

cirúrgicas. Outros testes estão sendo realizados nesse material biológico.

eP2612

The polarization of neutrophils associated with tumor analysis when cultivated in vitro with glioma cells

Dominique Santos Rubenich; Priscila Oliveira de Souza; Elizandra Braganhol
UFCSPA - Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

Introduction: Immune cells exhibit functional plasticity, altering themselves phenotypically and favoring tumor growth. The neutrophil subpopulations (N0) are polarized in different activation states, antitumor (N1) and pro-tumor (N2), in response to signals from the microenvironment. Little is known about mechanisms that alter leukocyte functional behavior. **Objective:** The aim is to analyse the neutrophil morphology when in contact with glioma cells for increasing times, and observe the growing of tumor in these conditions. **Methods:** The tumor microenvironment influence was observed through co-culture of U87MG glioma cells with primary neutrophils at 5 different N0/U87MG ratio for 24, 48 and 72h. The U87MG viability was investigated by MTT test, also viable N0 was performed by trypan-blue staining. Neutrophils morphologic changes were observed through microscope. **Results:** The tumor growth is N0-dependent concentration, with decreasing viability between 24 and 48h, but revealed a potential change in neutrophils modulation in time 72 when there was an increase in the cellular viability compared to the time 48. Morphologically, it was observed that the lower concentration of neutrophils induces tumor growth and more disorderly arrangement. Regarding the neutrophils, it was observed that there was no cell death in the analysed period, and there was a conformational change from a spherical shape to a flower shape of the cells in culture after the period of 72. Microscopically, it was observed a change in the nucleus shape, suggesting nuclear increase and, consequently, modification from multilobular to banana shape in the N2 profile. **Discussion:** The conformational change in the neutrophil after 72h indicates the tumor-induced phenotypic modeling, consistent with the change in the expected pattern of tumor viability after 72h of contact with N0, slightly increasing the amount of viable cells, despite concentration-dependent. It suggests that N0 polarization by tumor helps its growth in vitro. Morphological changes in the phenotypes aid in the characterization between polarizations. The nucleus format, if well established, can predict the patient's N2/N1 ratio in blood tests, and a more accurate analysis of neutrophils in cancer patients may predict tumor aggressiveness. Further tests are needed to assume the role of the neutrophil associated with tumor.

eP2706

Avaliação da modulação do receptor MAS da Angiotensina (1-7) e do receptor MRGD sobre a cardiotoxicidade induzida por Doxorubicina em Cardiomioblastos

Juliana Romeu Marques; Fernanda Tereza Bovi Frozza; Temenouga Guecheva; Maria Cláudia Irigoyen; Natalia Leguisamo Meirelles
IC - Instituto de Cardiologia

Introdução: O antineoplásico doxorubicina (DOX) é considerado o protótipo da cardiotoxicidade por induzir dano direto ao miocárdio. O bloqueio farmacológico das ações da Angiotensina (Ang) II é uma das principais estratégias para manejo da cardiomiopatia induzida pela DOX, cujos efeitos são também mediados pela ativação do seu eixo contra regulatório. A modulação deste eixo, que inclui a Ang-(1-7) e Alamandina (Ala) e o receptor Mas, pode ser uma nova estratégia cardioprotetora no contexto da cardiotoxicidade. **Objetivo:** Avaliar o efeito da modulação farmacológica dos receptores Mas e MrgD sobre a cardiotoxicidade induzida por DOX in vitro. **Métodos:** Cardiomioblastos murinos (H9c2) foram expostos (30') a um antagonista (A779, 10µM) do MasR seguido do seu agonista (Ang-(1-7), 100nM), ou da Ala (100nM) antes do tratamento de 24h com DOX (0,1µM e IC50: 0,347µM). Avaliou-se a viabilidade celular (Vermelho Neutro e Azul de Trypan), perfil de morte celular (Anexina/7AAD) e indução de danos ao DNA (Ensaio Cometa). Os experimentos foram realizados em triplicata, e os dados foram analisados por ANOVA e post-hoc de Dunnett. Considerou-se $p < 0,05$. **Resultados:** O A779 ou a Ang-(1-7), isoladamente, elevaram a proliferação dos cardiomioblastos (A779: 116,8% \pm 9,8 $p < 0,05$; Ang-(1-7): 117,0% \pm 8,5, $p < 0,05$) quando comparado com o controle. Contudo, a modulação do MasR não impediu a redução da viabilidade celular induzida pela DOX. O perfil de morte celular induzida pela DOX, predominantemente por apoptose, não foi alterado pela modulação do MasR. Foram induzidos danos ao DNA por ambas as concentrações de DOX (C: 27,5 \pm 13,4; DOX 0,1µM: 53,5 \pm 9,1; DOX IC50: 109,5 \pm 17,6 em unidades arbitrárias). O pré-tratamento com Ang-(1-7) e A779 atenuou a indução de quebras no DNA causadas pela menor concentração de DOX (DOX+Ang-(1-7): 36,5 \pm 6,3; DOX+A779: 36,5 \pm 0,7 em unidades arbitrárias). **Conclusão:** A modulação do MasR por antagonismo e agonismo seletivos e isoladamente aumenta a proliferação celular, mas não impede os efeitos deletérios da DOX sobre a viabilidade dos cardiomioblastos. Todavia, esta abordagem atenua a indução de danos ao DNA causadas pela DOX na menor concentração, denotando a existência de efeito cardioprotetor indireto. Os efeitos alcançados parecem ser independentes da ativação do MasR pela Ang-(1-7), sugerindo um possível crosstalk entre os demais receptores do SRA.

eP2724

Efeito de múltiplos ciclos de tratamento quimioterápico na senescência e autofagia de células de Glioblastoma

Stefano Walter Agatti; Patrícia Luciana da Costa Lopez; Eduardo Cremonese Filippi Chiela
HCPA - Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Introdução: Glioblastomas (GBM) são os tumores mais frequentes e agressivos do Sistema Nervoso Central. A terapia do GBM consiste em ressecção cirúrgica seguida de radioterapia e quimioterápica com múltiplos ciclos de Temozolomida (TMZ); em casos refratários ou recorrentes, outros quimioterápicos clássicos são utilizados. Entre os mecanismos disparados pela TMZ estão a apoptose, autofagia e senescência. Entretanto, são escassos os dados referentes à resposta das células tumorais a múltiplos ciclos de tratamento em perfil semelhante ao regime clínico. **Objetivos:** avaliar a resposta de células de GBM a múltiplos ciclos de tratamento com os quimioterápicos TMZ, Paclitaxel (PAC) e 5-Fluoruracila (5-FU), com foco nos mecanismos de autofagia e senescência. **Métodos:** células da linhagem de GBM U87-MG foram tratadas com os quimioterápicos por 3 ciclos de 2d de tratamento seguidos de 15 dias de recuperação. Foram avaliadas a proliferação celular, autofagia e senescência. Nós também acompanhamos o comportamento de células individuais para avaliar a resposta de células senescentes induzidas no primeiro ciclo de tratamento aos tratamentos subsequentes. **Resultados:** Após 48h do tratamento, 5-FU e PAC exerceram maior toxicidade do que

TMZ, reduzindo o número de células viáveis e aumentando a porcentagem de células com fenótipo apoptótico. Considerando os 15 dias subsequentes ao primeiro tratamento, todos quimioterápicos aumentaram transitoriamente o número de células com características de autofagia, especialmente 5-FU e TMZ. Este aumento foi acompanhado pela redução da proliferação e aumento do número de células com fenótipo senescente, especialmente para a TMZ mas também para 5-FU e PAC. Quando retratadas, as células senescentes se mostraram resistentes ao segundo ciclo de tratamento. Finalmente, após 3 ciclos de tratamento com 5-FU nós observamos o surgimento de populações celulares altamente proliferativas, o que não foi observado para a TMZ e PAC. Conclusões: Nossos dados preliminares sugerem que as células senescentes são resistentes a múltiplos tratamentos quimioterápicos. Apesar de não proliferativas, as células senescentes parecem contribuir para a resistência e recorrência tumorais através da secreção de moléculas parácrinas. Assim, iremos tratar as células expostas à TMZ e PAC com compostos senolíticos a fim de eliminar as células senescentes, avaliando a consequência desta eliminação na proliferação e resposta das células a múltiplos ciclos de tratamento.

eP2744

Interatoma microrna-mrna em pacientes brasileiros com Doença de Gaucher - ensinamentos de um estudo piloto

Marina Siebert; Tatiéle Nalin; Mariana Recamonde-Mendonza; Fernanda Sperb-Ludwig; Suelen Porto Basgalupp; Ida Vanessa Doederlein Schwartz

HCPA - Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Introdução: Mutações no gene GBA1 causam deficiência da enzima glicosidase, levando ao aparecimento da doença de Gaucher (DG). Diversos estudos têm destacado a contribuição de agentes modificadores, dentre os quais microRNAs (miRNAs), na complexidade da doença. Objetivo: Analisar o interatoma miRNA-mRNA de pacientes do Sul do Brasil em tratamento com taliglucerase alfa ou imiglucerase. Métodos: A amostra foi constituída por 3 pacientes em tratamento com taliglucerase alfa e 3 pacientes em tratamento com imiglucerase. Cada amostra foi coletada em dois momentos distintos: antes (pré-tratamento) e 1 hora após (pós-tratamento) a administração da enzima recombinante. O RNA total foi extraído dos leucócitos obtidos a partir de sangue periférico. A técnica de microarranjo foi realizada tanto para análise do miRNoma quanto do transcriptoma total. As análises foram realizadas utilizando o pacote R e os resultados foram apresentados como comparações entre os momentos pós e pré-tratamento em cada um dos grupos. Resultados: Dos 2578 miRNAs analisados, identificamos 10 miRNAs com expressão aumentada e 14 com expressão diminuída no grupo tratado com taliglucerase alfa, enquanto 9 miRNAs tiveram aumento e 10 redução da expressão no grupo tratado com imiglucerase. Desses, somente 2 (miR-623 e miR-6855-3p) estavam diferentemente expressos em ambos grupos, estando mais expressos no grupo taliglucerase e menos expressos no grupo imiglucerase. Diversos genes (mRNAs) estavam diferentemente expressos em cada um dos grupos. A análise do interatoma miRNA-mRNA indicou que 15 miRNAs parecem estar regulando o funcionamento de 91 genes nos pacientes em tratamento com taliglucerase alfa. Dois miRNAs (miR-1197 e miR-520c-3p) estavam 1,3x mais expressos e, conseqüentemente, 5 genes apresentaram redução da expressão (NMNAT2, GUCA1C, NHLH2, C5orf30 e FAM177A1). Sete miRNAs parecem regular 14 genes no grupo de pacientes em tratamento com imiglucerase, sendo que miR-376c-3p e miR-199a-5p destacam-se por estarem negativamente regulados. Esses miRNAs estavam envolvidos no aumento da expressão dos genes IL22, PGBD1, SPATA16, TBC1D26, ZNF23 e ZNF440. Conclusão: Os dados obtidos sugerem que existe um perfil diferente tanto em relação à expressão de miRNAs quanto de mRNAs dependendo do tipo de enzima com o qual o paciente com DG está sendo tratado. Os nossos achados estão sendo validados através de diferentes abordagens experimentais a fim de confirmar os dados encontrados.

eP2748

Avaliação do papel da autofagia em células de adenocarcinoma pancreático durante o tratamento com Gemcitabina

Paula Colonetti Ferst; Eduardo C. Filippi-Chiela; Patrícia Luciana da Costa Lopez

HCPA - Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Introdução: O adenocarcinoma ductal pancreático (ADP) é o tipo mais comum e agressivo de câncer de pâncreas. O tratamento farmacológico com Gemcitabina (GEM) é de primeira escolha, usualmente combinado a outros quimioterápicos como o Paclitaxel (PAC). Entretanto, não há na literatura estudos que tenham investigado a resposta das células de ADP à GEM e PAC em desenho experimental que mimetize o regime clínico e avalie os mecanismos de resposta e resistência celulares. Neste contexto, a autofagia atua como mecanismo citoprotetor às células tumorais por eliminação de componentes celulares danificados como mitocôndrias. Objetivo: avaliar a resposta das células de ADP a múltiplos ciclos de tratamento com GEM e PAC, em perfil de tratamento semelhante ao regime clínico (ou seja, 48h de tratamento seguido de 15 dias de recuperação), com foco em medidas integradas de autofagia, morte celular e estresse oxidativo. Nossa hipótese é que a autofagia desempenha papel importante na resistência das células aos tratamentos, e que a modulação deste mecanismo poderia sensibilizar as células tumorais. Metodologia: inicialmente as células da linhagem Panc-1 foram tratadas por 48 horas com GEM 0.1 μ M, 0.5 μ M, 1 μ M e 10 μ M, seguido do replaqueamento em Meio Livre de Droga por 15 dias. Ao longo deste período foram avaliados a proliferação celular, a marcação com laranja de acridina, a quantidade de mitocôndrias (marcação com Mitotracker) e a quantidade de espécies reativas de oxigênio (marcação com DCFH). Resultados: nós observamos uma redução dose-dependente da proliferação celular ao longo dos 15 dias do período de recuperação. Não observamos, porém, alterações típicas de apoptose. Nós também observamos um aumento da porcentagem de células com características de autofagia concomitante com a redução da massa mitocondrial e redução da quantidade de espécies reativas de oxigênio, sugerem que o dano causado pela GEM, direta ou indiretamente, induz a redução da massa mitocondrial e ativação de autofagia, o que poderia reduzir a taxa de proliferação celular. Conclusões: GEM parece induzir mitofagia nas células de ADP, e os níveis de mitofagia podem estar associados à sensibilidade das células tumorais ao tratamento. Nós iremos avaliar a resposta destas células ao PAC, bem como modularemos a autofagia a fim de sensibilizar as células de ADP à GEM e ao PAC, e avaliaremos o efeito desta modulação na massa mitocondrial e proliferação celular.