

MOIZÉ, V.; DEULOFEU, R.; TORRES, E.; OSABA, J.M.; VIDAL, J. Nutritional intake and prevalence of nutritional deficiencies prior to surgery in a spanish morbidly obese population. *Obesity Surgery*, v. 21, 2011.

CAHILL, E.; SHAHIDI, M.; SHEA, J.; WADDEN, D.; GULLIVER, W.; RANDELL, E.; VASDEV, S.; SUN, G. High Dietary Magnesium Intake Is Associated with Low Insulin Resistance in the Newfoundland Population. *Plos One*, v.8, n.3, 2013.

JARVANDI, S.; GOUGEON, R.; BADER, A.; DASGUPTA, K. Differences in food intake among obese and nonobese women and men with Type 2 Diabetes. *Journal of the American College of Nutrition*, v. 30, n.4, 2011.

MOIZÉ, V.; DEULOFEU, R.; TORRES, E.; OSABA, J.M.; VIDAL, J. Nutritional intake and prevalence of nutritional deficiencies prior to surgery in a spanish morbidly obese population. *Obesity Surgery*, v. 21, 2011.

O ENVOLVIMENTO DO C-TERMINUS DA PROTEÍNA S100A9 NA ANGIOGÊNESE, FORMAÇÃO DE TUBOS E PROGRESSÃO TUMORAL

MORAES, N.F.¹; MELO, R.L.²; SAMPAIO, S.C.¹; GIORGI, R¹

¹Laboratório de Fisiopatologia, Instituto Butantan, Brasil

²Laboratório de Proteômica Funcional, Instituto Butantan, Brasil

Introdução: Foi demonstrado que tanto a proteína S100A9 inteira, quanto o peptídeo sintético idêntico à porção C-terminal dessa proteína murina (pS100A9m) induzem efeito antinociceptivo em modelos de dor inflamatória [1]. Ainda, o pS100A9m inibe as funções de células peritoneais aderentes de camundongo [2; 3], células estas cruciais na interação entre as células tumorais e as células estromais no microambiente tumoral. O crescimento do tumor não é dependente apenas das células tumorais, mas às interações entre essas células, matriz extracelular e células do estroma, resultando em metástase [4]. Foi demonstrado que o complexo S100A8/A9 tem sido constantemente associado à malignidade [5]. Ainda, ensaios realizados *in vitro* demonstraram que o complexo S100A8/A9 em altas concentrações 20–250µg/ml (aproximadamente 1–10µM) exibe propriedades inibitórias sobre o crescimento de diferentes tipos de células tumorais de camundongos e humanas, além de promover a citotoxicidade e apoptose destas células [6]. Apesar dessas evidências, até o momento ainda não foi investigado o efeito do pS100A9m sobre a progressão tumoral e angiogênese. Portanto, o objetivo do presente estudo foi a avaliação do efeito *in vitro* do peptídeo da S100A9m em eventos envolvidos na angiogênese e crescimento tumoral. **Material e métodos:**

Proliferação: 5x10⁴ células endoteliais tímicas (tEnd.1) foram incubadas por 1h com meio RPMI ou com pS100A9m (0,585; 1,17; 2,35; 4,7 ou 9,4µM/poço). Depois, as células foram incubadas por 24h com RPMI, coradas com azul de Tripán e contadas em câmara de Neubauer. As células de tumor de Walker 256 (LLC) foram tratadas com o pS100A9m nas concentrações de 1,17; 2,35 ou 4,7µM/poço nas mesmas condições. **Migração (wound healing):** 1x10⁶ células tEnd.1 foram plaqueadas em laminulas sensibilizadas com colágeno tipo I e após sua confluência foi realizada a interrupção da monocamada celular. As células foram incubadas com RPMI ou com o pS100A9m nas mesmas concentrações mencionadas acima por 1h. Em seguida, incubadas apenas com RPMI 1% por 24h. Células migradas para o espaço vazio foram contadas em microscopia de luz. **Adesão:** Placas sensibilizadas com fibronectina-3µg/poço, colágeno tipo I-10µg/poço ou laminina-10µg/poço foram incubadas por 1h com BSA 1%. Células tEnd.1 (1x10⁵), pré-tratadas ou não por 1h com pS100A9m (0,585; 1,17; 2,35 ou 4,7µM/poço), foram aderidas por 1h às placas. Depois, foram incubadas com MTT por 3h e com SDS por 18h e a adesão avaliada por ELISA. **Formação de tubos:** Placas polimerizadas com Matrigel foram incubadas por até 6h com 2,5x10⁴ células tEnd.1, pré-tratadas ou não por 1h com o pS100A9m (2,35 ou 4,7µM/poço). Em outro experimento, o pS100A9m permaneceu no ensaio por todo o período da formação dos tubos.

As formações tubulares foram fotografadas em microscopia de luz e contadas.

Resultados: Ensaio de proliferação: As concentrações de 0,585; 1,17; 2,35 ou 4,7µM/poço do pS100A9m foram capazes de inibir a proliferação de tEnd.1, quando comparadas ao grupo controle. Suas porcentagens de inibição foram 51%, 36%, 56% e 43%, respectivamente. Já a concentração de 9,4µM/poço do peptídeo não alterou a proliferação das células endoteliais - Figura 1. Em relação à proliferação de células LLC, o pS100A9m inibiu esse parâmetro nas concentrações de 1,17; 2,35 ou 4,7µM/poço, sendo as porcentagens de inibição 27,5%, 34% e 33%, respectivamente - Figura 2.

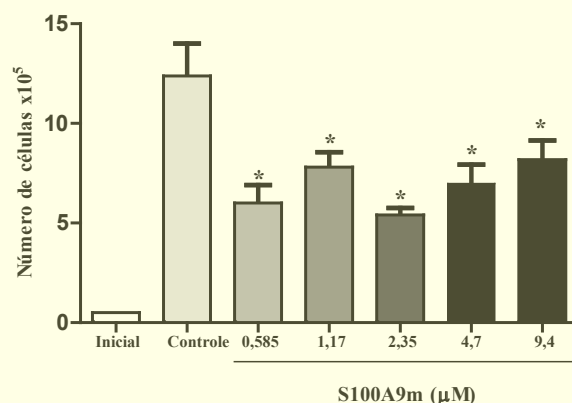


Figura 1 - Efeito do pS100A9m nas concentrações de 0,585; 1,17; 2,35; 4,7 ou 9,4µM/poço sobre a proliferação de 5x10⁴ células endoteliais tímicas (tEnd.1). *p<0,05 em relação ao grupo controle

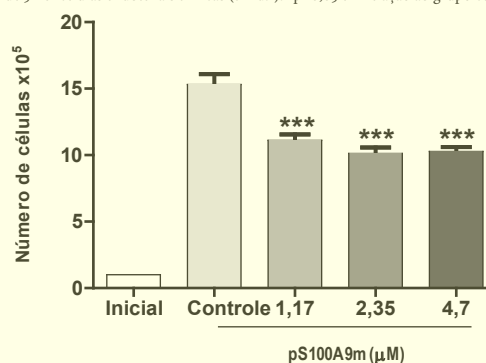


Figura 2 - Efeito do pS100A9m nas concentrações de 1,17; 2,35 ou 4,7µM/poço sobre a proliferação de 5x10⁴ células de tumor de Walker 256 (LLC). ***p<0,001 em relação ao grupo controle

Ensaio de wound healing: Com relação à migração das células endoteliais, conforme demonstrado na Figura 3A, foi observada uma ação inibitória do pS100A9m nas concentrações de 0,585µM/poço (25%); 1,17µM/poço (23%); 2,35µM/poço (37%); 4,7µM/poço (21%) ou 9,4µM/poço (28%), quando comparado com o controle. A concentração de 2,35µM/poço induziu efeito inibitório estatisticamente diferente das outras concentrações do pS100A9m avaliadas. As Figuras 3B, 3C e 3D são fotomicrografias representativas das culturas celulares utilizadas para avaliar a migração de células tEnd.1 pelo método do *wound healing*. A Figura 3B corresponde ao tempo 0, período em que a monocamada foi interrompida. A Figura 3C corresponde ao grupo controle, células incubadas apenas com meio de cultura, em que foi observada a migração das células endoteliais tímicas para o campo vazio 24 horas após a interrupção da monocamada. A Figura 3D representa o grupo tratado com o pS100A9m (2,35µM/poço) por 1 hora após a interrupção da monocamada. Após 24 horas deste procedimento, foi observada uma inibição da migração das células endoteliais para o campo vazio, em comparação com grupo controle (representado na figura 3C).

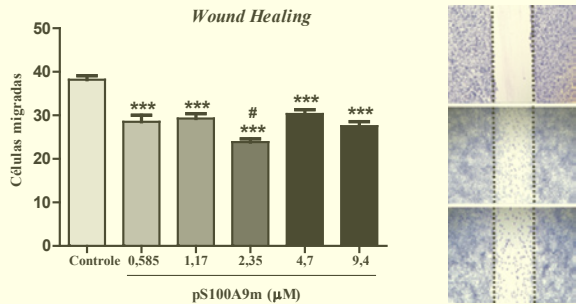


Figura 3 - Efeito do pS100A9m sobre a migração de células endoteliais tEnd.1 pelo modelo do wound healing. Figura 3A - O pS100A9m nas concentrações de 0,585; 1,17; 2,35; 4,7 ou 9,4µM/poço foi incubado com 1x10⁶ células endoteliais tímicas (tEnd.1) e a avaliação das células migradas foi realizada 24h após a interrupção da monocamada celular. ***p<0,001 em relação ao grupo controle. #p<0,05em relação às demais concentrações do pS100A9m. Figura 3B - fotomicrografia correspondente ao momento em que a monocamada foi interrompida. Figura 3C - fotomicrografia obtida de células endoteliais incubadas apenas com meio de cultura e migradas para o campo vazio 24h após a interrupção da monocamada. Figura 3D - fotomicrografia obtida 24h após a interrupção da monocamada referente ao grupo tratado com o pS100A9m (2,35µM/poço)

Ensaio de adesão: Todas as concentrações do peptídeo utilizadas (0,585; 1,17; 2,35; 4,7µM/poço) diminuíram a adesividade das células tEnd.1 à fibronectina e ao colágeno tipo I. Além disso, baseado nos resultados obtidos até o momento, para a adesão das tEnd.1 à laminina foi avaliada apenas a concentração de 2,35µM/poço do pS100A9m, o qual induziu uma inibição de 22% deste parâmetro em comparação com o grupo controle (dados não mostrados). Ensaio de formação de tubos: O pré-tratamento das células endoteliais tímicas com o pS100A9m, nas duas concentrações utilizadas, inibiu a formação de tubos observada em Matrigel quando comparado com o grupo controle, células tEnd.1 tratadas apenas com meio de cultura - Figura 4A. Este resultado também foi observado quando o peptídeo foi incubado concomitante às células tEnd.1 durante a formação de tubos em Matrigel - Figura 4B. As Figuras 4C e 4D são fotomicrografias representativas dos vasos formados em estrutura 3D. A Figura 4C representa o grupo controle, tratado apenas com meio de cultura, em que é observado um grande número de formações tubulares. Figura 4D representa o grupo em que as tEnd.1 foram pré-tratadas com o pS100A9m (2,35µM/poço), demonstrando uma redução das estruturas tubulares.

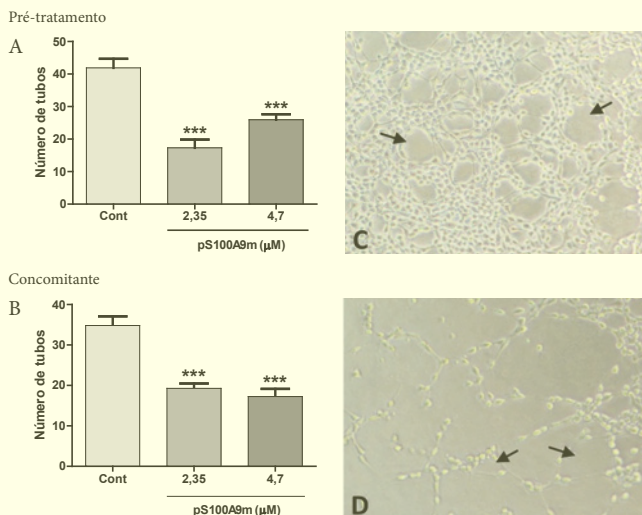


Figura 4 - Efeito do pS100A9m sobre a formação de tubos pelas células endoteliais tEnd.1. Figura 4A - 2,5x10⁴ células endoteliais tímicas foram pré-tratadas com pS100A9m nas concentrações de 2,35 ou 4,7µM/poço por 1h. Em seguida, as tEnd.1 foram adicionadas ao Matrigel para a formação de tubos por um período de no máximo 6hs. Figura 4B - representam os dados obtidos quando o pS100A9m, nas mesmas concentrações, foi incubado concomitante as tEnd.1 durante todo o período de formação de tubos. ***p<0,001 em relação ao grupo controle. Figura 4C - fotomicrografia representativa das formações tubulares do grupo controle. Figura 4D - fotomicrografia obtida de vasos formados em estrutura 3D de células endoteliais tímicas pré-tratadas com 2,35µM/poço do pS100A9m. Indicam formações de tubos

Conclusão: Os resultados aqui apresentados, referentes aos estudos com as células endoteliais tímicas (tEnd.1), demonstraram que o pS100A9m inibe os eventos *in vitro* envolvidos na angiogênese, tais como proliferação, migração e adesão à componentes de matriz extracelular, bem como a formação de novos vasos em modelo 3D de Matrigel. Esses resultados sugerem que além de inibir as funções de células inflamatórias, o peptídeo do C-terminal da S100A9 murina tem a capacidade de modular a neovascularização, a qual é fundamental para o crescimento do tumor e metástase. Ainda, o estudo preliminar sobre o efeito do pS100A9m nas células tumorais da linhagem LLC Walker 256 mostrou uma inibição da proliferação celular, sugerindo que o peptídeo também é capaz de interferir com a progressão tumoral. Em conjunto, os dados obtidos até o momento evidenciam, pela primeira vez, que o pS100A9m é um importante instrumento para a compreensão e controle da fisiopatologia do processo tumoral. **Agradecimentos:** Ao apoio financeiro da FAPESP (Processos: 2012/51241-5 e 2013/01295-4) e CNPq (Processo: 830619/1999-2).

Referências

Giorgi, R.; Pagano, R. L.; Dias, M. A.; Aguiar-Passeti, T.; Sorg, C.; Mariano, M., Antinociceptive effect of the calcium-binding protein MRP-14 and the role played by neutrophils on the control of inflammatory pain. *J Leukoc Biol*, 64: 214-20, 1998.

Pagano, R. L.; Sampaio, S. C.; Juliano, L.; Juliano, M. A.; Giorgi, R., The C-terminus of murine S100A9 inhibits spreading and phagocytic activity of adherent peritoneal cells, *Inflammation Research*, 54: 204-210, 2005.

Pagano, R. L.; Sampaio, S. C.; Juliano, L.; Juliano, M. A.; Giorgi, R., Involvement of proteinase-activated receptors 1 and 2 in spreading and phagocytosis by murine adherent peritoneal cells: Modulation by the C-terminus of S100A9 protein. *European J. of Pharmacology*, 628: 240-46, 2009.

Weis, S. M. e Cheresh, D. A. av integrins in angiogenesis and câncer. *Cold Spring Harb Perspect Med*. doi. 10.1101, 2011, revisão.

Heinzmann, C. W.; Fritz, G.; Schäfer, B. W., S100 proteins: structure, functions and pathology, *Medline*, 7:d1356-68, 2002.

Ghavami, S.; Rashedi, I.; Dattilo, B. M.; Eshraghi, M.; Chazin, W. J.; Hashemi, M.; Wesselborg, S.; Kerkhoff, C.; Los, M., S100A8/A9 at low concentration promotes tumor cell growth via RAGE ligation and MAP kinase-dependent pathway. *Journal of Leukocyte Biology*, 83, 6: 1484-1492, 2008.

PAPEL DA INSULINA NA VIGÊNCIA DO REMODELAMENTO DA ASMA EM CAMUNDONGOS DIABÉTICOS E SADIOS FERREIRA, S.S.1; NUNES, F.P.B.1; MARTINS J.O.1

¹Laboratório de Imunoendocrinologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo. São Paulo –SP, Brasil. Email: sabrinaserreira@usp.br

Introdução: A asma, doença inflamatória crônica das vias aéreas, envolve a participação de várias células, citocinas e mediadores inflamatórios em que a fase inicial é completamente diferente da fase tardia. Esta associada com linfócito Th2 e secreção de IgE [1,2,3]. *Diabetes mellitus* (DM) tipo 1 é considerada uma doença autoimune que resulta na destruição das células beta pancreáticas [4,5]. A asma e o diabetes são doenças comuns. Dados sugerem que a resposta imune é prejudicada em indivíduos diabéticos [6]. No entanto, existe uma correlação negativa entre asma e DM. A coexistência das duas patologias em um mesmo indivíduo é incomum, fato não esperado levando-se em conta a alta incidência das doenças isoladas na população geral [6,7].