

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, autofagia e expressão gênica e proteica nos diferentes casos. Resultados. Não foram observadas diferenças na viabilidade e ciclo celular entre os grupos com e sem mutação. A autofagia parece diminuída em células com mutação; após o tratamento com rapamicina, o aumento do número de células autofágicas é maior no grupo com mutação ($p=0.039$). Ainda, um gene sensor de nutrientes na célula (GATSL2) e um gene pró-apoptótico (PRR5L) foram diferencialmente expressos entre os grupos com e sem mutação após o tratamento com rapamicina. No entanto, os níveis das proteínas correspondentes a esses genes, avaliados por Western Blot, não foram significativamente alterados entre os grupos. 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 TSC1 ou TSC2, e pode ser um dos processos celulares alvo no tratamento da esclerose tuberosa. Estudos com um número maior de indivíduos são necessários para avaliar a correlação entre os tipos de mutação e a resposta aos inibidores de mTOR, o que proporcionaria um tratamento personalizado para estes pacientes. Unitermos: Esclerose tuberosa; Inibidores de MTOR; Rapamicina.

P1234

Células-tronco: efeitos do lipopolissacarídeo bacteriano (Lps) na atividade celular

Raquel de Almeida Schneider, Tuane Nerissa Alves Garcez, Paula Barros Terraciano, Markus Berger, Débora Helena Zanini Gotardi, Isabel Cirne Lima de Oliveira Durlí, Cristiana Palma Kuhl, Fernanda dos Santos de Oliveira, Elizabeth Obino Cirne Lima, Emerson Antonio Contesini - HCPA

Introdução: Células-tronco mesenquimais (CTM) derivadas de tecido adiposo podem atuar como facilitadores dos processos de reparação e regeneração suprimindo a liberação de citocinas pró-inflamatórias e estimulando aquelas de natureza anti-inflamatória, regulando a resposta imunológica. Devido às propriedades imunomoduladoras inerentes a este tipo celular, estão em investigação clínica para uma variedade de aplicações terapêuticas. Recentemente tiveram atividade antibacteriana de amplo espectro demonstrada, porém os dados sobre a interação entre as células-tronco e os patógenos microbianos ainda são escassos. Objetivos: Investigar o impacto do lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) na proliferação celular, atividade metabólica e secreção de peptídeo mieloide antibacteriano porcino (PMAP-23) em cultura in vitro de CTM de tecido adiposo suínas. Metodologia: As CTM foram cultivadas com meio DMEM suplementado com 20% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico (penicilina/estreptomicina) em densidade 1×10^4 células/cm² em placas de 24 poços na terceira passagem. No terceiro dia (D0), as células foram incubadas com 10 µg/mL de LPS originado de *Escherichia coli* 0111:B4. No grupo controle, o meio foi suplementado com PBS em volume similar. A incubação com LPS foi mantida por curto tempo (1 dia após desafio) ou por longo tempo (7 dias após desafio). Após a incubação, as células foram testadas para determinar proliferação por ensaio com sulfurodamina, atividade metabólica por MTT e quantificação de PMAP-23 por ELISA. Resultados: A proliferação celular não foi afetada pelo LPS, porém a atividade metabólica mitocondrial aumentou na exposição a longo tempo ($p=0.001$). Além disso, a secreção de PMAP-23 aumentou nos grupos expostos ao LPS ($p<0.04$). Conclusão: Neste estudo, mostramos o impacto do lipopolissacarídeo (LPS) no aumento da atividade metabólica e da secreção PMAP-23 de CTM derivadas do tecido adiposo porcino, encorajando uma investigação adicional de seu potencial benefício terapêutico, mesmo em um ambiente rico em toxinas bacterianas. Unitermos: Célula-tronco mesenquimal; Antimicrobiano; LPS.

P1245

Efeito da estimulação magnética estática prévia na viabilidade e na morte celular de modelo in vitro da Doença de Parkinson

Martina Caroline Stapenhorst, Helouise Richardt Medeiros, Fernanda dos Santos de Oliveira, Iraci Lucena da Silva Torres, Paulo Roberto Stefani Sanches, Fábio Klamt, Elizabeth Obino Cirne-Lima - HCPA

Técnicas de estimulação magnética cerebral têm sido amplamente utilizadas no tratamento de doenças do sistema nervoso, como a doença de Parkinson (DP), mas seu real mecanismo de ação e efeito em modelos celulares carece de maiores investigações, principalmente no que concerne à DP. Além disso, o estudo de tratamentos neuroprotetores sobre modelos celulares da doença vem ganhando espaço, e a utilização de campos magnéticos estáticos para este fim ainda não está descrita. Desta maneira, o objetivo principal deste trabalho foi investigar os efeitos neuroprotetores da Estimulação Magnética Estática (EME) em células de neuroblastoma humano SH-SY5Y diferenciado com ácido retinoico com toxicidade induzida por 6-hidroxidopamina (6-OHDA). As células foram expostas por 24h à EME em um suporte para placas de 24 poços com ímãs cilíndricos NeFeB (neodímio-ferro-boro) a uma intensidade de 0,3 T e posteriormente tratadas com 6-OHDA. O projeto foi avaliado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) e aprovado sob registro nº 17-0670. A diferenciação celular foi confirmada pela projeção de neuritos emitidos pelas células. A viabilidade celular foi avaliada a partir do ensaio de MTT e a morte celular pela coloração com iodeto de propídeo (PI) e Hoescht_33342 (HO). A EME aplicada anteriormente ao tratamento com 6-OHDA aumentou a morte celular em comparação com o grupo que não sofreu o protocolo de estimulação magnética ($p<0,05$). Tal resultado aponta para uma possível sensibilização das células à 6-OHDA quando a EME é aplicada previamente. Estes achados ilustram a importância de estudos que avaliam a utilização dos campos magnéticos estáticos sobre modelos de células neuronais, para melhor compreensão de seu mecanismo de ação. Unitermos: 6-OHDA; Células SH-SY5Y; Neuroproteção.

P1257

Interação célula-tronco mesenquimal X PLGA/PIEPOX para desenvolvimento de neovagina: ensaios in vitro

Gabriela Barella Schmidt, Nicole Andréa Corbellini Henckes, Jaqueline Christine Dias Festa, Dalana Faleiro, Nayrim Brizuela, Luis Alberto Loureiro dos Santos, Paula Barros Terraciano, Eduardo Pandolfi Passos, Fernanda dos Santos de Oliveira, Elizabeth Obino - HCPA

Introdução: A Síndrome de Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser (MRKH) é caracterizada por agenesia completa ou parcial da vagina, requerendo reparação vaginal cirúrgica, que pode ser realizada em combinação com engenharia de tecidos. Neste sentido, ofertar alternativas terapêuticas mais eficientes e que minimizem os desconfortos das pacientes é necessário. Células-tronco mesenquimais (CTM) são conhecidas pela sua multipotencialidade, capacidade de diferenciação, propriedades imunomodulatórias e ação parácrina, pela secreção de diversos fatores. A associação de biomateriais às CTM podem promover o reparo tecidual de forma mais eficiente e segura contribuindo para uma cicatrização mais adequada e em menor tempo. Objetivo: Avaliar a capacidade de interação in vitro entre CTM e Poli ácido láctico-co-ácido glicólico(PLGA)/Poliisopreno epoxidado(Plepox) para uso na engenharia de

tecidos. Metodologia: O cultivo foi realizado em placas de 6 poços (2x10⁵ células/poço), e as células mantidas em Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM), suplementado com 20% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico. Para ensaios de caracterização as CTM foram diferenciadas em adipócitos, condrócitos e osteócitos. Análises de coloração de Periodic acid-Schiff (PAS) a fim de destacar a secreção de muco celular, avaliação da expressão de citoqueratina com anticorpo AE1/AE3 em microscopia confocal e avaliação estrutural de células associadas ao biomaterial por microscopia eletrônica de varredura (JEOL JSM 6060) foram realizadas. Projeto aprovado pelo comitê de ética HCPA (160527). Resultados: Com os resultados obtidos foi possível demonstrar a interação do PLGA/PlépoX com CTM, visualizando a adesão e morfologia adequada das células no biomaterial. Em paralelo, as análises revelaram que as MSC continham uma alta proporção de macromoléculas de carboidratos, o que é importante para a regeneração tecidual. As células mantiveram a expressão de citoqueratina, proteína específica presente nos tecidos normais. Conclusão: A combinação entre PLGA/PlépoX e CTM demonstra que o biomaterial é adequado para cocultura com o tipo celular testado. Este modelo, quando aplicado in vivo, pode vir a oferecer uma nova alternativa terapêutica para pacientes com a síndrome de MRKH. A viabilidade da combinação biomaterial e células ainda deve ser testada para investigar a eficácia e segurança do modelo, bem como garantir a possibilidade de utilização da combinação biomaterial + CTM para fins terapêuticos. Unitermos: Biomateriais; Células-tronco mesenquimais; Neovagina.

P1258

Caracterização de um novo inibidor peptídico de quimase: efeitos sobre alterações de permeabilidade, proliferação e migração de células vasculares

Marina da Silva Medeiros, Pamela Zanon, Manoella Pugliese, Rafael Lopes da Rosa, Lucélia Santi, Walter Orlando Beys da Silva, Hugo Verli, Renata Cristina de Souza Ramos, Jorge Almeida Guimarães, Markus Berger - HCPA

Introdução. O aumento de permeabilidade vascular, proliferação e migração de células vasculares ocorre em uma série de eventos hipertróficos associados a alterações cardiovasculares como hipertensão, insuficiência cardíaca ou aneurisma de aorta. A angiotensina II (Ang II), que tem sua produção aumentada em várias dessas condições, pode ser gerada por quimase proveniente não só de células vasculares, mas também de células inflamatórias como mastócitos e neutrófilos. Neste trabalho descrevemos a caracterização farmacológica de um novo inibidor peptídico de serino-proteinases obtido das sementes de *Canavalia ensiformes* capaz de inibir quimase de mastócitos e de células da musculatura lisa de aorta. Metodologia. O inibidor foi isolado por métodos de cromatografia líquida e caracterizado por espectrometria de massas. 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). O projeto está aprovado no CEUA-HCPA 17-0333. Resultados. O inibidor (denominado CETI) foi purificado por cromatografia de troca aniônica e afinidade. Possui massa molecular de 8173 daltons, é um trímero em solução aquosa, a estrutura é rica em cisteínas, resistente à variações de temperatura e pH e apresenta duas alças inibitórias, uma capaz de bloquear tripsina (IC₅₀ = 21,68 nM) e outra capaz de bloquear quimase (IC₅₀ = 13,80 nM). É um inibidor não-competitivo de ligação rápida e forte para tripsina e um ligante tempo-dependente capaz de bloquear quimase de maneira competitiva. CETI é capaz de bloquear a atividade tipo-quimase de mastócitos isolados do peritônio de ratos previamente estimulados com carragenina e reduzir a permeabilidade vascular induzida pelo composto 48/80 in vivo. Quando cultivadas em meio hiperglicêmico (glicose 25 mM) houve um aumento da atividade de quimase em células vasculares e também aumento na capacidade de proliferação e migração dessas células. O tratamento prévio das células vasculares com CETI inibiu significativamente esses efeitos. Conclusão. O CETI reduz a permeabilidade, a proliferação e a migração mediadas por quimase em células vasculares, provavelmente por reduzir a formação de Ang II. Como a migração dependente de quimase induzida por Ang II envolve a geração de espécies reativas de oxigênio intracelular e óxido nítrico, experimentos estão em andamento para verificar os efeitos do CETI sobre esses eventos. Unitermos: Quimase; Inibidor; Vascular.

P1259

Análise proteômica da infecção causada por *Cryptococcus gattii*: alterações metabólicas e suas consequências para a progressão da patologia em pulmões de ratos experimentalmente infectados

Rafael Lopes da Rosa, Markus Berger, Lucélia Santi, Walter Orlando Beys-da-Silva, Jorge Almeida Guimarães - UFRGS

Introdução: *Cryptococcus gattii* é o agente causador da criptococose, caracterizada como uma infecção oportunista que pode levar à pneumonia e meningite em indivíduos imunocompetentes. Estes efeitos são possíveis devido a capacidade do *C. gattii* evadir o sistema imunológico. No entanto, a base molecular do processo patogênico e o impacto no perfil metabólico do hospedeiro são pouco investigados e permanecem desconhecidos. Objetivo: Neste contexto, o presente trabalho buscou realizar uma análise abrangente do proteoma diferencial da infecção por *C. gattii* em pulmões de ratos. Metodologia: Toda a experimentação com animais foi aprovada pelo CEUA UFRGS nº 17423. Foram analisados dois grupos de ratos Wistar machos (n = 6/ grupo): um grupo infectado com a cepa R272 hipervirulenta de *C. gattii* e outro inoculado com a cepa avirulenta capΔ67 de *C. neoformans*. Após três dias, os pulmões dos ratos foram coletados, processados e realizada análise do proteoma em espectrômetro de massas pela técnica de MudPIT, a fim de identificar proteínas diferencialmente reguladas em cada uma das condições. Posteriormente, o proteoma resultante foi caracterizado através de ferramentas de bioinformática para identificar as vias bioquímicas e processos moleculares alterados durante a infecção. Os resultados foram validados in vitro, em ensaios de co-cultura de *C. gattii* com fibroblastos de pulmão de ratos (linhagem MRC-5), e in vivo, pela dosagem de biomarcadores no pulmão dos animais infectados. Resultados: Os resultados apontaram para uma mudança significativa na expressão proteica de pulmões infectados, principalmente em proteínas relacionadas ao metabolismo bioenergético. As principais vias afetadas incluem o ciclo glicolítico, o ciclo de Krebs, o metabolismo de pirimidina e purina, onde a maior parte de suas proteínas correspondentes foram encontradas reguladas positivamente. Os ensaios de co-cultura de *C. gattii* com células MRC-5 e análises bioquímicas de extratos pulmonares infectados confirmaram o estado metabólico alterado. Os níveis elevados de lactato desidrogenase (LDH) e de lactato demonstram que o tecido pulmonar infectado por *C. gattii* se encontra em anaerobiose, uma forma muito menos eficiente de obtenção energética, podendo levar o tecido a uma alta taxa de absorção de glicose como compensação. Conclusão: Os resultados aqui obtidos reforçam a importância das alterações no metabolismo bioenergético durante a infecção pulmonar por *C. gattii*. Unitermos: *Cryptococcus gattii*; Infecção; Proteoma.