

good probability (scores above 2.0). Two isolates were identified as “Burkholderia cepacia complex” (scores 1.96 and 1.98). These two isolates were re-evaluated after an extraction in tube with formic acid and acetonitrile and one isolate was identified as *B. cenocepacia* (score 2.27) and the other was confirmed as “Burkholderia cepacia complex” (score 2.16). In conclusion, MALDI-TOF proved to be a useful tool for identification of *B. cenocepacia* using an optimized extraction, however, negative results of *B. cenocepacia* need to be confirmed by molecular technique. We will further evaluate the MALDI-TOF method using other isolates of BCC in order to establish the specificity of this procedure. Development agency: INPRA (Instituto Nacional de Pesquisa em Resistência Antimicrobiana), FIPE/HCPA

### 2301

#### **Different DNA pre-extraction protocols of sputum to evaluated the microbiome of the airways from cystic fibrosis patients**

Fabiana Caroline Zempulski Volpato; Daiana de Lima Morales; Paulo José Cauduro Maróstica; Afonso Luís Barth  
UFRGS - Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Cystic fibrosis (CF) is a recessive multisystem genetic disease in which, pulmonary manifestations are the principal cause of high morbidity and mortality. The relationship between the structure and the composition of the microbiome of the CF patient represents an important factor in his states of health. For microbiome analysis, the quality of DNA extracted has a pivotal impact in the sample representativeness. The aim of this study was to evaluate different protocols of DNA extractions in order to obtain the best method to be used in the microbiome analysis of sputum from Cystic Fibrosis (CF) patients. The extraction kit QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Valencia CA) was used with three different pre-treatments: The first procedure (1A) followed the manufacturer protocol recommendation. The second procedure (1B) included a proteinase K treatment for 60 min at 56°C followed by bead-beating with zirconia/silica bead in a FastPrep 24 5G system (Qbiogene, CA), for 10 seconds at 6.0 m/sec (repeated 4 times). The third procedure (1C) was based in the sputum digestion with equal volume of N-acetyl-cysteine (100mg/mL). The last procedure (1D) used a TE buffer (10mM Tris-HCl [pH 8.0], 1mM EDTA) with the sputum and bead-beating as described above. The concentration of DNA was measured at Qubit 3.0 Fluorometer (ThermoFisher) and the DNA integrity was verified with the 4200 Tape Station (Agilent). The amplicon library was prepared following the Illumina 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation protocol and the high-throughput sequencing performed with MiSeq 600V3 kit. An average of 190,000 reads were obtained per sample. The total genus-level of taxonomic categories identified (TCI) was approximately 215 per sample. The total of species-level TCI was: 238 for 1A; 320 for 1B; 179 for 1C and 241 for 1D. We selected a *Pseudomonas aeruginosa* and a *Rothia mucilaginosa* to evaluate the effectiveness of DNA extraction from gram-negative and gram-positive bacteria. The detection of *P. aeruginosa* and *R. mucilaginosa*, respectively, for each protocol extraction was: 1A, 22.08% and 0.85%; 1B 29.10% and 4.46%; 1C, 31.15% and 0.68% and 1D, 26.92% and 8.56%. In conclusion, the protocol 1B presented the best performance considering the total of species-level TCI. Noteworthy, both protocols 1B and 1D, which use the bead-beating strategy, increased the yield of Gram-positive bacterial DNA extraction.

### eP2305

#### **Avaliação da resposta de células de adenocarcinoma ductal pancreático PANC-1 à gemcitabina em perfil de tratamento semelhante ao protocolo clínico: foco no papel da autofagia**

Ronize Zeni da Silva; Solon Andrades da Rosa; Paula Ferst; Stefano Walter Agati; Mariana Lobo; Viviane Rosner de Almeida; Eduardo Cremonese Filippi Chiela; Patrícia Luciana da Costa Lopez  
UFRGS - Universidade Federal do Rio Grande do Sul

O câncer de pâncreas é a terceira causa de morte por câncer nos Estados Unidos e a sétima no Brasil. Menos de 10% dos pacientes sobrevivem 2 anos livres de doença. Dentre os diversos subtipos o mais comum é o Adenocarcinoma Ductal de Pâncreas (ADP). Apesar dos avanços observados na terapia antitumoral nas últimas décadas, quimioterápicos clássicos como a Gemcitabina (GEM) continuam sendo uma alternativa primária para terapia do ADP. Porém, a resistência e recorrência tumorais são frequentes, e são escassos os trabalhos que avaliam a resposta das células de ADP à GEM a longo prazo. Sendo assim, nós utilizamos um racional experimental de tratamento agudo (48h) seguido do crescimento das células tumorais em Meio Livre de Droga por 10 dias (período de recuperação), para mimetizar o período de recuperação dos pacientes. A partir deste modelo nós avaliamos o efeito da GEM na viabilidade fenotípica celular, na clonogenicidade das células tumorais e nos níveis de marcadores de autofagia tanto após o tratamento agudo (48h) quanto após 5 e 10 dias do tratamento. Por fim, avaliamos a relação entre níveis de autofagia e sobrevivência celular durante o período de recuperação. Nós observamos que o tratamento com GEM 10 e 30 mM por 48h causou uma redução do número de células com fenótipo viável a longo prazo. Para o tratamento com a dose GEM 1mM observamos redução desta população celular 5d após o tratamento, porém esta redução não se acentuou 10d após o tratamento. O tratamento com GEM também reduziu a clonogenicidade das células e aumentou indicadores de autofagia a longo prazo (medido pela marcação com laranja de acridina e complexidade intracelular, ambos por citometria de fluxo). Finalmente, observamos que células com fenótipo viável após 5d e 10d apresentaram níveis mais intensos de marcação com laranja de acridina, sugerindo que a autofagia atue favorecendo a sobrevivência das células de ADP em resposta à GEM. Concluímos, assim, que as células de ADP ativam autofagia possivelmente como mecanismo de citoproteção à GEM, e que o desenho experimental utilizado possui características que mimetizam, pelo menos parcialmente, o comportamento de recorrência tumoral observado clinicamente. A modulação racional da autofagia induzida por este quimioterápico poderia, assim, sensibilizar as células de ADP resistentes à GEM.

### eP2331

#### **Damage-associated molecular patterns (DAMPs) related to immunogenic cell death are differentially triggered by clinically relevant chemotherapeutics in lung adenocarcinoma cells**

José Ignácio Gonzalez Solari; Eduardo Cremonese Filippi-Chiela; Cristiano Feijó Andrade; Fabio Klamt  
UFRGS - Universidade Federal do Rio Grande do Sul

#### Introduction

Chemotherapeutics can stimulate immune antitumor response by inducing immunogenic cell death (ICD), which is characterized by the appearance of Damage-Associated Molecular Patterns (DAMPs) like the exposure of calreticulin (CRT) in cell surface, the release

of ATP and the secretion of High Mobility Group Box 1 (HMGB1). Methods: Here, our objective was to investigate levels of ICD-associated DAMPs induced by chemotherapeutics commonly used in the clinical practice of non-small cell lung cancer (NSCLC) and the prognosis values of these DAMPs. A549 human lung adenocarcinoma cells were treated with cisplatin, carboplatin, etoposide, paclitaxel and gemcitabine using clinically relevant conditions (doses, times and co-treatments). We assessed ICD-associated DAMPs, cell viability, apoptosis and autophagy in an integrated way. Results: We found that cisplatin induced the highest levels of apoptosis, while carboplatin and etoposide were the less cytotoxic. Cisplatin also induced the highest levels of ICD-associated DAMPs, which was not incremented by co-treatments. Etoposide induced the lower levels of ICD and the highest levels of autophagy, suggesting that the cytoprotective role of autophagy is dominant in relation to its pro-ICD role. High levels of CRT were associated with better prognosis in TCGA databank. In an integrative analysis we found a strong negative correlation between cell number and ICD-associated DAMPs as well as between autophagy and ICD-associated DAMPs. We also propose a mathematical integration of ICD-associated DAMPs in an index (InDAMPs) that may represent with greater biological relevance this process. Conclusions: Cisplatin alone induced the highest levels of ICD-associated DAMPs, so that its combination with immunotherapies can be a promising therapeutic strategy in NSCLC.

### eP2339

#### **Alternativas farmacológicas para o controle da geração de Angiotensina II e suas aplicações para alterações vasculares**

Pamela Zanon; Renata Cristina de Souza Ramos; Lucélia Santi; Walter Orlando Beys da Silva; Jorge Almeida Guimarães; Markus Berger

HCPA - Hospital de Clínicas de Porto Alegre

**Introdução.** Na visão clássica do sistema renina-angiotensina (RAS), a angiotensina II (Ang II) é gerada pela ação da enzima conversora de angiotensina (ACE). Evidências recentes vêm sugerindo que possam existir vias alternativas de geração de Ang II no ambiente intracelular em determinadas condições patológicas. Nesses casos a principal enzima conversora de Ang II é a quimase. Em condições de hiperglicemia, produtos avançados de glicação podem ativar quimase, desviando toda a rota de geração de Ang II, causando hipertrofia e aumento de proliferação em células musculares lisas de vasos (VSMCs). Neste trabalho descrevemos a caracterização estrutural e farmacológica de uma nova molécula capaz de bloquear a quimase e uma série de eventos mediados por Ang II in vitro e in vivo. **Metodologia.** A molécula capaz de inibir quimase foi isolada por métodos de cromatografia líquida a partir da leguminosa *Canavalia ensiformes*. Sua estrutura foi caracterizada por espectrometria de massas e métodos de modelagem molecular. As alterações vasculares foram estudadas in vivo em modelo de permeabilidade vascular em ratos e in vitro em cultura de células da musculatura lisa de aorta (linhagem A7r5-VSMCs). **Resultados.** A nova molécula (denominada CETI) foi isolada por cromatografia de troca aniônica e afinidade. Possui massa molecular de 8173 dalttons, é um trímico em solução aquosa, a estrutura é rica em cisteínas, resistente às variações de temperatura e pH e apresenta duas alças inibitórias, sendo capaz bloquear quimase com um IC50 de 13,80 nM. É um inibidor competitivo clássico e ligante tempo-dependente de quimase. CETI bloqueia a geração de Ang II mediada por quimase humana e a atividade tipo-quimase de mastócitos isolados do peritônio de ratos. Também reduz a permeabilidade vascular induzida por um degranulador de mastócitos (composto 48/80) in vivo. VSMCs cultivadas em meio hiperglicêmico (glicose 25 mM) apresentam um aumento na geração intracelular de Ang II que é reduzida após o tratamento prévio com CETI. O inibidor também atenua uma série de eventos mediados por Ang II em VSMCs, tais como migração, proliferação e geração de espécies reativas de oxigênio. **Conclusão.** Neste trabalho descrevemos a caracterização inédita de uma molécula capaz de bloquear uma via não clássica do RAS, tendo, possivelmente aplicação terapêutica promissora em distúrbios vasculares.

### eP2357

#### **Novos compostos sintéticos no tratamento antineoplásico: uma avaliação em tumores pediátricos**

Bruno Toson; Martina Lichtenfels; Isadora Serraglio Fortes; Mariane da Cunha Jaeger; Caroline Brunetto de Farias; André Tesainer Brunetto; Alexandre Meneghello Fuentefria; Saulo Fernandes de Andrade; Rafael Roesler

UFRGS - Universidade Federal do Rio Grande do Sul

O câncer é uma doença que tem como característica a reprogramação de células, adquirindo comportamentos como potencial replicativo ilimitado, evasão de mecanismos de apoptose e insensibilidade a sinais anticrescimento. Apesar de as taxas de mortalidade de tumores pediátricos sólidos - como o linfoma, o neuroblastoma e o sarcoma de Ewing - terem decaído significativamente ao longo das últimas décadas, o câncer na infância representa a maior causa de morte em indivíduos abaixo de catorze anos. Atualmente, um dos desafios do tratamento antitumoral é a resistência aos fármacos. Portanto, o desenvolvimento e a triagem de novos compostos citotóxicos devem ser estimulados para que novas opções terapêuticas menos tóxicas e mais eficazes estejam sempre disponíveis à clínica. Na busca por novas terapias antineoplásicas, as oxazolidinas quirais 2,3,4-substituídas mostraram potencial citotóxico em diferentes linhagens tumorais in vitro, mas seu potencial terapêutico e mecanismos de ação em tumores pediátricos permanecem a serem elucidados. O objetivo desse trabalho, parte do meu mestrado, foi avaliar a atividade citotóxica de sete oxazolidinas quirais 2,3,4-substituídas (PH135, PH136, PH137, PH138, PH139, PH140 e PH141) em linhagens tumorais de neuroblastoma (SK-N-BE-2), sarcoma de Ewing (RD-ES) e meduloblastoma (Daoy). As linhagens foram cultivadas conforme protocolo padrão (37°C a 5%CO<sub>2</sub>) e os tratamentos foram feitos em doses de 1; 2,5; 5; 12,5; 25, 37 e 50µM por 48h em todas as linhagens. Células controle com veículo DMSO foram expostas às mesmas condições. Após a incubação foi realizada contagem em hemocitômetro para confecção de curva dose/resposta e a obtenção dos valores de IC50 foi realizada com auxílio do software GraphPad Prism. Observou-se maior atividade citotóxica nos compostos PH135 e PH136. Para avaliação em células não tumorais, a atividade de três compostos foi verificada em linhagem MRC5 de fibroblastos. Em comparação com as linhagens tumorais, as células MRC5 apresentaram maiores valores de IC50. Apesar disso, a diferença entre esses valores é relativamente baixa e não demonstra uma grande margem de segurança. Futuramente, a atividade desses compostos também será avaliada em outras células não tumorais para melhor observar sua toxicidade. Estudos de mecanismo de ação e de toxicidade a longo prazo encontram-se atualmente em andamento.