

variou entre três e 24 meses. Não existe um padrão definido de tempo de análise das lesões, o que pode estar associado ao fato de que o tecido ósseo é complexo. Além disso, os tempos para regeneração óssea, cicatrização e aumento de densidade tecidual podem variar conforme a clínica do paciente, tamanho da lesão, categoria do biomaterial aplicado, associação de células, condições de vascularização da região lesionada, dentre outras condições. Conclusão: Os ensaios clínicos relatados neste trabalho incluem apenas um em que os resultados foram avaliados com 24 meses pós-tratamento, os demais foram até seis meses. Notoriamente, a falta de padrão na escolha de tempo é um fator que influencia na comparação de resultados. O ensaio que utilizou um polímero sintético de poli-(L-lactídeo-co-glicolídeo) associado com MSCs em defeito craniano obteve desfecho negativo. O monitoramento de publicações incluindo estudos clínicos é útil para todos os grupos que pretendem tomar decisões na escolha de novas associações entre biomateriais e células.

2146**CELLULAR MECHANISMS TRIGGERED BY THE COTREATMENT OF RESVERATROL AND DOXORUBICIN IN BREAST CANCER: A TRANSLATIONAL IN VITRO-IN SILICO MODEL**

CATEGORIA DO TRABALHO: PESQUISA

Jose Eduardo Vargas, Cristiano Trindade, Guido Lenz, Renato David Puga, Eduardo Cremonese Filippichela

HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Doxorubicin (Doxo) is the most effective chemotherapeutic agent for the treatment of breast cancer. However, resistance to Doxo is common. Adjuvant compounds capable of modulating mechanisms involved in Doxo resistance may potentiate the effectiveness of the drug. Resveratrol (Rsv) has been tested as an adjuvant in mammary malignancies. However, the cellular and molecular mechanisms underlying the effects of cotreatment with Doxo and Rsv in breast cancer are poorly understood. Here, we combined in vitro and in silico analysis to characterize these mechanisms. In vitro, we employed a clinically relevant experimental design consisting of acute (24 h) treatment followed by 15 days of analysis. Acute Rsv potentiated the long-lasting effect of Doxo through the induction of apoptosis and senescence. Cells that survived to the cotreatment triggered high levels of autophagy. Autophagy inhibition during its peak of activation but not concomitant with Doxo+Rsv increased the long-term toxicity of the cotreatment. To uncover key proteins potentially associated with in vitro effects, an in silico multistep strategy was implemented. Chemical-protein networks were predicted based on constitutive gene expression of MCF7 cells and interatomic data breast cancer. Topological analysis, KM survival analysis, and a quantitative model based on the connectivity between apoptosis, senescence, and autophagy were performed. We found seven putative genes predicted to be modulated by Rsv in the context of Doxo treatment: CCND1, CDH1, ESR1, HSP90AA1, MAPK3, PTPN11, and RPS6KB1. Six out of these seven genes have been experimentally proven to be modulated by Rsv in cancer cells, with 4 of the 6 genes in MCF7 cells. In conclusion, acute Rsv potentiated the long-term toxicity of Doxo in breast cancer potentially through the modulation of genes and mechanisms involved in Doxo resistance. Rational autophagy inhibition potentiated the effects of Rsv+Doxo, a strategy that should be further tested in animal models.

2160**LEVANTAMENTO DE CASOS ALTERADOS DA TRIAGEM NEONATAL POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS EM TANDEM CONFIRMADOS ATRAVÉS DE TÉCNICAS MOLECULARES**

CATEGORIA DO TRABALHO: PESQUISA

Carolina Serpa Brasil, Alice Brinckmann Oliveira Netto, Francyne Kubaski, Roberto Giugliani, Ana Carolina Brusius Facchin

HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE

O programa de triagem neonatal no Brasil se trata de uma ação preventiva para identificação de doenças em fase pré-sintomática, através da coleta de sangue impregnado em papel filtro (SIPF) logo nos primeiros dias de vida do recém-nascido, conhecido como teste do pezinho (TP). O projeto "Avaliação do potencial de um programa de triagem neonatal para doenças lisossômicas" realiza o diagnóstico bioquímico de doenças lisossômicas (DLs) através da espectrometria de

massas em tandem. Ligado a ele, está o projeto de padronização da técnica de extração orgânica de DNA oriundo de SIPF, que visa confirmar os resultados possivelmente alterados da triagem neonatal para DLDs, através do Sequenciamento de Nova Geração, proporcionando um diagnóstico mais robusto. O objetivo do estudo é realizar o levantamento dos casos alterados da triagem neonatal, através da técnica de tandem, que obtiveram diagnóstico molecular utilizando DNA extraído através de um protocolo de extração orgânica (in-house) padronizado. Visto que é importante a detecção precoce das DLs, a demora do diagnóstico final pode acarretar em maior chances de manifestações irreversíveis. Com isso, um protocolo de extração padronizado, que utilize o mesmo cartão de coleta, otimiza o intervalo para a análise molecular e diminui a lacuna de tempo até o diagnóstico final. O protocolo de extração de DNA utilizado é uma adaptação da extração orgânica (Reliable extraction of DNA Whatman FTA cards), que utiliza fenol e clorofórmio como base para a extração, com otimização no número de picotes iniciais de 6 para 3 picotes. O DNA extraído é quantificado e avaliado em relação à pureza para a posterior realização de Sequenciamento de Nova Geração (NGS), através da abordagem Targeted Next-Generation Sequencing, utilizando painéis customizados que incluem os genes IDUA (MPS I), GLA (Doença de Fabry), GAA (Doença de Pompe), GALC (Doença de Krabbe) e GBA1 (Doença de Gaucher). Em alguns casos, faz-se necessário a realização do Sequenciamento de Sanger, para obtenção de uma cobertura total do gene em questão. A partir deste fluxo de trabalho, foi possível realizar a análise molecular de todos os casos inconclusivos encaminhados da triagem neonatal bioquímica e emitir um laudo diagnóstico. Os resultados mostram que a padronização do protocolo de extração orgânica utilizado proporciona a obtenção de um diagnóstico mais robusto e completo.

2230

COMPARAÇÃO DA EFICÁCIA ENTRE PROTOCOLOS PARA DIAGNÓSTICO DE COVID-19 POR RT-QPCR PARA AMOSTRAS COM BAIXA CARGA VIRAL

CATEGORIA DO TRABALHO: PESQUISA

Carolina Vaccari Batista, Vanise Pereira de Medeiros, João Vitor Barboza Cardoso, Victoria Kesting Ramos, Amanda Muliterno Domingues Lourenço de Lima, Gabriela Pasqualim, Ilma Simoni Brum da Silva
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INTRODUÇÃO: Durante a pandemia de COVID-19, houve um conjunto de esforços ao redor do mundo na elaboração de métodos para detecção do vírus SARS-CoV-2. Diferentes protocolos para detecção por RT-qPCR foram desenvolvidos. A alta taxa de mutação apresentada por este vírus pode afetar o anelamento dos reagentes, modificando o padrão de amplificação, o que pode causar variações nos resultados dos diferentes protocolos de diagnóstico. Diante do exposto, torna-se necessária a comparação de diferentes abordagens para o perfil mutacional de cada região do genoma viral. **OBJETIVO:** Comparar a eficácia de diferentes protocolos de RT-qPCR empregados para detecção de SARS-CoV-2 em amostras com carga viral baixa. **MÉTODOS:** Foram utilizadas 37 amostras de descarte diagnóstico para COVID-19 com resultados prévios (Allplex/CDC), destas, 5 negativas, 27 positivas com baixa carga viral (Ct >34) e 5 com alta carga viral (Ct <19). A integridade das mesmas foi avaliada pela amplificação da RNase P. As amostras foram analisadas com três protocolos diferentes simultaneamente. O kit Allplex 2019-nCoV Assay (Seegene, Coréia do Sul) foi aplicado conforme recomendações do fabricante. Para os protocolos CDC (EUA) e Charité foi utilizado AgPath-ID One-Step RT-PCR (Thermo Fisher Scientific, EUA), com volume final da reação de 15 µL. Utilizou-se o sistema QuantStudio-5. No teste Allplex, foi empregada uma curva padrão de quantificação absoluta utilizando-se o controle TaqPath COVID-19 Control (Thermo Fisher Scientific, EUA). As análises estatísticas foram realizadas pelo software IBM SPSS Statistics. **RESULTADOS:** Os testes Allplex, CDC e Charité apresentaram, respectivamente, sensibilidade de 93,75%, 78,13%, e 43,75% e valor preditivo negativo de 71,43%, 41,67% e 21,74% (não houve falsos-positivos). No kit Allplex, as amostras com baixa carga viral e sinal detectável para o gene N obtiveram de 1,46 a 142,7 cópias do genoma em 8 µL de amostra. Comparando-se com os resultados de diagnóstico, não foi encontrada diferença significativa para o ensaio Allplex, enquanto CDC e Charité diferem ($p < 0,03$, teste qui-quadrado e Monte Carlo). Avaliando os ensaios entre si, Charité apresentou maior número de falsos-negativos ($p < 0,015$, Teste Q de Cochran). **CONCLUSÕES:** Em nossas análises, o teste Allplex apresentou maior eficácia para amostras com carga viral baixa.