

DETERMINAÇÃO DAS FRAÇÕES DE *COPAIFERA RETICULATA*, DUCKE ENRIQUECIDAS EM BIOMOLÉCULAS ANTINEOPLÁSICAS (PROJETO)

DOMINGUES, P. S.; FUKUMASU, H.

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP).

Introdução: Durante as últimas décadas o câncer de pulmão em humanos tornou-se uma das principais causas de morte por todo o mundo, com maior frequência do que outros cânceres. Mesmo com os avanços científicos das terapias para a doença, há a necessidade de se encontrar novas formas de tratamento e prevenção. Como alternativa, existem substâncias quimiopreventivas do câncer. Uma fonte de grande interesse para a obtenção desses compostos é atribuída às plantas. O óleo de copaíba extraído da espécie *Copaifera reticulata*, Ducke apresenta, assim como óleos de outras espécies de copaíferas, várias indicações medicinais. Estudos atribuem ao óleo atividade anti-inflamatória e antitumoral. Desse modo, foi efetuado o seu fracionamento para avaliação das suas biomoléculas com estudo do efeito citotóxico e pró-apoptótico em cultivo de células humanas não cancerosas (HPL) e células cancerosas de pulmão humano (H460 e H2023). **Métodos:** As amostras do óleo serão fracionadas por cromatografia em camada delgada. Depois, cada fração será analisada e identificada por espectrometria de massas. O teste de viabilidade celular utilizará o corante Azul de Tripan e a contagem será realizada em câmara de Neubauer. Cada tipo de célula terá o seu comportamento avaliado após o tratamento nas placas de 96 poços para cada fração do óleo de copaíba. A avaliação da citotoxicidade da fração do bálsamo que melhor apresentar resultados será efetuada por um ensaio colorimétrico utilizando o MTT reagent (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide) para calcular a dose que inibirá 50% das células (IC₅₀). A análise do ciclo celular será realizada por citometria de fluxo para resultados em % de células nas fases G₀/G₁, S ou G₂/M. A taxa de células em apoptose será avaliada pelo método de quantificação de apoptose pela técnica de fluorescência com Laranja de Acrídina e Brometo de Etídio. **Resultados Esperados:** Esperamos identificar e avaliar as biomoléculas antineoplásicas do óleo em linhagens de células de câncer de pulmão humano, uma vez que a determinação de novos compostos é essencial para o desenvolvimento de drogas na corrida por novas alternativas no tratamento e na intervenção terapêutica do paciente oncológico. Os resultados serão dispostos como média e desvio padrão, analisados estatisticamente por testes não paramétricos, dependendo dos grupos em questão, considerando-se $p < 0,05$. **Conclusão:** Em razão da necessidade do desenvolvimento de novas drogas contra o câncer, o desenvolvimento deste trabalho agregará dados que poderão contribuir para a identificação de novas terapias antineoplásicas. Este estudo também poderá contribuir para ressaltar e valorizar a necessidade da certificação científica dos produtos fitoterápicos existentes e provenientes da flora amazônica brasileira.

ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DE PULMÕES DE COBAIAS (*CAVIA PORCELLUS*) MANTIDAS EM SISTEMA DE VENTILAÇÃO MICROAMBIENTAL SOB DIFERENTES REGIMES DE TROCA DE AR POR HORA

RODRIGUES, R.; CARISSIMI, A. S.

Departamento de Medicina Animal, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Introdução: Nos últimos anos, é cada vez maior o emprego de sistemas de ventilação forçada (ventilação microambiental - VMA) para a manutenção de espécies de animais de laboratório, visando proporcionar um ambiente mais controlado e adequado no interior das gaiolas dos animais. A despeito do uso e desempenho desses sistemas de VMA estarem sendo investigados, ainda se conhece pouco em relação às velocidades de ar e trocas de ar adequadas para cada espécie animal. Dessa forma, o presente trabalho avaliou a incidência de lesões no pulmão de cobaias (*Cavia porcellus*) mantidas em diferentes regimes de troca de ar por hora (ACH). **Métodos:** Dezoito cobaias, fêmeas jovens, com peso médio de 250g, colônia Duncan-Hartley, foram divididas em três grupos e alojadas em gaiolas com três animais cada em um protótipo de ventilação microambiental dotado de ajuste mecânico de vazão de ar. Os grupos foram alojados em condições de troca de ar por hora, como segue: grupo controle com regime de 15 trocas de ar por hora, grupo experimental I, com regime de 40 trocas de ar por hora e grupo experimental II, com regime de 80 trocas de ar por hora. Os animais foram mantidos durante 90 dias nas condições descritas e submetidos à rotina de manejo no Biotério Central da UFRGS. Ao término do período de alojamento, os animais foram eutanasiados com pentobarbital (via intraperitoneal, 150 mg/kg) e, a seguir, foi efetuada a coleta de fragmento pulmonar (pulmão direito, lobo médio). O processamento do material foi realizado conforme técnicas de rotina histológica com avaliação por microscopia ótica, após coloração por Hematoxilina-eosina. **Resultado:** A análise histopatológica evidenciou maior número e intensidade de lesões nos animais pertencentes ao grupo experimental II (com 80 ACH), no qual foi observada a presença de hiperplasia de tecido linfóide peribronquiolar e focos de pneumonia purulenta multifocal, além de áreas de enfisema, o que não foi notado nos grupos controle e experimental I (com 40 ACH), nos quais foram observadas congestão e algumas células gigantes nos alvéolos, com sugestiva vantagem para o grupo experimental II. **Conclusão:** Os resultados obtidos sugerem que o regime mais adequado de trocas de ar por hora no interior das gaiolas das cobaias seja de 40 trocas de ar por hora, e que um regime com mais trocas de ar por hora é deletério para os animais. **Apoio Financeiro:** Pró-Reitoria de Pesquisa – UFRGS.

DETECÇÃO DE FUNGOS EM NEOPLASIAS E SUA POSSÍVEL RELAÇÃO COM A MALIGNIDADE (PROJETO EM ANDAMENTO)

RANIERI, T.¹; ROCHETTI, A.²; FUKUMASU, H.²

¹Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP); ²Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo (FZEA-USP).

Introdução: Os estudos com células neoplásicas demonstram que estas são fenotipicamente distintas entre si, apresentando diferentes características morfológicas, bioquímicas e fisiológicas, podendo ainda exibir características individualizadas quanto ao desenvolvimento e comportamento. A compreensão das interações entre as células e os diferentes compostos da matriz extracelular tornou-se essencial para a caracterização da complexidade do desenvolvimento

neoplásico e das suas possíveis respostas aos diferentes tratamentos antineoplásicos disponíveis. Estudos anteriores demonstraram que pode haver desenvolvimento de fungos em amostras de tecido neoplásico de diferentes órgãos isolados em excisões cirúrgicas. Fungemias são reconhecidas e recorrentes em pacientes oncológicos humanos imunossuprimidos. Muitos casos são negligenciados por acreditar-se que a imunossupressão é a causa da fungemia letal. Portanto, neste experimento pretende-se avaliar qualitativamente a presença de fungos em cortes histológicos de neoplasias mamárias de cadelas e analisar sua possível associação com o grau de malignidade. **Materiais e métodos:** O experimento retrospectivo inicial visa analisar 100 amostras de neoplasias mamárias caninas por histopatologia e microscopia de fluorescência com a utilização de Hematoxilina/Eosina (HE), Hidróxido de Potássio (KOH) a 10% com Calcofluor White e possivelmente outras colorações para detecção direta de fungos que serão realizadas em cortes seriados. **Resultados Preliminares:** Foi padronizada a colorização Calcofluor White para detecção de fungos em cortes histológicos conservados em parafina e também para aplicação em cultivos celulares. A melhor diluição obtida de KOH 10% e Calcofluor White foi de 2:1, respectivamente. Cortes histológicos foram desparafinizados e, após a passagem pelo álcool 70% e uma breve secagem, 150µl de KOH 10% foram adicionados, cobrindo o corte. Após um minuto, 75µl de Calcofluor White foram colocados sobre o KOH 10%, permanecendo por mais um minuto. O esgotamento da lâmina não deve ser realizado usando papel. Cobriu-se com lâmina e observou-se ao microscópio U.V. Foram realizadas fotomicrografias. O experimento piloto contou também com ensaios em células de cultivo, nos quais a quantidade de KOH 10% em cada poço foi 100µl e de Calcofluor White, 50µl. O processo foi realizado na própria placa de cultivo. Após o tempo indicado, retirou-se a lâmina com cuidado e essa foi colocada com a face invertida na lâmina para observação e registro. Iniciaremos a seguir a coloração e análise das primeiras 25 amostras de neoplasias mamárias caninas. Devido à difícil detecção direta de fungos em tecidos, é possível que o segmento desse experimento seja o cultivo. **Apoio Financeiro:** CNPq

MODULAÇÃO DA COMUNICAÇÃO INTERCELULAR VIA JUNÇÕES DO TIPO GAP NAS CÉLULAS ESTRELADAS HEPÁTICAS EM MODELOS 3D DA DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA NÃO ALCOÓLICA (PROJETO)

ARAÚJO, C. M. M.¹; SILVA, T. C.¹; VINKEN, M.²; COGLIATI, B.¹

¹ Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP), Brasil; ² Faculty of Medicine and Pharmacy, Vrije Universiteit Brussel, Bélgica.

Introdução: a doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) está relacionada à obesidade e pode evoluir de esteatose para esteatohepatite (ENA), fibrose, cirrose e carcinoma hepatocelular. A esteatose é considerada como um importante fator de risco na progressão da fibrose, principalmente pela secreção de citocinas e fatores de crescimento pelos hepatócitos gordurosos. A liberação parácrina dessas substâncias favorece a ativação e proliferação das células estreladas (CEHs), principais células envolvidas na fibrogênese hepática. Diversas drogas e tratamentos experimentais vêm sendo desenvolvidos para modular a atividade funcional das CHEs, sendo a comunicação intercelular via junções GAP um importante alvo terapêutico. A comunicação intercelular das células estreladas é realizada via junções do tipo GAP, mediadas pela conexina 43 (Cx43), possibilitando o livre trânsito de pequenas moléculas, metabólitos e mensageiros secundários, com papel importante na regulação da função e homeostasia celular. No entanto, os

mecanismos celulares e moleculares associados à inibição desses canais e redução da expressão de Cx43 nas CHEs ainda não são conhecidos. Modelos *in vitro* que utilizam o cocultivo de hepatócitos e CEHs podem simular alguns aspectos fisiopatogênicos da DHGNA, reduzindo o uso de animais de experimentação nos testes pré-clínicos e acelerando o processo de descoberta de novas moléculas. O modelo de cocultivo 3D em esferoides foi recentemente padronizado pelo grupo e mimetiza o microambiente encontrado no fígado, permitindo a interação de diferentes células e seus subprodutos. **Objetivos:** avaliar a participação da comunicação intercelular via junções do tipo GAP na funcionalidade das CHEs e, conseqüentemente, sua potencialidade como alvo terapêutico em um modelo 3D da DHGNA. **Métodos:** o modelo 3D será obtido pelo cocultivo de linhagens de hepatócitos C3A e CHEs LX2 humanas (48h, MEM 10% SFB). Os grupos analisados compõem esferoides formados com hepatócitos normais ou induzidos à esteatose pela incubação com ácidos graxos livres. As CHEs serão tratadas com siRNA para Cx43 ou inibidores farmacológicos das junções GAP (carbenoxolona e Gap27), antes da formação dos esferoides. Esses cocultivos 3D serão submetidos à avaliação funcional da comunicação intercelular, para garantir a efetividade da inibição das junções GAP, sendo depois avaliados por citometria de fluxo para análise do ciclo celular, proliferação e apoptose. Adicionalmente, serão avaliadas as conexinas 43, 26 e 32 pelas técnicas de imunofluorescência, western blot e PCR em tempo real. **Apoio Financeiro:** CAPES.

DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE NEOPLASIA MALIGNA DE CÉLULAS REDONDAS INTESTINAL EM CÃO (CANIS LUPUS FAMILIARIS)

GOMES, R. G.; LACERDA, A. M. D.; SILVA, E. C.; RODRIGUES, D. M.; DAGLI, M. L. Z.; TORRES, L. N.

Serviço de Patologia Animal, Hospital Veterinário (HOVET), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP).

Introdução: O sistema gastrointestinal de cães pode ser acometido por neoplasias malignas de várias origens, como adencarcinomas, tumores estromais e de células redondas. Dentre as neoplasias intestinais originadas de células redondas, o linfoma é a mais comum. **Relato de Caso:** um cão macho de cinco anos de idade da raça Shar-Pei foi atendido na Clínica Cirúrgica do HOVET-FMVZ/USP, com histórico de êmese e diarreia há seis meses, com piora há um mês. O exame ultrassonográfico revelou espessamento de parede segmentar de alça intestinal com perda da estratificação, contornos irregulares, ecogenicidade diminuída e linfonodos mediastinais com dimensões aumentadas. Foi efetuada a enterectomia parcial, e o segmento acometido e um fragmento de linfonodo mesentérico foram encaminhados para realização de exame histopatológico. Ao exame macroscópico do segmento, foi observado um aumento de volume com superfície lisa nodular, aspecto heterogêneo, coloração esbranquiçada e consistência firme. À microscopia, foi observada uma ulceração com infiltração neoplásica transmural de células redondas com pleomorfismo celular e moderado infiltrado de eosinófilos intratumorais. O fragmento de linfonodo revelou infiltração neoplásica semelhante à da alça, com marcante infiltrado eosinofílico. O diagnóstico morfológico foi compatível com neoplasia maligna de células redondas pouco diferenciada. O exame imunoistoquímico pelos marcadores C-kit, CD79 A e CD3 apresentou resultados negativos para C-kit e CD79 A, e positivo para CD3. A morfologia e a imunofenotipagem caracterizaram a neoplasia como linfoma intestinal de células T. **Discussão:** A forma mais comum dos linfomas em cães é a multicêntrica e a forma intestinal primária é a menos frequente (5% a 7%).