

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 1x10<sup>6</sup> 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.

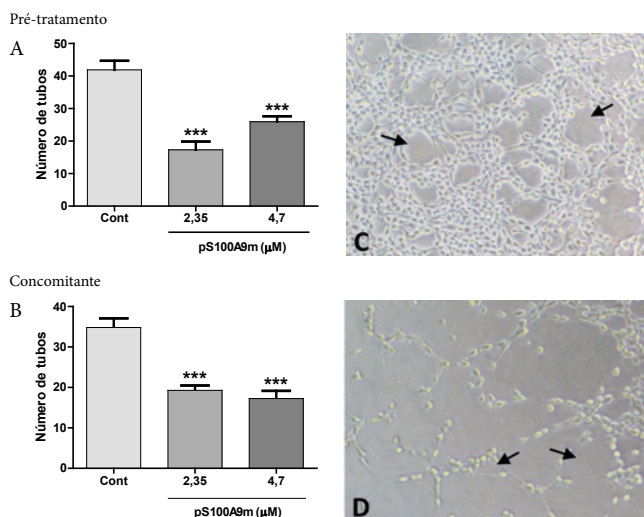


Figura 4 - Efeito do pS100A9m sobre a formação de tubos pelas células endoteliais tEnd.1. Figura 4A - 2,5x10<sup>4</sup> células endoteliais tímicas foram pré-tratadas com pS100A9m nas concentrações de 2,35 ou 4,7µM/poço por 1h. Em seguida, as tEnd.1 foram adicionadas ao Matrigel para o formação de tubos 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].

Aspectos diversos desta associação já foram descritos: o desencadeamento de DM, em pacientes previamente asmáticos, determina uma melhora do quadro asmático; o tratamento de paciente diabético com insulina agrava a asma; na maioria dos casos em que ocorre a associação, a gravidade das duas doenças é leve. Em suma, asma e diabetes parecem apresentar certo tipo de antagonismo [8,9]. Estudos, utilizando modelo de inflamação pulmonar na fase inicial, revelaram que a insulina modula a produção/liberação de citocinas como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , além de expressão de P e E-selectina, e também a migração de neutrófilos no pulmão durante a fase inicial da reação inflamatória alérgica [10]. Portanto o presente trabalho foi delineado para avaliar o papel da insulina na vigência da fase tardia da inflamação alérgica pulmonar em camundongos diabéticos e saudáveis. **Material e métodos:** Foram utilizados camundongos machos BALB/C (CEUA/FCF/340), (8-12 semanas). Para indução de DM os animais receberam injeção endovenosa de aloxana (50mg/kg), já os animais controle receberam a injeção de solução salina pela mesma via. Para indução de asma, os animais foram sensibilizados, dez dias após a injeção de aloxana ou salina com uma injeção intraperitoneal de ovalbumina (OVA) e hidróxido de alumínio (OVA 20 $\mu$ g + 2mg de Al(OH)<sub>3</sub>, volume final de 0,2 mL em PBS) e receberam uma dose reforço após 12 dias. A partir do 28º dia, os animais receberam desafios consecutivos durante sete dias. Inicialmente foi realizada uma cinética para avaliar em diferentes intervalos de tempo (1h, 2h, 3h, 6h, 8h e 12h) a redução da glicemia após o tratamento com a insulina NPH. A partir da cinética, o tratamento com insulina seguiu dois protocolos diferentes: 1) insulina (2 UI, s.c.) oito horas antes do experimento ou 2) insulina 12 horas (2 UI, s.c., as 19h) e uma hora (1 UI s.c., as 7h) antes de cada desafio. Após 24h do último desafio, ou seja, no 36º dia, foram realizadas: a) contagem total e diferencial de células no lavado broncoalveolar (LBA); b) contagem total e diferencial de células do sangue periférico, c) análise morfológica do parênquima pulmonar (H/E), d) análise da deposição em vias aéreas de colágeno, por Tricômico de Masson e, e) análise da deposição de muco no interior dos bronquíolos por periódico de Schiff (PAS). **Resultados:** No presente trabalho, os experimentos realizados com camundongos machos da linhagem BALB/C, foi observado que a administração endovenosa de aloxana (60mg/kg), após dez dias e 36 dias, exibiu características do estado insulino-pênico: perda de peso corporal e concentrações plasmáticas elevadas de glicose (>300 mg/dL). No mesmo período, o grupo controle apresentou normoglicemia (100-170 mg/dL), bem como ganho de peso corporal (Figura 1). Na contagem total e diferencial de LBA. O grupo OVA+OVA exibiu um aumento de números de leucócitos comparado ao grupo OVA+SAL. Os grupos OVA+OVA e OVA+OVA+INS<sub>1</sub> apresentaram cerca de 25% de eosinófilos. O grupo ALO+SAL apresentou uma diminuição de leucócitos quando comparado com o grupo OVA+SAL. O grupo ALO+OVA+INS<sub>1</sub> apresentou um aumento de número de leucócitos quando comparado ao grupo ALO+OVA. O grupo ALO+OVA+INS<sub>14</sub> apresentou cerca de 7% de eosinófilos presentes no LBA (Figura 2A). Já no leucograma, aparentemente o número total de células foi similar em todos os grupos, mas o grupo OVA+OVA apresentou aproximadamente 34% de eosinófilos e o grupo ALO+OVA+INS<sub>1</sub> apresentou cerca de 10% de eosinófilos sugerindo a migração desses eosinófilos para o tecido (Figura 2B). Na morfologia, com coloração de H/E os grupos OVA+SAL, ALO+SAL, ALO+OVA e ALO+OVA+INS<sub>1</sub> não exibiram inflamação ou anormalidades estruturais no pulmão. Já o grupo ALO+OVA+INS<sub>1</sub>, com uma única dose de insulina NPH, apresentou presença de leucócitos polimorfonucleares dentro dos vasos, corroborando com os resultados do leucograma, mostrando que as células tendem a migrar para o tecido. Os grupos ALO+OVA+INS<sub>14</sub>, exibiram leucócitos polimorfonucleares no tecido, corroborando com os resultados de LBA (Figura 3). Na deposição de colágeno, foi constatado que uma única dose de insulina não foi capaz de restaurar os níveis de deposição de colágeno. Já 14 doses consecutivas, foram capazes de restaurar essa deposição de colágeno ao redor das vias aéreas

(Figura 4A). Na produção de muco também foi observado que uma única dose de insulina não foi capaz de restaurar a produção de muco, mas 14 doses consecutivas foram capazes de restaurar essa deposição de muco dentro das vias aéreas (Figura 4B).

Tabela 1 - Cinética da insulina em animais diabéticos e asmáticos

Animais	Glicemia Antes da insulina	Glicemia 1h depois da insulina	Glicemia 2h depois da insulina	Glicemia 3h depois da insulina	Glicemia 6h depois da insulina	Glicemia 8h depois da insulina
Diabético	500±19	285±38	372±20	342±95	501±44	568±15
Asmático	149±11	68±8	67±2	62±2	134±13	153±15

Os animais receberam tratamento com aloxana ou OVA, como descrito acima. Os animais diabéticos receberam 2UI de insulina NPH, e os animais asmáticos receberam 1UI de insulina NPH. Amostras de sangue foram obtidas por um corte na extremidade da cauda do animal, e a glicose determinada com um glicosímetro (Accu-Check Active – Roche Diagnosis®)

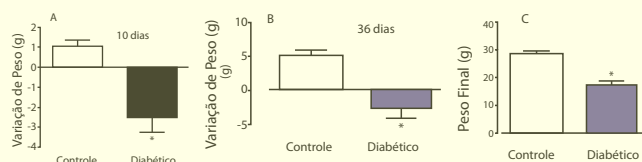


Figura 1 - Determinação de variação de peso em 10 e 36 dias e peso final dos animais. A variação de peso dos animais, pertencentes ao grupo controle e animais diabéticos foi avaliada antes, 10 (Figura A) e 36 (Figura B) dias após a injeção endovenosa de aloxana ou salina (60mg/kg). Foi avaliado também o peso final dos animais pertencentes a cada grupo (Figura C) Os valores representam a média de peso  $\pm$  E.P.M. (5 animais por grupo). # p<0.05 estatisticamente diferente dos grupos controle

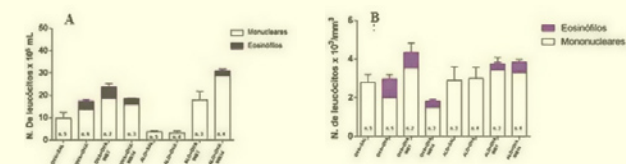


Figura 2 - Contagem celular do LAB (Figura A) e contagem celular do sangue periférico (Figura B). Número de grupo de animais em cada torre do gráfico. Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M

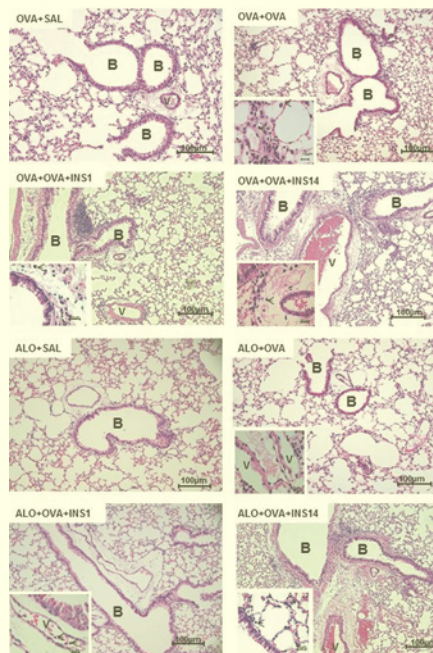
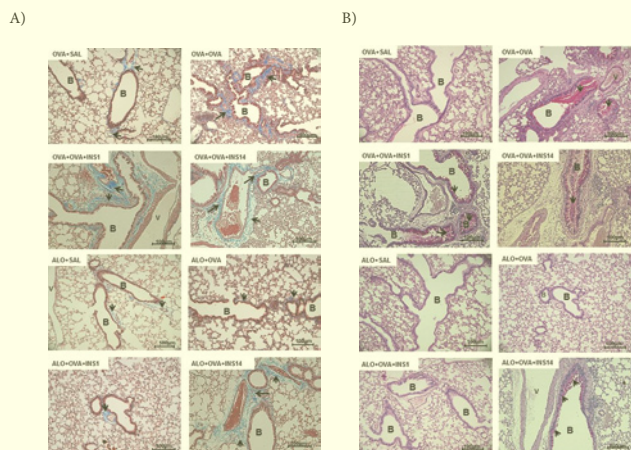


Figura 3 - Parênquima pulmonar de camundongos. Fotomicrografia do parênquima pulmonar constituído por brônquios (B) e vasos (V). Notar OVA+SAL, ALO+SAL, ALO+OVA, apresentaram tecido preservado. OVA+OVA, OVA+OVA+INS<sub>1</sub>, OVA+OVA+INS<sub>14</sub>, e ALO+OVA+INS<sub>14</sub> apresentaram infiltrado inflamatório com presença de polimorfonucleares (seta). ALO+OVA+INS<sub>1</sub>, apresentou presença de infiltrado inflamatório com predominância de polimorfonucleares dentro dos

vasos. Já o grupo ALO+OVA+INS14 apresentou a presença de polimorfonucleares ao redor das vias aéreas (seta). Aumento de 10x (H/E)



**Figura 4** - Parênquima pulmonar de camundongos, deposição de colágeno (direita), produção de muco (esquerda). Constituído de brônquios (B) e vasos (V). Notar colágeno ao redor das vias aéreas (seta) e notar a presença de muco dentro das vias aéreas. Aumento de 10x. Tricômico de Masson (Figura A). PAS (Figura B)

**Conclusão:** Os dados apresentados sugerem que a insulina modula a migração de eosinófilos no sangue periférico para o tecido pulmonar, bem como a deposição de colágeno e produção de muco durante a fase tardia da reação inflamatória alérgica. **Agradecimentos:** O presente estudo teve auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP- Projeto Jovem Pesquisador (2010/02272-o) e FAPESP (2012/06617-7) e do Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), CAPES e Pró-Reitoria da USP.

## References

- GALLI, S.J., TSAI, M., PILIPONSKY, A.M. The development of allergic inflammation. *Nature*. 454, 2008.
- SCHOFIELD, M., & CALHOUN K.H. Immunology of asthma. *Otolaryngol Clin N Am*. 44:591-601, 2011.
- SOCIEDADE BRASILEIRA DE PNEUMONIA E TISIOLOGIA. *Diretrizes da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia*. 2012.
- SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. *Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes*. São Paulo, SP. 2012-2013.
- van BELLE, T. L.; COPPIETERS, K. T.; von HERRATH, M. G. Type 1 diabetes: etiology, immunology, and therapeutic strategies. *Physiology Review*. V: 91, n. 1, p. 79-118, 2011.
- DOUEK, I. F.; LEECH, N. J.; GILLMOR, H. A.; BINGLEY, P. J.; GALE, E. A. M. Children with type-1 diabetes and their unaffected siblings have fewer symptoms of asthma. *The Lancet*. 353: 1850, 1999.
- HELANDER, E. Asthma and diabetes. *Acta Med. Scand.*. 162: 165-174, 1958.
- SINGH S, PRAKASH, Y.S, LINNEBERG, A. AGRAWAL, A. Insulin and the lung connecting asthma and metabolic syndrome. *Hindawi*. 2013.
- VIANNA, E. S. O. & GARCIA-LEME, J. Allergen-induced airway inflammation in rats. Role of insulin. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*. 151: 809-814, 1995.
- MARTINS, J.O; CAMPOS C.A.L; CRUZ, J.W.M.C; MANZOLLI, S; ALVES, V.A.F; VIANNA, E.O; JANCAR, S; SANNOMIYA, P. Insulin modulates cytokine release and selectin expression in the early phase of allergic airway inflammation in diabetic rats. *BMC Pulmonary Medicine*, 10:39, 2010.

## A INFLUÊNCIA DA DESNUTRIÇÃO PROTEÍCA SOBRE A PRODUÇÃO DE GM-CSF E M-CSF POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS

OLIVEIRA, DC.<sup>1</sup>; HASTREITER, AA.<sup>1</sup>; BORELLI, P.<sup>1</sup>; FOCK RA.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Ciências farmacêuticas Universidade de São Paulo.

**Introdução e objetivos:** A hematopoese é o processo de formação e desenvolvimento de células sanguíneas. Esse processo está sob o controle de diversas citocinas e fatores de crescimento. Dentre esses fatores destaca-se o fator estimulador de colônia de macrófagos (M-CSF) e o fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) que são importantes para o desenvolvimento e formação de monócitos e macrófagos [1,2]. Os fatores M-CSF e GM-CSF fazem a mediação da sobrevivência, diferenciação, e modulação funcional de várias populações de células sanguíneas. Apesar de diferentes populações mielóides responderem a esses fatores, a linhagem celular de macrófagos é o alvo comum dos dois fatores [3,4]. M-CSF é detectável na circulação em estado basal, no entanto a produção de GM-CSF normalmente precisa de estímulo como, por exemplo, estímulos inflamatórios para ser facilmente mensurável *in vivo* [4,5]. Num estado de desnutrição proteica a resposta imune e a hematopoese estão comprometidas. O comprometimento da produção de células sanguíneas com redução de células progenitoras hematopoéticas, hipoplasia e alterações estruturais medulares em animais desnutridos, o que em parte contribui para a leucopenia periférica e neutropenia, comprometendo tanto a resposta imune inata quanto a resposta imune adaptativa, comumente encontrada nos estados de desnutrição proteica foi demonstrado [6,7]. Sabendo que a desnutrição proteica pode prejudicar a resposta imune e a hematopoese, e considerando a importância do M-CSF e GM-CSF nos dois processos, o presente trabalho foi delineado para pesquisar a influência da desnutrição proteica na produção de M-CSF e GM-CSF. **Materiais e métodos:** Foram utilizados camundongos BALB/c machos com dois meses de idade. Os animais foram mantidos nas mesmas condições ambientais (ciclo 12 horas claro/escuro, Temperatura de 22-25°C e 55% de umidade) e separados aleatoriamente entre grupo controle e grupo desnutrido. Os animais do grupo desnutrido receberam ração hipoproteica (n=12), com uma dieta contendo 2% de proteína, enquanto os camundongos controle (n=12) foram alimentados com uma dieta contendo 12% de proteína por cerca de quatro semanas. As rações continham 100 g/kg de sacarose, 80g/kg de óleo de milho, 10g/kg de fibra, 2,5g/kg de bitartrato de colina, 1,5g/kg de L- metionina, 40 g/kg de mistura de minerais e 10 g/kg de mistura vitamina. A ração controle continha 120g/kg de caseína e 636g/kg de amido de milho e a ração hipoproteica continha 20 g/kg de caseína e 736g/kg de amido de milho. Com exceção do teor de proteínas, as duas dietas eram idênticas e isocalóricas. Esse estudo foi aprovado pelo comitê de ética da faculdade de Ciências Farmaceuticas da Universidade de São Paulo. Foram avaliados o consumo de ração, a variação de peso corpóreo, a quantificação de albumina e proteínas plasmáticas e o hemograma. As células da cavidade peritoneal foram coletadas, quantificadas e posteriormente foram utilizadas para a avaliação da expressão de RNAm de M-CSF e GM-CSF por PCR. Células cultivadas *in vitro* na concentração de 1x10<sup>6</sup> células/mL e estimuladas ou não com TNF-α (10ng/mL) por 2 horas foram utilizadas para quantificação da produção de M-CSF e GM-CSF no sobrenadante por ELISA. **Resultados:** Os animais desnutridos apresentaram anemia, leucopenia, redução de células da cavidade peritoneal. A produção de M-CSF não apresentou diferença entre os grupos, no entanto células dos animais desnutridos apresentaram capacidade reduzida de produção de GM-CSF (TABELA1). Os resultados não mostraram diferença na expressão de RNAm do M-CSF, no entanto a expressão de GM-CSF estava reduzida nos animais do grupo desnutrido quando comparado com os