resposta inflamatória. O objetivo deste estudo foi avaliar o papel dos mastócitos no desencadeamento do edema e do influxo de leucócitos induzidos pelo veneno de *Bothrops moojeni* (VBm), em camundongos. **Métodos:** Camundongos Swiss machos (18-20 g) receberam injeção intraperitoneal (i.p.) de cromoglicato de sódio (30 mg/kg), inibidor da desgranulação de mastócitos, ou de seu veículo (controle), 30min antes da injeção intraplantar (i.pl.) de salina apirogênica, na pata ipsilateral ou VBm (1 µg), na pata contralateral. O edema foi avaliado por pletismografia, desde os 15min até 24h após a injeção do veneno. Para avaliar o influxo de leucócitos, um grupo de animais recebeu injeção intravenosa (i.v.) de cromoglicato (25 mg/kg) ou seu veículo, 30min antes da injeção i.p. do VBm (5 µg/animal) ou de salina apirogênica (controle). O influxo de leucócitos para a cavidade peritoneal foi avaliado no lavado peritoneal 6h após injeção do veneno. O número de leucócitos totais foi determinado em câmara de Neubauer, após diluição em solução de Turk (1:20, v/v). A contagem diferencial foi realizada em microscopia de luz, após coloração de esfregaços celulares com Giemsa. **Resultados:** O pré-tratamento dos animais com cromoglicato de sódio causou uma redução significativa do edema de pata induzido pelo VBm, desde 15 até 360min após a sua injeção, quando comparado aos controles. Este tratamento aboliu o influxo de leucócitos polimorfonucleares e mononucleares, induzido pelo VBm, no período de maior influxo celular (6^ah), quando comparado aos controles. **Discussão:** Estes dados demonstram que os MCs são células importantes para o desencadeamento da resposta inflamatória induzida pelo veneno de *B. moojeni*. Estas células contribuem, de forma significativa, para o desenvolvimento do edema e parecem ser fundamentais para o recrutamento leucocitário. Apoio Financeiro: FAPESP e CNPq.

06.124
PRÊMIO INOVAÇÃO