

eP2259**Avaliação do mecanismo de ação da rapamicina em células de pacientes com esclerose tuberosa**

Clévia Rosset; Mariane Jaeger; Eduardo C. F. Chiela; Larissa Brussa Reis; Cristina Brinckmann Oliveira Netto; Caroline Brunetto de Farias; Rafael Roesler; Patricia Ashton-Prolla
HCPA - Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Introdução. A esclerose tuberosa (TSC) é uma síndrome hereditária autossômica dominante causada por mutações de perda de função nos genes TSC1 ou TSC2, que codificam proteínas que agem na supressão de mTOR, um regulador mestre do crescimento celular. As manifestações da esclerose tuberosa são amplamente variadas, representando um desafio para o diagnóstico e para o desenvolvimento de tratamentos eficazes. Inibidores de mTOR são utilizados e investigados para vários sintomas em pacientes com TSC mas possuem efetividade muito variável entre pacientes tratados. Ainda não se sabe se existem diferentes respostas ao tratamento de acordo com as diferentes mutações apresentadas pelos pacientes. **Objetivo.** O objetivo deste trabalho foi avaliar o mecanismo de ação molecular e efeito do inibidor de mTOR rapamicina em células de indivíduos com diferentes mutações germinativas em TSC1 ou TSC2. **Métodos.** Biópsias de pele de aparência normal foram obtidas de cinco mulheres diagnosticadas com TSC e com mutação em heterozigose identificada (duas em TSC1 e três em TSC2) e de dois indivíduos sem mutação em ambos os genes. Os participantes assinaram Termo de Consentimento Livre e Esclarecido aprovado pelo CEP-HCPA e registrado no GPPG-HCPA sob número 15-0049. Culturas primárias de fibroblastos foram estabelecidas e utilizadas para avaliar viabilidade celular, progressão do ciclo celular e autofagia por citometria de fluxo. **Resultados.** Não foram observadas diferenças na viabilidade e ciclo celular entre os grupos com e sem mutação. No entanto, a autofagia parece estar diminuída em células com mutação; após o tratamento com rapamicina, o aumento do número de células autofágicas é maior no grupo com mutação ($p=0.039$). Não foi possível observar correlação entre os tipos de mutação e a resposta ao tratamento com rapamicina. **Conclusão.** A autofagia é uma das funções celulares que parece estar alterada em células com mutação em heterozigose em TSC1 ou TSC2, e pode ser um dos processos celulares alvo no tratamento da esclerose tuberosa. Nesse sentido, a investigação de compostos alternativos que sejam mais baratos, de fácil acesso e que permitam o estímulo da via de autofagia será uma perspectiva de continuação e aplicação do resultado encontrado neste estudo.

eP2286**Efeitos da ovariectomia e da suplementação com vitamina D sobre a função mitocondrial em hipocampo de ratas wistar adultas**

Cassiana Siebert; Pedro Henrique Olmedo de Freitas; Tiago Marcon dos Santos; Leo Anderson Meira Martins; Angela T.S. Wyse
UFRGS - Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Introdução: A menopausa é caracterizada pela interrupção das habilidades reprodutivas femininas e ocorre como consequência da redução da secreção hormonal ovariana. Particularmente os estrógenos ovarianos, além de apresentarem funções reprodutivas, também desempenham funções não reprodutivas. Estudos mostram que a deficiência de estrógenos está relacionada com processos neurodegenerativos e que distúrbios no metabolismo energético mitocondrial também tem sido relacionados com tais condições. A procura de alternativas à terapia de reposição hormonal para o tratamento da menopausa tem sido cada vez mais estudada. Neste sentido, a vitamina D, vem sendo estudada como um possível agente terapêutico. **Objetivo:** O objetivo do trabalho foi investigar o efeito da ovariectomia (OVX) e/ou da suplementação com vitamina D sobre a atividade da citocromo c oxidase, níveis de ATP e massa e potencial de membrana mitocondrial em hipocampo de ratas Wistar adultas. **Materiais e métodos:** Ratas Wistar adultas (90 dias) foram divididas em quatro grupos (SHAM, OVX, vitamina D e OVX+ vitamina D, $n=4-6$ animais por grupo) e submetidas à remoção bilateral de ovários (OVX). Trinta dias após o procedimento foi iniciada suplementação diária com vitamina D (500 UI/Kg de peso corporal) através de gavagem, por 30 dias. Posteriormente os animais foram eutanasiados por decapitação, e o hipocampo foi dissecado para as análises. Os resultados foram analisados por ANOVA de duas vias seguida do teste de Tukey. Este trabalho foi submetido e aprovado pelo CEUA-UFRGS (28033). **Resultados:** Os resultados mostraram que a OVX foi capaz de reduzir significativamente a atividade da citocromo c oxidase ($p<0.05$). A suplementação com vitamina D não foi capaz de reverter este efeito ($p>0.05$). A análise dos níveis de ATP mostrou que a OVX causou redução significativa neste parâmetro ($p<0.05$), e este prejuízo foi revertido pela suplementação com vitamina D ($p<0.05$). Por fim, a OVX também causou redução de massa e potencial de membrana mitocondrial na estrutura estudada ($p<0.05$) e a suplementação com vitamina D foi eficaz em reverter as alterações observadas ($p<0.05$). **Conclusão:** A OVX provoca alterações mitocondriais em hipocampo de ratas adultas e a suplementação com vitamina D se mostrou eficaz na reversão de algumas destas alterações. Esperamos com nossos resultados auxiliar na melhor compreensão da neurobiologia da menopausa, bem como na busca de novas estratégias de proteção. Apoio Financeiro: CNPq e PROPESQ.

eP2299**Identification of burkholderia cenocepacia by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight (MALDI-TOF) in comparison with polymerase chain reaction (PCR)**

Fabiana Caroline Zempulski Volpato; Priscila Lamb Wink; Daiana de Lima Morales; Afonso Luís Barth
UFRGS - Universidade Federal do Rio Grande do Sul

The *Burkholderia cepacia* complex (BCC) is a group of closely related species which, are associated with different levels of virulence and patient-to-patient transmissibility among Cystic Fibrosis (CF) patients. Although all species of the complex are associated with a poor prognosis, *B. cenocepacia* genomovar III is frequently related to a drastic reduction in lung function and decrease in survival. Moreover, this specie is responsible for the "cepacia syndrome", a necrotizing pulmonary infection with high mortality rate in CF patients. Differentiation of Bcc species by biochemical tests or even by conventional automated systems is cumbersome, if possible at all. Although molecular diagnostic based on PCR is considered a very sensitive and specific method to identify Bcc species (and genomovars), it is costly and needs long turnaround times. MALDI-TOF is considered an accurate and rapid technology for bacteria identification but it may not be a reliable method to distinguish the species of Bcc. The aim of this preliminary study was to compare the MALDI-TOF with a well-established nested-PCR for *B. cenocepacia* identification. A total of 10 *B. cenocepacia* III-B previously identified by nested-PCR were submitted in duplicate to identification on MALDI-TOF (Bruker Microflex®) using a conventional protocol (extraction by formic acid directly on the MALDI-TOF plate). The MALDI-TOF identified 8 isolates as *B. cenocepacia* with

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