

- Oncologia experimental e comparada

42.001

ESTUDO DA RESISTÊNCIA A MÚLTIPLAS DROGAS NO LINFOMA CANINO <sup>1</sup> Rezende, B. C. G. ; <sup>2</sup> Levy, D. ; <sup>3</sup> Bydlowski, S. P. ; <sup>1</sup> Lucas, S. R. R. ; <sup>1</sup> Clínica Cirúrg. Veterinária - CCA, FMVZ-USP; <sup>2</sup> Hematologia - HCFMUSP; <sup>3</sup> Clínica Médica - FMUSP

**Objetivo:**

Uma das causas mais freqüentes de insucesso terapêutico do câncer está associada à Resistência a Múltiplas Drogas (MDR). A resistência a múltiplas drogas refere-se ao desenvolvimento de resistência simultânea a uma variedade de agentes citotóxicos que apresentam diferentes sítios de ação e estruturas químicas diversas. Os mecanismos MDR são representados por genes cujos produtos funcionam como bombas, reduzindo o acúmulo intracelular de drogas e a resposta ao tratamento. O linfoma canino é uma neoplasia comum na espécie, sendo muito responsiva à quimioterapia, embora a recidiva seja esperada e possa estar relacionada ao MDR. O presente estudo teve como objetivo avaliar a expressão dos genes MDR-1, MRP e LRP e de seus produtos, em cães com linfoma.

**Métodos e Resultados:**

Foram colhidas amostras de linfonodos periféricos de 15 cães com linfoma multicêntrico ao diagnóstico e na recidiva (durante a quimioterapia). A expressão dos genes e proteínas MDR foram determinados por RT-PCR e "Dot Blotting", respectivamente. As freqüências de expressão ao diagnóstico dos genes MDR, MRP e LRP foram 93,3% igualmente e as freqüências de seus produtos foram 85,8%; 71,5% e 85,8% respectivamente. Na recidiva, as freqüências de expressão dos genes MDR, MRP e LRP elevaram-se para 100% igualmente e as freqüências de suas proteínas foram 92,9% para P-gp e MRP e de 100% para LRP.

**Conclusões:**

Houve uma alta freqüência na expressão do MDR-1/P-gp, MRP e LRP, em quase todos os cães, não só na recidiva, como também ao diagnóstico. É necessário verificar se estes mecanismos podem induzir o fenótipo MDR no linfoma canino multicêntrico. O estudo dos mecanismos MDR trará novas perspectivas para o tratamento de tumores como o linfoma canino. A modulação desses mecanismos por meio de drogas específicas ou por terapia gênica, pode contribuir para o sucesso do tratamento de neoplasias caninas e humanas

42.002

ESTUDOS DOS EFEITOS CITOTÓXICOS E DA ADESÃO CELULAR DA HEPARINA (HBPM) ASSOCIADA AO PACLITAXEL E ETOPOSIDO NO MELANOMA B16F10. Lapetina, D. L.; Capitanio, J. S. ; Maria, D. A.; Bioquímica e Biofísica, Butantan

**Objetivo:**

Heparinas de baixo peso molecular (HBPM), sulfato de heparina e glicosaminoglicanos, podem inibir a invasão de células tumorais, possivelmente pela interação com os fatores de crescimento vascular, moléculas de adesão. Neste trabalho foi avaliado o potencial citotóxico e a perda da adesão celular através do uso de HBPM no tratamento do melanoma B16F10 associada a quimioterápicos inibidores da topoisomerase II (Etoposido) e da polimerização dos microtúbulos (Paclitaxel).

**Métodos e Resultados:**

A atividade citotóxica foi realizada através do método de MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide), em cultura linhagem de melanoma B16F10, cultivadas em placas de 96 orifícios. As células B16F10 foram cultivadas por 24 hs na presença ou ausência de HBPM em diferentes concentrações (0.001 a 80µ g/ml) associada aos quimioterápicos, Paclitaxel (269 à 0,262 µ g/ml) e Etoposido, (200 à 0,20µ g/ml). A adesão celular foi avaliada após o tratamento com HBPM, Paclitaxel e Etoposido, pelo método do cristal de violeta. A HBPM não apresentou atividade citotóxica sobre células de melanoma B16F10 após 24 hs de tratamento, ainda quando associada ao Paclitaxel ou Etoposido não apresentou efeito sinérgico significativo sobre atividade citotóxica ou na perda da adesão celular. O uso do etoposido mostrou efeito significativo na perda da adesão celular nas doses 0.38µ g/ml e 200µ g/ml surtindo efeitos citotóxicos, bem como o paclitaxel nas doses 33,6µ g/ml e 269µ g/ml.

**Conclusões:**

Não foi observado efeitos sinérgicos significativos na associação de quimioterápicos com HBPM

42.003

ESTRESSE OXIDATIVO EM CÉLULAS DE PACIENTES COM LEUCEMIA MIELOÍDE CRÔNICA (LMC) <sup>1</sup> Casolari, D. A. ; <sup>1</sup> Teixeira, S. A. ; <sup>2</sup> Castro, N. S. ; <sup>2</sup> Almeida, S. ; <sup>2</sup> Barros, J. C. ; <sup>2</sup> Chiattoni, C. S. ; <sup>1</sup> Muscara, M. N. ; <sup>1</sup> Zyngier, S. B. ; <sup>1</sup> Tostes, R. C. ; <sup>1</sup> Farmacologia - ICB I-USP; <sup>2</sup>, Santa Casa de Misericórdia

**Objetivo:**

Avaliar a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e a expressão de enzimas pró e antioxidantes em células do sangue de pacientes com LMC ainda não submetidos a tratamento (grupo LMC) e em tratamento com imatinib (inibidor da BCR-ABL, proteína responsável pelas anormalidades da LMC) (grupo LMC-STI).

**Métodos e Resultados:**

A produção do ânion superóxido ( $O_2^{\bullet -}$ ) foi medida por espectrofotometria da reação de redução do ferricitocromo-c inibível pela superóxido dismutase (SOD) nos grupos celulares: linfomononucleares (LM) e polimorfonucleares (PMN). As expressões gênica e protéica da enzima catalase e das subunidades gp91<sup>phox</sup>, p22<sup>phox</sup> e p47<sup>phox</sup> da enzima NADPH oxidase, foram avaliadas por RT-PCR e Western blot, respectivamente. A geração de  $O_2^{\bullet -}$  após estímulo com éster de forbol (PMA) foi maior ( $P < 0,05$ ) em LMC (LM –  $7,61 \pm 0,71$  nmol $O_2^{\bullet -}$ /10<sup>6</sup>cél; PMN –  $11,46 \pm 0,75$  nmol $O_2^{\bullet -}$ /10<sup>6</sup>cél) em relação aos voluntários saudáveis (LM –  $3,32 \pm 0,55$  nmol $O_2^{\bullet -}$ /10<sup>6</sup>cél; PMN –  $7,60 \pm 1,93$  nmol $O_2^{\bullet -}$ /10<sup>6</sup>cél) e aos LMC-STI (LM –  $3,76 \pm 0,45$  nmol $O_2^{\bullet -}$ /10<sup>6</sup>cél; PMN –  $3,19 \pm 1,10$  nmol $O_2^{\bullet -}$ /10<sup>6</sup>cél). A geração de  $O_2^{\bullet -}$  pelas PMN dos LMC-STI também foi menor ( $P < 0,05$ ) que a dos saudáveis (valores acima). Não foram encontradas diferenças na expressão da enzima catalase, ou das subunidades gp91<sup>phox</sup> e p22<sup>phox</sup> da enzima NADPH oxidase entre os grupos. Apenas a expressão protéica da subunidade p47<sup>phox</sup> mostrou-se diminuída ( $P < 0,05$ ) nos LMC-STI (controle –  $9,8 \pm 1,8$ ; LMC –  $15,3 \pm 2,8$ ; LMC-STI –  $1,5 \pm 1,5$ ).

**Conclusões:**

A geração de  $O_2^{\bullet -}$  pelas células dos pacientes com LMC sem tratamento é maior que a dos voluntários saudáveis e dos pacientes em tratamento com imatinib. No entanto, não pode-se relacionar esse aumento com maior expressão gênica e protéica da enzima pró-oxidante NADPH oxidase, nem com menor expressão gênica da enzima antioxidante catalase.

42.004

ESTRESSE OXIDATIVO NA PLACENTA DE RATAS PORTADORAS DO CARCINOSSARCOMA DE WALKER 256 Toledo, M. T.; Cruz, B. L. G.; Marcondes, M. C. C. G.; Fisiologia e Biofísica – IB-UNICAMP

**Objetivo:**

Neste trabalho avaliou-se os efeitos diretos e indiretos promovidos pelo crescimento do tumor de Walker (W) e o estresse oxidativo tecidual placentário durante o 16º, 19º e 21º dia do período gestacional. Prejuízo nas trocas metabólicas materno-fetal devido a alterações morfológicas e bioquímicas placentárias estão associadas ao tumor e/ou inoculação de líquido ascítico (1).

**Métodos e Resultados:**

Ratas Wistar prenhes (n=45) distribuídas em grupos: controle (C), implantadas com tumor (W) e inoculadas com líquido ascítico (A) foram sacrificadas no 16º, 19º e 21º dia de prenhez. Tecido placentário foi avaliado quanto ao conteúdo protéico, atividade das enzimas fosfatase alcalina (FA), glutatona-S-transferase (GST) e catalase (CAT) e conteúdo de malondialdeído (MDA). No 16º dia, houve redução do conteúdo protéico placentário das W (64,43%) e A (67,57%), redução da atividade FA, no grupo W16 (51,43%), redução da atividade GST (50,72%) e CAT (43,75%) no grupo A16. No 19º dia, houve redução do conteúdo protéico placentário (25,41%), tendência a redução FA nos grupos W19 e A19, aumento da atividade CAT (255%) e aumento do MDA (125%) no grupo W19. No 21º dia, houve redução do conteúdo protéico placentário, porém não significativa nas fêmeas prenhes inoculadas com líquido ascítico (A21).

**Conclusões:**

Nossos resultados indicam que as placentas das ratas A e W sofreram influência direta ou indireta (líquido ascítico) de fatores produzidos pelo tumor durante a prenhez, evidenciados pelo aumento do estresse oxidativo e redução da atividade das enzimas antioxidantes, principalmente, nos 16º e

19º dias. A redução do conteúdo protéico placentário associada a redução da atividade das enzimas antioxidantes é indicativo de falha do sistema antioxidante em neutralizar os fatores secretados ou efeito direto do metabolismo tumoral, durante a gestação, ocasionando prejuízos irreversíveis ao crescimento fetal e placentário.

1) Oncol Res 11: 359-366,1999.

42.005

EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE LEUCINA E VITAMINA C SOBRE O PERFIL SÉRICO DE RATOS PORTADORES DE TUMOR DE WALKER 256 Marcondes, T. C.; Alferes, L. M. T.; Cruz, B. L. G.; Ventrucchi, G.; Marcondes, M. C. C. G.; Fisiologia e Biofísica - IB, UNICAMP

**Objetivo:**

Avaliar o perfil sérico em ratos portadores de tumor de Walker (T) e o efeito da suplementação da leucina (L) e vitamina C (V) na dieta.

**Métodos e Resultados:**

Ratos jovens inoculados ou não com tumor foram distribuídos em grupos de acordo com a dieta que receberam: ratos com dieta normoprotéica (C), ratos portadores de tumor e dieta normoprotéica (T), portadores de tumor e dieta suplementada com leucina e vitamina C (TVL), com tumor e dieta suplementada com leucina (TL) e com tumor e dieta suplementada com vitamina C (TV). Após 13 dias da inoculação do tumor analisou-se o perfil sérico dos diferentes grupos experimentais. O teor de glicose nos animais com tumor reduziu em 61% nos T, 34% nos TVL, 33% nos TL e 81% nos TV. No entanto, os grupos TVL e TL a glicemia foi elevada em cerca de 73% comparada ao T. Houve redução do teor de proteína total, em 21%, e de albumina, em 30%, nos T. Os TL recuperaram o teor sérico de proteína total (em 22%) e de albumina (em 15%), enquanto que nos TVL a recuperação foi de 18% e nos TV foi de 19%. A recuperação do teor de albumina foi de 15% nos TL, 20% nos TVL e apenas 9% no grupo TV. O teor sérico de globulina foi aumentado nos grupos com suplementação nutricional (13% nos TVL, 30% nos TL e 31% nos TV).

**Conclusões:**

A associação entre suplementação nutricional (leucina e vitamina C) com crescimento tumoral induziu melhora no teor sérico de proteína total, de albumina, de globulina e principalmente no teor de glicose sérica.

42.006

CHEMOPREVENTIVE EFFECTS OF PAULLINIA CUPANA MART. VAR. SORBILIS, THE GUARANÁ, ON MOUSE HEPATOCARCINOGENESIS. <sup>1</sup> Fukumasu, H.; <sup>1</sup> Silva, T. C.; <sup>1</sup> Avanzo, J. L.; <sup>1</sup> Lima, C. E.; <sup>1</sup> Mackowiak, II; <sup>2</sup> Atroch, A.; <sup>1</sup> Spinosa, H. D. S.; <sup>3</sup> Moreno, F. S.; <sup>1</sup> Dagli, M. L. Z.; <sup>1</sup> FMVZ - Patologia, USP; <sup>2</sup> Agronomia, EMBRAPA; <sup>3</sup> Farmácia e Farmacologia, FCF - USP

**Objetivo:**

*Paullinia cupana* (the guaraná), belongs to the Sapindaceae family and it is original from Amazonia, Brazil where the Saterê-Maué Indians have used it for many years as a stimulant. It is used in the composition of several phytoproducts, like non-alcoholic beverages, tonics, anti-stress capsules and others. Besides several studies about plants related to cancer chemoprevention, to our knowledge there are no studies investigating the chemopreventive effects of this Brazilian plant. The aim of this study was to verify the effects of guaraná, supplied in three different doses: 0.1, 1.0 and 2.0 mg/g BW (milligram of per gram of body weight) on mouse hepatocarcinogenesis.

**Métodos e Resultados:**

Female mice were treated with *N*-nitrosodiethylamine (DEN), received 3 different doses of *P. cupana* added to commercial food, and euthanized after 25 weeks. Gross lesions were quantified, and preneoplastic lesions (PNL) were histologically measured. Cellular proliferation was evaluated by immunoblotting for the proliferating cell nuclear antigen (PCNA).

After macroscopic evaluation, animals that received control diet showed a 100% incidence of lesions. The other groups showed minor incidence of gross lesions if compared with control, and the animals treated with 2.0 mg/g of BW showed a 50% statistically decrease ( $p=0.0325$ ) in the lesion incidence in comparison to untreated animals. After *P. cupana* treatment, a significant reduction in multiplicity ( $P<0.05$ ) was observed. This reduction was higher in the group treated with 2.0 mg/g of BW ( $P<0.01$ ) of guarana. The mean number of preneoplastic lesions is reduced in 2.0 mg *P. cupana*/g BW treated mice ( $P<0.05$ ). A significant reduction of basophilic lesions was shown

in the group treated with 2.00 mg *P. cupana*/g BW. Lower reduction on clear cell preneoplastic lesions was observed in all treated guaraná groups ( $p < 0.05$ ). No eosinophilic or mixed preneoplastic lesions were found. Analyses of the immunoblot membrane for PCNA expression have shown that animals treated with *P. cupana* presented a decreased PCNA expression ( $p < 0.05$ ) in the concentration of 2.0 mg *P. cupana*/g BW.

**Conclusões:**

This article describes, for the first time that *P. cupana* can act as a chemopreventive on carcinogenesis, reducing cellular proliferation of preneoplastic cells. New studies will be necessary to evaluate the metabolic and activation pathways that the substances presented in *P. cupana* must be modulating inside the cell in order to achieve these results.

42.007

SIALIC ACID AND N-ACETYLGALACTOSAMINE RESIDUES IN COLORECTAL CANCER<sup>1</sup>  
Redondo, P. A.;<sup>2</sup> Nakamura, C. V.;<sup>3</sup> Takyia, C. M.;<sup>4</sup> Junqueira, M. R. \*\*;<sup>4</sup> Domont, G. B.;<sup>5</sup> de Souza, W.;<sup>1</sup> Morgado-Diaz, J.;<sup>1</sup> Biologia Celular, INCa-RJ;<sup>2</sup> Análises Clínicas, UEM;<sup>3</sup> Ciências Morfológicas, UFRJ;<sup>4</sup> Bioquímica - UFRJ;<sup>5</sup> Biofísica, UFRJ

**Objetivo:**

Several studies have shown differential expression of cell surface carbohydrates in cancer, however, results are often contradictory. The aim of this study is to compare the carbohydrate expression profile through lectin labeling on the surface of normal and cancerous intestinal epithelial cells.

**Métodos e Resultados:**

In this work, we initially showed surface sugar residues expression by lectin cytochemistry visualized by fluorescence, transmission and scanning electron microscopy in three intestinal epithelial cell lines with different metastatic potential: IEC-6, normal, Caco-2, moderately invasive and HCT-116, highly invasive. We focused our research on WGA and HPA labeling, which presented notable differences between normal and cancerous cell lines. WGA labeling was more intense according to the metastatic potential of the cell line, as quantified by backscattered electron images. Isolated plasma membrane fractions were blotted with peroxidase conjugated lectins, corroborating the cytochemistry results. Although HPA did not show significant quantitative differences between the moderately and highly invasive cell lines, a protein of approximately 25kD whose reactivity increased with their metastatic potential was identified. Aiming to correlate these results with *in vivo* data, normal and tumor samples from colorectal patients were analyzed. Preliminarily, lectin labeling differences in tissue samples were showed by confocal and transmission electron microscopy. WGA and HPA blotting of tissue plasma membrane fractions revealed more lectin reactivity in normal samples than in tumor samples. Apparently, an HPA-binding glycoprotein of 25kD was detected in both samples and was more reactive on the tumor. We are now attempting to characterize this glycoprotein by mass spectrometry. The bidimensional profile of HCT-116 plasma membrane fractions was obtained, as well as its HPA blotting, revealing spots on the gel region between 20 and 30 kD.

**Conclusões:**

Sialic acid and N-acetylgalactosamine residues identified, respectively, by WGA and HPA, are differentially expressed in the cell lines and tissue samples analyzed.

In the cell lines studied, WGA can be used as a metastatic potential marker, but HPA can not.

A 25kD protein is more N-acetylgalactosaminated according to the metastatic potential of the cell line and to the cancerous state of the tissue sample.

42.008

CINÉTICA PLASMÁTICA E BIODISTRIBUIÇÃO DE UM DERIVADO DO QUIMIOTERÁPICO ETOPOSÍDEO ASSOCIADO A UMA MICROEMULSÃO RICA EM COLESTEROL<sup>1</sup> Lo Prete, A. C.;<sup>2</sup> Maria, D. A.;<sup>3</sup> Rodrigues, D. G.;<sup>1</sup> Azevedo, C. H. M. \*\*;<sup>3</sup> Valduga, C. J.;<sup>3</sup> Fernandes, D. C.;<sup>1</sup> Maranhão, R. C.;<sup>1</sup> Análises Clínicas, FCF - USP;<sup>2</sup> Biofísica e Farmacologia, Butantan;<sup>3</sup> Lípidos e Aterosclerose, InCor - HCFMUSP

**Objetivo:**

Quando injetada na circulação, uma microemulsão rica em colesterol (LDE) é captada pelos receptores da LDL. Recentemente, um derivado do etoposídeo foi associado a LDE, com

manutenção da atividade antiproliferativa e diminuição da toxicidade. Neste estudo foram avaliadas a farmacocinética e biodistribuição da associação LDE-oleato de etoposídeo em camundongos C57BL/6J e a ação do fármaco no ciclo celular de tumores de melanoma B16F10.

**Métodos e Resultados:**

[<sup>14</sup>C]-LDE-[<sup>3</sup>H]-oleato de etoposídeo ou [<sup>3</sup>H]-etoposídeo comercial foi injetado em camundongos fêmeas, sadios ou inoculados com tumor. Amostras de sangue foram coletadas e a radioatividade medida por cintilação líquida. No estudo de biodistribuição, [<sup>14</sup>C]-LDE-[<sup>3</sup>H]-oleato de etoposídeo ou [<sup>14</sup>C]-LDE foi injetado em camundongos com tumor. Após 24h, os animais foram sacrificados e a radioatividade determinada em amostras de tecidos. O conteúdo de DNA nas diferentes fases do ciclo celular do tumor foi avaliado por citometria de fluxo. A taxa fracional de remoção (TFR) da LDE não difere da do oleato de etoposídeo ( $0.16 \pm 0.022$  e  $0.16 \pm 0.024$  h<sup>-1</sup>, respectivamente,  $p=0,902$ ). Em animais com tumor, a TFR do oleato de etoposídeo associado a LDE é maior do que a do etoposídeo comercial ( $0.30 \pm 0.02$  e  $0.15 \pm 0.03$  h<sup>-1</sup>,  $p=0.004$ ). O fármaco associado a LDE teve aumento no  $t_{1/2}$  e AUC e diminuição no CL, quando comparado com o fármaco comercial ( $t_{1/2}= 43$  e  $22$  min, AUC=  $12605$  e  $5380$   $\mu$  g.min/mL e CL=  $0.75$  e  $1.33$  mL/min, respectivamente). O oleato de etoposídeo, associado a LDE, foi captado 4 vezes mais pelo tumor, em comparação com tecido adjacente. Tanto o fármaco associado a LDE como o comercial diminuem o conteúdo de DNA na fase G0/G1 do ciclo celular.

**Conclusões:**

A associação do oleato de etoposídeo a LDE é estável na circulação e concentra o fármaco no tumor sem alterar o seu mecanismo de ação.

42.009

INFLUENCE OF OVEREXPRESSION OF BCL-2 FAMILY PROTEINS ON POMOLIC ACID-TRIGGERED APOPTOSIS <sup>1</sup> Fernandes, J.; <sup>2</sup> Weinlich, R. <sup>\*\*\*</sup>; <sup>3</sup> Castilho, R. O. ; <sup>4</sup> Amarante-Mendes, G. P. ; <sup>1</sup> Gattass , C. R. ; <sup>1</sup> IBCCF-UFRJ; <sup>2</sup> Biologia Molecular, IB-USP; <sup>3</sup> Produtos Naturais, UFRJ; <sup>4</sup> Imunologia - ICB IV, USP

**Objetivo:**

In previous studies we showed the Pomolic acid, a triterpene with anti-MDR activity, triggers apoptosis through the mitochondrial pathway. This pathway is initiated by alterations of the mitochondrial membrane potential, followed by release of apoptotic factors and activation of caspases leading to cell death. Members of the Bcl-2 family of proteins, such as Bcl-2 and Bcl-x<sub>L</sub>, play a pivotal role in the regulation of the mitochondrial-induced apoptosis pathway. As overexpression of Bcl-2 and Bcl-x<sub>L</sub> may lead to tumor cells resistance to chemotherapy, we asked whether they could also interfere with pomolic acid activity. The aim of this work was to evaluate the effect of Bcl-2 and Bcl-x<sub>L</sub> overexpression in pomolic acid-induced apoptosis of HL-60 (chronic myeloid leukemia) cells.

**Métodos e Resultados:**

For this investigation, HL-60 cells and their transfected derivatives HL-60-Bcl-2 and HL-60-Bcl-x<sub>L</sub> were used. Flow cytometry was used to determine DNA fragmentation and loss of mitochondrial membrane potential ( $\Delta \psi_m$ ) in cells stained with Pi or DiOC6, respectively. Activation of caspases – 3, and –9 was analyzed by western blot. Overexpression of Bcl-2 and Bcl-x<sub>L</sub> partially inhibits pomolic acid-induced loss of mitochondrial membrane potential and subsequent apoptosis. This inhibition was higher on the HL-60 cells transfected with Bcl-x<sub>L</sub>. Activation of caspase –3 and -9 was strongly inhibited in transfected cells.

**Conclusões:**

Overexpression of the anti-apoptotic genes Bcl-2 and Bcl-x<sub>L</sub> modulated the anti-tumoral activity of pomolic acid. The decrease in PA-induced loss of mitochondrial potential in cells transfected with Bcl-2 and Bcl-x<sub>L</sub>, corroborates the proposed hypothesis of mitochondria as the target for pomolic acid activity. However in spite of the down modulation of apoptosis caused by the overexpression of these proteins, the strong anti-tumoral activity of PA is still preserved.

42.010

EFFECTS OF BETULINIC ACID ON MULTIDRUG RESISTANCE (MDR) PROTEINS. Delou, J.M.A.; Capella , M. A. M. ; Gattass , C. R. ; IBCCF-UFRJ

**Objetivo:**

Multidrug resistance, characterized by the loss of cell response to different cytotoxic drugs, is the major cause of failure in cancer treatment. MDR may result from the overexpression of transporter glycoproteins (such as P-gp and MRP1) that are able to extrude the chemotherapeutic, reducing its intracellular concentration and preventing cell death. Recently, our group observed that betulinic acid (BA), a triterpene isolated from plants, is able to kill leukemic cells, including a multidrug resistant lineage that overexpresses P-gp. Thus, considering the relevance of drugs able to circumvent MDR activity, we decided to investigate the mechanisms that allow BA killing resistant cells.

#### **Métodos e Resultados:**

Ma104, a cell lineage derived from monkey kidney that expresses high levels of MRP1 was used. Cell viability was assessed by MTT. Effects of BA on MRP1 activity were evaluated by flow cytometry, measuring the influx and efflux of CFDA, a MRP1-specific fluorescent substrate. BA (1, 5, 10, 25, 50 and 100 $\mu$ g/mL) induced a dose-dependent decrease in cell viability that reached  $91.62 \pm 4.27$  (n=7) at 100 $\mu$ g/mL. All influx and efflux experiments were done using 10 $\mu$ M of CFDA. Incubation with BA (1, 5 and 10 $\mu$ g/mL) increased CFDA influx in a dose-response way with increase in media of fluorescence intensity (MFI) of 1.21, 1.77 and 2.57-fold respectively, (n=3). Presence or absence of 10 $\mu$ g/mL BA had no effect in the efflux of CFDA (MFI of  $3.63 \pm 0.40$  and  $3.65 \pm 0.53$  respectively).

#### **Conclusões:**

Our data show that in addition to killing cells expressing P-gp, BA is also able to kill MDR cells that expressed MRP1. Although BA increased the influx of CFDA, it is unable to prevent its efflux, indicating that BA ability to kill MDR cells may not be due to inhibition of MRP1. Experiments are in progress to investigate this observation.

42.011

ESTUDOS DOS EFEITOS ANTI-TUMORAIS DO TRATAMENTO DO MELANOMA B16F10 COM HEPARINA DE BAIXO PESO MOLECULAR (HBPM). Lapetina, D. L.; Gazzaneo, E.\*; Maria, D. A.; Bioquímica e Biofísica, Butantan

#### **Objetivo:**

Objetivo: HBPM são utilizadas na prevenção de tromboembolismo venoso, em neoplasias primárias no curso do tratamento quimio ou radioterapêutico. Seus mecanismos antitumorais não estão completamente elucidados. Neste estudo foram determinados a DL-50 e a IC-50 em células tumorais de melanoma humano e murino, bem como o potencial inibitório do crescimento e da formação de metástases no melanoma B16F10.

#### **Métodos e Resultados:**

Métodos e Resultados: Foram testadas para a determinação da DL-50 as seguintes vias de administração intraperitoneal (i.p.) e subcutânea (s.c.), nas concentrações: 0.125mg/kg a 400mg/kg, em camundongos C57BL/6J. O teste de citotoxicidade *in vitro* foi realizado através do método de MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) em células tumorais humanas SKMEL-28 e murinas B16F10, na presença e ausência de heparina (0,15 a 80  $\mu$ g/ml). O teste de inibição do crescimento da metástase foi realizado em implante das células B16F10 em camundongos tratados diariamente HBPM (s.c.). Foram avaliados os seguintes parâmetros de crescimento tumoral: área, volume e taxa de sobrevida (Kaplan-Meier). A DL-50 da HBPM obtida para as vias i.p e s.c. foi de 150mg/kg<sup>-1</sup>, e a dose máxima tolerável de 50mg/kg<sup>-1</sup>. Não foi observada citotoxicidade após o tratamento *in vitro* com a HBPM, para as células tumorais humanas e murinas. Nossos resultados na avaliação do crescimento tumoral não mostraram diferenças significativas (p>0.05), na área e volume tumoral, como também não foram observadas modificações importantes na taxa de sobrevida dos animais tratados comparados ao grupo controle.

#### **Conclusões:**

Conclusão: Não foram observados efeitos terapêuticos significativos na redução do crescimento tumoral, como na capacidade inibitória de metastatização das células de melanoma B16F10 dos animais tratados com HBPM.

42.012

TUMORICIDAL ACTIVITY OF EXTRACTS FROM *COCOS NUCIFERA* <sup>1</sup> Koschek, P.R. ; <sup>2</sup> Alviano, D.S. ; <sup>2</sup> Alviano, C.S. ; <sup>3</sup> Rumjanek, V.M. ; <sup>1</sup> Gattass, C. R. ; <sup>1</sup> IBCCF-UFRJ; <sup>2</sup> Microbiologia, UFRJ; <sup>3</sup> Bioquímica - CCS, UFRJ

**Objetivo:**

Species of *Cocos nucifera* L. (Palmae) are broadly distributed over the Brazilian northeastern coast. Recently, our group showed that a methanolic extract of husk of *C. nucifera* L, inhibited the proliferation of K562, an erythroleukaemic cell line. In the present study, a bio-guided fractionation assay was used in an attempt to identify the active principle responsible for tumoricidal activity of *C. nucifera* L.

**Métodos e Resultados:**

Alcoholic extracts of *C. nucifera* L. (Palmae) var. *typica* A or common variety were purified by adsorption chromatography. Each extract was separated in two fractions of molecular weight higher than 1000 Da (HMW) and lower than 1000 Da (LMW), by membrane filtration. These fractions were separated in bands ranging in MW from 500-1000 Da (A), 1000-3000 Da (B) and 3000-10000 Da (C). Cells were treated with different concentrations of the extracts (5, 50 and 500  $\mu$ g/ml) and cell viability was evaluated by MTT 48h later. Significant activity was only observed at the highest concentration used. Treatment with 500  $\mu$ g/ml var. *typica* A resulted in 7.6% (LMW) and 60.1% (HMW) inhibition of K562 viability while 9.3% (LMW) and 47.5.% (HMW) was obtained with common variety. At 500 $\mu$ g/ml inhibition of viability obtained with bands from varieties *typica* A and common were 54.0% and 22.8% for band A, 75.3% and 61.5% for band B and 66.2% and 65.3% for band C, respectively.

**Conclusões:**

The lack of activity in the LMW fraction indicated that the active principle responsible for the cytotoxic activity of *Cocos nucifera* is present in the HMW fraction. Further works have to be done to identify this principle. The observation that, the var. *typica* A and the common variety show comparable cytotoxic activity suggested that both varieties can be used as source of new anti-neoplastic substances.

42.013

TUMORYCIDAL ACTIVITY OF EUSCAPHIC ACID <sup>1</sup> Rocha, G. ; <sup>2</sup> Oliveira, R. R ; <sup>2</sup> Kaplan, M. A. C. ; <sup>1</sup> Gattass, C. R. ; <sup>1</sup> Biofísica, UFRJ; <sup>2</sup> Produtos Naturais, UFRJ

**Objetivo:**

Treatment of cancer, the second disease in *causa mortis* in Brazil, is still a challenge. In spite of the great number of drugs available for the treatment of this disease, the specific resistance of some tumors to certain drugs and the multidrug resistance (MDR), lead to the chemotherapeutic failure in a great number of cases. Reversion of this situation depends on the utilization of more effective therapeutic approaches or of the identification of drugs able to bypass these problems. Previous data from our group, showed that triterpenes isolated from *C. icaco* were able to kill both sensitive and MDR leukemia cell lines. Herein we investigated the tumoricidal activity of Euscaphic Acid (EA), a triterpene isolated from roots of *Cecropia lyratiloba* (Moraceae).

**Métodos e Resultados:**

EA, was provided by Dr. RR Oliveira (NPPN/UFRJ). Human cancer cell lines A549 (lung), Caco-2 (colon), HEP-2 (larynx) and K562 (erythroleukemia) were grown in RPMI or DMEM. Cell viability was assessed by MTT in cells treated with different concentration of EA (10, 25, 50 and 100 $\mu$ g/ml). Apoptosis was quantified by flow cytometry (FL2), measuring the Sub-G1 peak of the cell cycle in cells stained with Propidium Iodide (PI). Variations of mitochondrial membrane potential (MMP) were assessed by flow cytometry (FL-1) using cells stained with DIOC<sub>6</sub>(3). The data demonstrated that EA is cytotoxic to all tumor lines tested, decreasing their viability in a dose-dependent way. At 100 $\mu$ g/ml, inhibition of viability (n=3) in all lines was about 90%. Cell-cycle analyses revealed the appearance of a sub-diploid nuclei population, indicating that EA induced DNA fragmentation of the cell. This effect was also dose-dependent with 69.95 $\pm$  4.15% apoptosis induction observed after 48 hours treatment with 50 $\mu$ g/ml EA (n=5). To investigate the mechanism of EA-induced apoptosis we analyzed its ability to cause alterations in mitochondrial membrane potential. No alterations of mitochondrial membrane potential were observed

**Conclusões:** Our data showed that the EA decreased the viability and induced apoptosis of tumor cell lines in a dose-dependent way. EA is unable to induce loss of MMP. Although the cellular and

molecular pathways of EA cytotoxic activity are still under investigation, our data point to EA as a promising substance for the development of new agents for cancer treatment

42.014

ALTERAÇÕES NAS ATIVIDADES DE HIDRÓLISE DE NUCLEOTÍDEOS DA ADENINA POR PLAQUETAS E SORO DE RATOS SUBMETIDOS AO TUMOR DE WALKER 256. Sarkis, J. J. F.; Ribeiro, V. B.\*; Buffon, A.\*\*; Bioquímica - ICBS, UFRGS

**Objetivo:**

A hidrólise extracelular de nucleotídeos da adenina na circulação é mediada pela ação de uma NTPDase (ATPdifosfohidrolase) e de uma 5' nucleotidase, tendo como produto final, adenosina. Dentre as muitas propriedades já descritas para estes nucleotídeos, é sugerida também uma atividade anticâncer, uma vez que o ATP é considerado citotóxico em várias linhagens tumorais. Por outro lado, estudos demonstram que a adenosina apresenta uma atividade promotora de tumorigênese. Nesse estudo, nós avaliamos possíveis alterações na hidrólise extracelular dos nucleotídeos da adenina em plaquetas e soro de ratos submetidos ao modelo de tumor de Walker 256, no período de 6, 10 e 15 dias após a indução subcutânea de tumor.

**Métodos e Resultados:**

Plaquetas e soro foram isolados de sangue de ratos *Wistar* machos, pesando aproximadamente 200g, como anteriormente descrito (Blood 64:896-906, 1984 e Biochemistry (Mosc) 62:619-22, 1997, respectivamente). As preparações obtidas foram incubadas em condições de linearidade de reação com os substratos ATP, ADP e AMP. O Pi liberado foi medido colorimetricamente. Os resultados demonstraram em soro, uma inibição significativa na hidrólise dos três nucleotídeos testados 6, 10 e 15 dias após a indução do tumor, respectivamente: ATP (60%, 58% e 67%); ADP (39%, 58% e 78%); e AMP (54%, 59% e 76%). Em plaquetas, uma inibição significativa foi observada somente 10 e 15 dias após a indução do tumor nas hidrólises de ATP (31% e 21%), ADP (25% e 35%) e AMP (42% e 54%).

**Conclusões:**

A partir da inibição na atividade de hidrólise dos nucleotídeos da adenina por plaquetas e soro, observada neste estudo, é possível sugerir um mecanismo fisiológico de proteção contra o processo tumoral na circulação, uma vez que essa inibição estaria mantendo elevados os níveis de ATP e, ao mesmo tempo, inibindo a principal via de produção de adenosina extracelular.

42.015

TIGHT JUNCTION ALTERATIONS IN HUMAN COLORECTAL CANCER <sup>1</sup> Oliveira, S. S. ; <sup>2</sup> de Souza, W. ; <sup>1</sup> Morgado-Diaz, J. ; <sup>1</sup> Biologia Celular, INCa-RJ; <sup>2</sup> IBCCF-UFRJ

**Objetivo:**

Tight junction molecular and morphological alterations are poorly understood in colorectal cancer. In this study, adenocarcinoma tissues and their paired normal mucosa (n=12) were analyzed for tight junction structural and molecular alterations.

**Métodos e Resultados:**

This study was done with INCa's ethics committee approval. Immunoblotting analysis showed that claudin-1, -3 and -4 proteins, main proteins of the tight junction, were upregulated in cancer colorectal tissues in comparison to normal ones. Although tight junction remains in the cancerous epithelium, as observed by routine transmission electron microscopy, morphometric analysis of freeze fracture replicas indicated a significant disorganization of its strands in relation to the normal tissues.

**Conclusões:**

Whereas the functional significance of claudin overexpression in colorectal cancer is unclear, our results suggest that these proteins can become potential markers and targets in this cancer type.

42.016

ALTERAÇÕES EM PARÂMETROS METABÓLICOS DE ANIMAIS PORTADORES DE TUMOR SUBMETIDOS A TREINAMENTO E SUPLEMENTAÇÃO DE HMB. Caperuto, E.; Santos, R.S.\*; Rosa, L. F. B. P. C.; Biologia Celular e do Desenvolvimento, USP

**Objetivo:**



Este trabalho tem como objetivo avaliar os efeitos de duas terapias no metabolismo de animais portadores de tumor.

**Métodos e Resultados:**

ratos Wistar, machos, 150-200g foram divididos em 4 grupos GSC (animais sedentários com tumor), GSS (animais sedentários com tumor suplementados), GTC (animais treinados com tumor) e GTS (animais treinados e suplementados com tumor). O protocolo de treinamento foi feito em natação sendo o exercício moderado (4% do peso corporal atado a cauda), realizado durante 6 semanas diariamente. A inoculação do tumor foi feita no primeiro dia da última semana de treino e a suplementação foi dada no mesmo período.

Como demonstrado na tabela abaixo, os valores de glicemia não foram diferentes entre os grupos, já os valores de lactato foram menores para o grupo GTS em comparação aos animais do grupo GSC. Os valores de glutamina plasmática foram maiores para ambos os grupos treinados, embora os valores de glutamato não apresentaram diferença estatística. A Relação glutamina/glutamato que é um indicador de estado catabólico é maior para ambos os grupos treinados quando comparados com os grupos sedentários.

	<b>Glicose (mmol/l)</b>	<b>Lactato (<math>\mu</math>mol/ml)</b>	<b>Glutamina (nmol/ml)</b>	<b>Glutamato (nmol/ml)</b>	<b>Relação Glutamina/Glutamato</b>
<b>SC</b>	<b>5,13 <math>\pm</math> 0,66</b>	<b>6,53 <math>\pm</math> 0,90</b>	<b>595,30 <math>\pm</math> 67,96</b>	<b>955,07 <math>\pm</math> 258,28</b>	<b>0,623 <math>\pm</math> 0,03</b>
	(n = 9)	(n = 8)	(n = 13)	(n = 9)	(n = 9)
<b>SS</b>	<b>4,75 <math>\pm</math> 0,41</b>	<b>6,43 <math>\pm</math> 0,73</b>	<b>520,98 <math>\pm</math> 61,29</b>	<b>787,87 <math>\pm</math> 116,78</b>	<b>0,661 <math>\pm</math> 0,02</b>
	(n = 8)	(n = 8)	(n = 12)	(n = 8)	(n = 8)

TC	6,32 ± 0,50	4,25 ± 0,64	1141,69 ± 152,81 <sup>*#</sup>	660,17 ± 88,15	1,729 ± 0,10 <sup>*#</sup>
	(n = 9)	(n = 9)	(n = 7)	(n = 7)	(n = 9)
TS	5,48 ± 0,27	3,52 ± 0,27 <sup>*#</sup>	1101,97 ± 209,97 <sup>*#</sup>	929,98 ± 225,99	1,184 ± 0,16 <sup>*#</sup>
	(n = 10)	(n = 10)	(n = 10)	(n = 10)	(n = 10)

---

#### Conclusões:

Podemos concluir que a suplementação de HMB e o exercício conjuntamente são capazes de alterar alguns parâmetros metabólicos de animais portadores de tumor. Apoio financeiro FAPESP (02/05280-7).

42.017

USE OF RNA INTERFERENCE TO INVESTIGATE ADAM23 FUNCTION AND ITS ROLE IN BREAST CANCER PROGRESSION <sup>1</sup> Verbisck, N. V.; <sup>1</sup> Costa, F. F. <sup>\*\*</sup>; <sup>2</sup> Melo, F. H. M. <sup>\*\*</sup>; <sup>3</sup> Zanata, S. M.; <sup>4</sup> Chammas, R.; <sup>1</sup> Camargo, A. A.; <sup>1</sup> Biologia Molecular, Inst.Ludwig; <sup>2</sup> FM-USP; <sup>3</sup> Patologia, UFPR; <sup>4</sup> Oncologia Experimental - FM, USP

**Objetivo:** ADAM23 is a member of the ADAM (A Desintegrin And Metalloprotease domains) protein family, unique among cell surface proteins in possessing both potential adhesion and protease activities. ADAM23 exhibits the typical structure of the ADAM family members and interacts specifically with avb3 in an RGD-independent manner [1]. However, ADAM23 lacks a conserved metalloprotease domain, which suggests its major enrollment in cell adhesion processes. Cell-cell

and/or cell-matrix interactions are known to play a crucial role in tumor progression and we have recently demonstrated that the ADAM23 gene is frequently silenced by promoter hypermethylation in primary breast tumors with a more advanced grade, suggesting that ADAM23 could be down-regulated during the progression of breast cancer [2]. RNA interference (RNAi) has emerged as a powerful tool to silence gene expression through targeted degradation of messenger RNA [3]. In our study, ADAM23 ablation by RNAi is being used to elucidate ADAM23 possible roles in tumor formation and metastasis.

#### **Métodos e Resultados:**

Human breast cancer cell line MDA-MB-435 was stably transfected with a pAVU6+27-based vector [4] targeting a 19 nucleotide sequence specifically homologous to human ADAM23 gene. Several cell clones were obtained showing significant reduction of ADAM23 mRNA and protein levels as analyzed by RT-PCR and Western-blot. We have evaluated adhesion and migration of cell clones lacking ADAM23 in comparison to parental cell line transfected with empty vector, using the avb3/vitronectin model and found that ADAM23 ablated cells have a higher adhesive capacity to vitronectin and present a higher migratory behaviour. We are presently studying the mechanisms implicated in this findings.

#### **References**

[1] Cal S *et al* (2000) *Mol Biol Cell* **11**:1457-69; [2] Costa FF *et al* (2004) *Oncogene* **23**:1481-8; [3] Hannon GJ (2002) *Nature* **418**:244-51; [4] Paul CP *et al* (2002) *Nat Biotechnol* **20**:505-8

**Conclusões:** Our results suggest that ADAM23 may be acting as a modulator of integrin function and lacking of ADAM23 expression in cells can be an important event during breast cancer progression.

42.018

ENVOLVIMENTO DE GALECTINA-3 NA SENESCÊNCIA REPLICATIVA DE CÉLULAS MESENQUIMAIS EMBRIONÁRIAS EXPOSTAS AO ESTRESSE OXIDATIVO. <sup>1</sup> Junqueira, M. S. ; <sup>2</sup> Liu, F. ; <sup>3</sup> Chammas, R. ; <sup>1</sup> FM-USP; <sup>2</sup> Dermatology, University of California; <sup>3</sup> Radiologia, USP

**Objetivo:** Galectina-3 está envolvida na homeostase mitocondrial, diminuindo a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS). Se isso é verdadeiro, células que não expressam galectina-3 seriam menos protegidas aos ataques genotóxicos de ROS. Para testar esta hipótese, estabelecemos linhagens derivadas de células mesenquimais embrionárias (MEC), de animais selvagens e nulizigotos para o gene da galectina-3 (MEC+/+ e MEC-/-, respectivamente).

**Métodos e Resultados:** As células MEC+/+ e MEC-/- foram mantidas em alta concentração de glicose e submetidas a imortalização por sucessivas passagens (protocolo 3T3). Nestas condições, apenas as células MEC-/- foram imortalizadas, enquanto que as células MEC+/+ progressivamente perderam a capacidade de se dividir, o que foi acompanhado pela perda da expressão de galectina-3. Curiosamente, quando estas células foram mantidas em baixa concentração de glicose, ambas as células foram imortalizadas. A expressão de galectina-3 foi mantida nas células após a imortalização (3T3 +/+). Foi analisado como as células imortalizadas 3T3+/+ e 3T3 -/- reagem ao estresse oxidativo metabólico induzido por altas concentrações de piruvato de sódio. Ambas as células foram mantidas na presença de diferentes concentrações de piruvato (10, 50 e 100mM) por até 4 dias. Em alta concentração (100mM) ambas as células tiveram o seu crescimento prejudicado, porém as células 3T3-/- foram mais sensíveis ao tratamento, como evidenciado pelo maior grau de morte celular, sendo também mais sensíveis aos efeitos genotóxicos do tratamento, como avaliado pelo ensaio do cometa.

#### **Conclusões:**

A exposição a altas concentrações de glicose pode ser acompanhado pelo aumento da produção de ROS. Células MEC+/+ tendem a senescência replicativa após a exposição a altas concentrações de glicose, o que não acontece com células MEC-/- . Estas mesmas células se mostraram mais sensíveis ao agravo genotóxico dependente de exposição a piruvato de sódio que as células derivadas de animais selvagens. Nossos resultados sugerem um papel de proteção para galectina-3 nos passos iniciais da transformação de células mesenquimais embrionárias.

42.019

APLICAÇÃO DA GAL3-FA NO RECONHECIMENTO DO(S) LIGANTE(S) DE GALECTINA-3 PARA A PATOLOGIA INVESTIGATIVA. <sup>1</sup> Melo, F. H. M. ; <sup>2</sup> Butera, D. ; <sup>3</sup> Medeiros, R.S. ; <sup>4</sup> Nonogaki, S. ;

<sup>5</sup> Soares, F. A. ; <sup>2</sup> Silva , A. M. M. D. ; <sup>3</sup> Chammas , R. ; <sup>1</sup> FM-USP; <sup>2</sup> Imunopatologia, Butantan; <sup>3</sup> Oncologia Experimental - FM, HCFMUSP; <sup>4</sup> Anatomia Patológica, Inst.Adolfo Lutz; <sup>5</sup> Patologia, Fund. Antônio Prudente

**Objetivo:**

A progressão tumoral está freqüentemente associada à alteração de expressão de glicoconjugados, um fenômeno coletivamente chamado de glicosilação aberrante. Uma das principais modificações encontradas é o aumento da ramificação dos oligossacarídeos *N*-ligados pela adição de resíduos de *N*-acetilglucosamina ligada na configuração  $\beta$ 1,6 ao núcleo trimanosídico, catalisada pela enzima Mgat 5. Esta estrutura é posteriormente modificada, criando-se ligantes para galectina-3. Na intenção de estudar esse fenômeno nas células neoplásicas, nós desenvolvemos uma ferramenta para a identificação *in situ* desses glicoconjugados associados aos tumores.

**Métodos e Resultados:**

Galectina-3 humana foi fusionada à fosfatase alcalina bacteriana, construindo uma molécula híbrida, que demonstra tanto propriedades ligadoras de carboidratos da galectina-3 como atividade enzimática de fosfatase alcalina (FA). Sua especificidade foi confirmada em ensaios de ligação direta. Gal3-FA apresentou mesma especificidade que a galectina-3 humana. Foram estudados 9 tipos de neoplasias e para cada tipo, foram estudados 25 casos, correspondentes a pacientes diferentes. O ensaio com gal3-FA mostrou variabilidade na expressão dependendo do tipo de célula neoplásica, de padrão citoplasmático e ou peri-nuclear. Especificamente, nos casos de carcinomas bem diferenciados, houve positividade na superfície celular polarizada para o lúmen enquanto que nos tumores pouco diferenciados, marcação de distribuição difusa no citoplasma. Foi observado também positividade nas células inflamatórias, endotélio e matriz extracelular.

**Conclusões:**

Os resultados permitiram validar a utilização da galectina-3 híbrida como marcador histoquímico, para estudo da distribuição tecidual dos ligantes fisiológicos de galectina-3. Embora o significado biológico e clínico da expressão destes ligantes não esteja definido, parece-nos promissora a investigação do papel de galectina-3 como agente modulador do microambiente tumoral, dado o padrão de reatividade de células inflamatórias observado nos casos aqui avaliados.

42.020

THE MULTIDRUG RESISTANCE REVERSING ACTION OF PURIFIED LIGNANS FROM *PHYLLANTHUS AMARUS* <sup>1</sup> Leite , D. F. P. ; <sup>2</sup> Kassuya , C. A. L. \*\*; <sup>3</sup> Rehder, V. L. G. ; <sup>2</sup> Calixto, J. B. ; <sup>4</sup> Rumjanek , V. M. B. D. ; <sup>1</sup> IBCCF-UFRJ; <sup>2</sup> Farmacologia, UFSC; <sup>3</sup> CEN - Química, CPQBA/UNICAMP; <sup>4</sup> Bioquímica Médica, UFRJ

**Objetivo:**

Multidrug resistance (MDR) to chemotherapy is a major obstacle in the treatment of cancer patients. One of the mechanisms responsible for MDR involves the expression of P-glycoprotein (Pgp). Pgp extrudes drugs from the interior of cells, thereby reducing its cytotoxicity. MDR can be reversed by a number of substances that inhibit Pgp activity. In the present study we investigated the possible MDR reversing action of hexanic extract (HE), lignans rich fraction (LRF) and purified lignans; Nirtretalin (Nirt) and Nirantin (Nira) from *Phyllanthus amarus*.

**Métodos e Resultados:**

Two cell lines were used - Lucena - a MDR cell line, and the parental cell line the human erythroleukaemia - K562. MDR modulation was assessed by Rhodamine 123 ( Rho ) extrusion using flow-cytometry. Rho accumulation in Lucena cells treated with CSA (160nM), a MDR reversor, and also by HE, LRF (100ug/ml), Nira and Nirt (100uM) were  $11\pm 2$ ;  $3\pm 0,2$ ;  $13\pm 1$ ;  $9\pm 1$  and  $10\pm 1$  times higher than control group respectively. Those treatments did not alter Rho accumulation on K562. Reversal resistance to Daunorubicin (DR) by *P .amarus* compounds was also tested. Cells were incubated for 72h with DR (5uM) in the presence of CSA, HE, LRF, Nirt or Nira. The viability of the cells was determined by MTT assay, considering control cells as 100%. Lucena was resistant to DR treatment ( $95\pm 3.5\%$ ), while its counterpart K562 was not ( $34.5\pm 1\%$ ). The conjugation of CSA (160nM) or non toxic concentrations of the compounds - HE (100ug/ml), LRF (30ug/ml), Nirt, or Nira (30uM) - with DR decreased the viability of resistant cells ( $37\pm 13$ ;  $52\pm 3$ ;  $65\pm 2$ ;  $63\pm 1$  and  $44\pm 6\%$  respectively), however, this increased cytotoxicity was not observed in K562 cells.

**Conclusões:**

Data obtained allowed an initial selection process of possible MDR reversing agents.

42.021

ESTUDO DA ATIVIDADE ANTINEOPLÁSICA DA *VERNONIA CONDENSATA* BAKER Souza, I. A. D. ; Silva, E. C. B. ; Silva, A. C. P. ; Calvalcanti, K. P. S. ; Higino, J. S. ; Melo, A. F. M. ; Tavares, P. C. ; Antibiótico, UFPE

**Objetivo:**

*Vernonia condensata* (Asteraceae) é um arbusto originário da África trazido para o Brasil pelos escravos das áreas de Benin e Nigéria. Usado na medicina desde tempos coloniais, a *Vernonia condensata* vem sendo estudada há décadas pelos pesquisadores. No uso popular o chá de suas folhas é utilizado no tratamento de: ressaca alcoólica; bom funcionamento do fígado; estimular a secreção biliar; aliviar os sintomas da gripe; diarreia; cólicas; icterícia; abrir o apetite e outras patologias. O objetivo deste trabalho foi avaliar as propriedades do extrato hidroetanólico bruto (EHEB) das folhas da *V. condensata*, como agente antineoplásico, utilizando tumores experimentais (carcinoma de Ehrlich).

**Métodos e Resultados:**

Após coleta das folhas, o material foi macerado por quarenta e oito horas e guardados ao abrigo da luz, em seguida foi concentrado, à temperatura ambiente em rotavapor à secura Para realização dos ensaios, foram selecionados camundongos fêmeas albinos Swiss (*Mus musculus*) os quais foram submetidos a uma pequena intervenção cirúrgica para implantação dos tumores na região axilar pelo método de Stock (1955). O tratamento foi realizado por um período de oito dias após quarenta e oito horas do implante. A substância mostrou atividade significativa quando testada contra o Carcinoma de Ehrlich, apresentando percentual de inibição igual a 76,25%. Durante o ensaio foram verificadas várias alterações macroscópicas nos animais tratados, dentre as quais pode-se citar: agitação, piloereção, palidez, exoftalmia.

**Conclusões:**

*Vernonia condensata* possui efeitos analgésico e antiinflamatório já comprovados. Esta investigação realizada em tumores malignos, "in vivo", demonstrou que o vegetal também possui notada atividade antineoplásica.

42.022

EFEITO ANTI-TUMORAL DO CELECOXIB NO MODELO DE TUMOR DE PULMÃO EM RATO. <sup>1</sup> Gomes Neto, A. ; <sup>2</sup> Rocha, E. L. ; <sup>2</sup> Aguiar, S. A. ; <sup>2</sup> Furtado, B. M. ; <sup>3</sup> Simão, A.F.L. ; <sup>3</sup> Moraes, M. O. ; <sup>3</sup> Ribeiro, R. A ; <sup>1</sup> Cirurgia, UFC; <sup>2</sup> FM-UFC; <sup>3</sup> Fisiologia e Farmacologia, UFC

**Objetivo:**

Investigar o efeito anti-tumoral do celecoxib (CLX) no modelo de tumor de pulmão em ratos com o carcinoma de Walker, desenvolvido recentemente no nosso laboratório.

**Métodos e Resultados:**

Ratos Wistar, fêmeas (180-210g) foram utilizados neste estudo. Tumor de Walker (200.000 céls/70mL) foi injetado no parênquima do pulmão esquerdo via toracotomia (foram excluídos os ratos com ausência de tumor, consolidação e atelectasia). Para verificar o efeito anti-tumoral do CLX, avaliou-se o crescimento tumoral e a sobrevida dos animais, que foram divididos aleatoriamente em quatro grupos (I, II e III), respectivamente, controle (n=7), tratados com CLX 15 (n=5) e 30 mg/kg/d (n=5), administrado VO por gavagem 2xd, iniciando 6 hs antes do implante tumoral. No 60 dia, foi realizada necropsia, quando os tumores foram medidos manualmente (os 2 diâmetros maiores) utilizando-se um paquímetro e o volume (v) dos tumores calculado em cm<sup>3</sup> (Dxd2/2). CLX-15 (v=0,130±0,044cm<sup>3</sup>), e CLX-30 (v=0,32±0,015cm<sup>3</sup>), inibiram de maneira significativa o crescimento tumoral (v=0,082±0,03cm<sup>3</sup>) em relação ao controle (v=0,381±0,11cm<sup>3</sup>), teste de Kruskal-Wallis p=0,016. Para análise da sobrevida dos ratos submetidos ao implante tumoral, utilizou-se 4 grupos (controle: n=13; CLX-15: n=7; CLX-30: n=11 e CLX-60: n=11). O CLX-15 aumentou a sobrevida mediana dos animais de forma significativa (14d), quando comparado com o grupo controle (10d), teste de *Log Rank*: p=0,0002. Os animais dos grupos III e IV morreram precocemente por efeitos adversos da droga (trombose mesentérica, necrose intestinal e peritonite), inviabilizando a análise da curva dose-resposta da sobrevida.

**Conclusões:**

A inibição do crescimento tumoral, dose dependente, e o aumento da sobrevivência dos animais tratados com CLX-15 sugerem um efeito anti-tumoral desta droga, que provavelmente deveu-se à inibição da angiogênese tumoral. Doses de CLX acima de 15mg/kg/d revelaram uma ação trombótica da droga, corroborada em publicações recentes, como sendo um dos seus principais efeitos adversos.

42.023

GANGLIOSIDE  $G_{D3}$  MODULATES CHEMOTHERAPY-INDUCED CELL DEATH *IN VITRO* Otake, A H ; Chammas, R.; Oncologia Experimental – FM-USP

**Objetivo:** Gangliosides are a family of sialic acid-containing glycosphingolipids mainly located in the outer leaflet of the plasma membrane. The monosialoganglioside  $G_{M3}$  is expressed in melanocytes and upon transformation, melanoma cells accumulate disialogangliosides like  $G_{D3}$  and derivatives. Gangliosides are involved in many biological processes as modulators of cell migration and cell-matrix interactions.  $G_{D3}$  could either stimulate cell growth or promote cell death. The underlying mechanisms for this dual function remain unknown. Here we have analyzed how  $G_{D3}$  interferes with cell death-induced by chemotherapeutic agents used in melanoma treatment.

**Métodos e Resultados:** The murine melanocyte cell line, Melan-a, was used as a model for the expression of  $G_{D3}$  synthase gene, which converts  $G_{M3}$  into  $G_{D3}$ . Likewise the parental cell, the transfected clones required phorbol 12-myristate-13-acetate (PMA) to grow. In the absence of PMA, the  $G_{D3}^+$  cells were growth-arrested in  $G_0/G_1$  phases within 6 days, while  $G_{D3}^-$  cells were growth-arrested in  $G_0/G_1$  phases within 3 days and progressed to cell death after 6 days. Cells were incubated with staurosporine and the DNA content was measured.  $G_{D3}^+$  cells were 3.8-fold more sensitive to staurosporine-induced cell death,  $p < 0.001$ . Otherwise,  $G_{D3}^+$  cells were more resistant to cisplatin-induced cell death, as evaluated by DNA-content and loss of the mitochondrial transmembrane potential, as measured by decreased accumulation of JC1 dye in that organelle.  $G_{D3}$  also seemed to confer resistance to temozolamide-induced cell death. Upon temozolamide treatment,  $G_{D3}^+$  cells were growth-arrested in  $G_2/M$  phases within 3 days and tended to accumulate in a polyploid population. Finally,  $G_{D3}^+$  sensitized Melan-a derived cells to vinblastin-induced cell death ( $34.8 \pm 1.4\%$ ) when compared to its control ( $45.83 \pm 1.4\%$ ), even in the lowest concentration used (10nM for 24 hours).

**Conclusões:** These data suggest that  $G_{D3}$  be considered a predictive marker for chemosensitivity/chemoresistance in melanomas.

42.024

IMPORTÂNCIA DO FATOR DE TRANSCRIÇÃO NF-KB E DA GLUTATIONA NA APOPTOSE CAUSADA PELO TAXOL E PELA VINCRISTINA EM CÉLULAS DE LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA. <sup>1</sup> Souza, N.M.A. \*\*; <sup>2</sup> Freitas, M. S. ; <sup>3</sup> Santos-Silva, M. C. ; <sup>1</sup> Ciências Médicas, UFSC; <sup>2</sup> Physiology & Pharmacology, UERJ; <sup>3</sup> Análises Clínicas, UFSC

**Objetivo:**

Apenas 40% de pacientes adultos com leucemia linfoblástica aguda (LLA) entram em remissão completa com a terapia de indução "hiper-CVAD" (hiper-ciclofosfamida, vincristina, adriamicina, dexametasona). Vários estudos têm demonstrado que agentes antimicrotúbulos têm atividade citotóxica na LLA. Em trabalhos anteriores demonstramos que o Taxol é citotóxico para células de linhagem linfoblástica leucêmica de origem humana (CEM) e murina (L-1210). Sendo assim, comparamos o efeito citotóxico do taxol e da vincristina sobre células linfoblásticas leucêmicas e os mecanismos de citotoxicidade envolvidos.

**Métodos e Resultados:**

Células leucêmicas CEM foram incubadas com taxol e vincristina (1-30  $\mu$ M; agentes despolimerizantes de microtúbulos) na presença ou na ausência de ciclofosfamida (1-10  $\mu$ M, um inibidor de síntese proteica) por 24 h. A viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT e a fragmentação do DNA foi visualizada por eletroforese em gel de agarose 1%. A atividade do NF-kB foi avaliada por *immunoblotting*, e os níveis de glutatona intracelular foram dosados pelo método bioquímico proposto por Tietze (1969). Nossos resultados demonstraram que o taxol e a vincristina induzem apoptose em células linfoblásticas leucêmicas de maneira concentração dependente. A maior citotoxicidade foi observada na concentração de 30  $\mu$ M,  $83\% \pm 1\%$  e  $25\% \pm 2\%$  de morte celular para o taxol e para a vincristina, respectivamente. No entanto, apenas o taxol depletou de

maneira significativa os níveis de GSH (30% em relação ao controle), e inibiu a atividade do NF- $\kappa$ B, mesmo quando associado a ciclofosfamida.

**Conclusões:**

Os nossos resultados sugerem que o efeito citotóxico do taxol sobre células linfoblásticas leucêmicas é mais eficaz do que a vincristina, pois além de diminuir os níveis de glutathione intracelular, o que sensibiliza as células aos danos oxidativos, também impede o restabelecimento dos níveis normais de GSH intracelular, através da inibição da atividade do NF- $\kappa$ B.

42.025

EFEITO TÓXICO E CITOTÓXICO DA DAUNORRUBICINA MODIFICADA ASSOCIADA À UMA MICROEMULSÃO LIPÍDICA (LDE) QUE SE LIGA AOS RECEPTORES DA LIPOPROTEÍNA DE BAIXA DENSIDADE. Teixeira, R. S.; Valduga, C.J.; Moura, J.A. \*\*; Maranhão, R.C.; Clínica Médica - FMUSP, InCor - HCFMUSP

**Objetivo:**

A microemulsão lipídica (LDE) que se liga aos receptores da lipoproteína de baixa densidade pode reduzir a toxicidade de fármacos antineoplásicos. A daunorrubicina é um fármaco de alta toxicidade cuja taxa de incorporação na LDE é pequena. Recentemente, mostramos que sua modificação química aumenta a taxa de incorporação na LDE. Neste trabalho, comparamos o efeito citotóxico e o efeito tóxico da daunorrubicina modificada com o da daunorrubicina. (J Pharm Pharmacol. 55:1615, 2003)

**Métodos e Resultados:**

Células das linhagens K-562, HL-60, L1210 e B16 foram cultivadas em meio RPMI ou DEMEM acrescidos com 10% de soro fetal bovino e mantidas em estufa a 37<sup>o</sup>.C e 5% de CO<sub>2</sub>. Cada linhagem foi incubada com concentrações entre 1 mM e 0,1  $\mu$  M da LDE-N-oleil daunorrubicina (LDE-dauno), N-oleil daunorrubicina ou da daunorrubicina e a citotoxicidade avaliada por MTT. Os valores de IC<sub>50</sub> da LDE-dauno nas linhagens K-562, HL-60, L1210 e B16 foram respectivamente 17, 9,46, 1,2 e 32 x 10<sup>5</sup> M, enquanto que da daunorrubicina foram respectivamente 3,47, 2,28, 0,07 e 1,19 x 10<sup>5</sup> M indicando que a LDE-dauno é menos citotóxica que a daunorrubicina, mas o efeito anti-tumoral é preservado. Para a avaliação da toxicidade *in vivo*, grupos entre 4 e 10 camundongos foram intraperitonealmente injetados com doses de 100 a 400 mg/kg da LDE-dauno ou de 1,25 a 60 mg/kg da daunorrubicina. A sobrevivência e a variação do peso foram acompanhados por 32 dias. A dose máxima tolerada determinada para a LDE-dauno foi de 100 a 200 mg/kg e de 2,5 a 5,0 mg/kg da daunorrubicina comercial indicando que a associação à LDE resulta em diminuição da toxicidade.

**Conclusões:**

A associação da daunorrubicina modificada à LDE aumenta o índice terapêutico da daunorrubicina uma vez que reduz acentuadamente a toxicidade *in vivo* preservando ainda o efeito citotóxico nas células neoplásicas.

42.026

42.026

PROCOAGULANT PATTERN OF RAT C6 GLIOMA CELLS: A NEW MODEL FOR STUDYING THE ROLE OF BLOOD COAGULATION PROTEINS IN TUMOR BIOLOGY Monteiro, R. Q.; Fernandes, R. S.; Kirszberg, C.\*\*; Rumjanek, V. M. B. D.; Bioquímica Médica, UFRJ

**Objetivo:** It has long been described a correlation between cancer and procoagulant states. C6 glioma cell line was originally induced in random-bred Wistar-Furth rats and is morphologically similar to glioblastoma multiforme, the most common aggressive glioma resistant to therapeutic interventions. In this study we investigated the procoagulant properties of C6 glioma cells.

**Métodos e Resultados:** Increasing cell concentrations produced a significant decrease in the recalcification time of rat plasma. This observation was consistent with the presence of tissue factor (TF), a 46-kDa membrane-bound protein. TF functions as a specific receptor for the enzyme factor VIIa (FVIIa) with subsequent formation of the extrinsic tenase complex. This enzymatic complex converts FX into FXa triggering a zymogen activation cascade that results in blood coagulation. Here, TF was identified by flow cytometric and functional (FXa formation) assays. C6 glioma cells were also able to potentiate prothrombin activation by FXa. This ability was dependent on FXa binding to cell membrane, since no potentiating effect was observed with GLA-domainless FXa, a

FXa derivative that has no phospholipid-binding properties. C6 cells also promoted formation of the prothrombinase complex (FXa/FVa), which efficiently activates prothrombin into thrombin. It is known that formation of the prothrombinase complex is dependent on phosphatidylserine (PS) exposure. Therefore, annexin V, which blocks PS binding sites, inhibited prothrombin activation by C6-assembled prothrombinase complex.

**Conclusões:** C6 glioma cells display a highly procoagulant pattern as a result of both TF exposure and the presence of the anionic lipid PS at the outer leaflet of their membranes. Therefore, this animal cell line may be used as a new model for studying the role of blood coagulation proteins in tumor biology.

42.027

GALECTIN-3 GENE IS SILENCED BY EPIGENETIC MECHANISMS ALONG MELANOMA PROGRESSION <sup>1</sup>Teixeira, V. R. ; <sup>1</sup>Costa, M. ; <sup>2</sup>Costa, F. F. ; <sup>1</sup>Junqueira, M. S. ; <sup>3</sup>Camargo, A. A. ; <sup>1</sup>Chammas, R. ; <sup>1</sup>Radiologia, USP; <sup>2</sup>Biologia Molecular, Inst.Ludwig; <sup>3</sup>Biologia Médica, Inst.Ludwig

**Objetivo:**

Galectin-3 is a polylactosamine binding animal lectin, shown to be involved in tumor progression and metastasis. Most epithelial cancers seem to lose galectin-3 expression in advanced stages. In this study, we have used a melanoma murine model to investigate the mechanisms for galectin-3 gene silencing. This model system consists of a non-tumorigenic melanocyte-derived cell line (Melan-a) and its tumorigenic counterparts (TM1 and TM5).

**Métodos e Resultados:**

We examined by Northern blot analyses the mRNA expression of the galectin-3 in this model. We found that galectin-3 mRNA was only present by Melan-A cells. Analysis of the promoter region of galectin-3 demonstrated the presence of a high CG content, several SP1 binding sites and lacks TATA consensus. Regarding its genomic organization, the galectin-3 gene shares similarities with INK4a/Arf gene that is frequently silenced by hypermethylation along melanoma progression. Bisulfite sequencing of the promoter of galectin-3 demonstrated that the galectin-3 promoter CpG island was totally unmethylated in Melan-A cells. However, dense methylation was seen in TM1 and TM5 cells. Furthermore, promoter methylation was correlated with lack of expression of galectin-3 mRNA and galectin-3 protein in the tumorigenic cells. Treatment of TM1 cells with 10 mM of 5-aza-2-deoxycytidine, a DNA methyltransferase inhibitor, induced de novo the expression of galectin-3. Curiously, the treatment of TM1 cells with high concentrations of the histone-deacetylase inhibitor trichostatin A (100 and 200 nM) reverted the effect of 5-aza-2-deoxycytidine.

**Conclusões:**

These results suggests that the methylation status control the expression of galectin-3 gene along the malignant transformation of these melanoma cells and indicate that galectin-3 expression is controlled by epigenetic mechanisms.

42.028

PARTIAL INTRONIC SEQUENCES OF JARARHAGIN AND BOTHROPASIN GENES FROM GENOMIC DNA OF *BOTHRUPS JARARACA*. Souza, M. M. T. ; Ruiz, I. R. G.; Genética, Instituto Butantan

**Objetivo:** Jararhagin and bothropasin toxins from *Bothrops jararaca* venom are involved with extracellular matrix disruption and cell interactions; their cDNAs share 97% sequence identity. This work aimed for partial cloning and sequencing of these genes, using genomic DNA extracted from snake blood leukocytes.

**Métodos e Resultados:**

PCR amplifications were done with 3 pairs of primers (P1, P2, P3) designed from conserved regions of cDNAs (partial regions of Pro-domain, Catalytic domain and 3'UTR - untranslated region) already described. The products were resolved in 1% agarose gel electrophoresis. Two bands were obtained with each primer and eluted from the gels, cloned (pGEM-T easy plasmid system) and sequenced (Big Dye Terminator kit).

Results: P1 bands contained 70 exon+630 intron+151 bp exon sequences; P2 bands contained 105 exon+560 intron+63 exon+580 intron+70 bp exon sequences; and P3 bands were 349 bp long. The same basic structure was observed in both bands, with high identity with the conserved sequences



of bothropasin and jarahagin cDNAs, respectively. No introns were found with P3 primer, as expected (3' UTR).

**Conclusões:** These results indicate there are at least two genes coding for jararhagin and bothropasin. New *primers* will be designed to characterize other gene regions coding for important toxins domains. Apart the academic aspects of genome organization, this study will contribute to make available new cloned sequences to express toxin domains with pharmacological interest.

42.029

**RECK GENE EXPRESSION AND MMPs ACTIVITIES IN HUMAN CERVICAL CANCER.** <sup>1</sup> Cardeal, L. B. S.; <sup>1</sup> Brohem, C. A.; <sup>1</sup> Correa, T. C. S.; <sup>2</sup> Sogayar, M. C.; <sup>1</sup> Maria-Engler, SS ; <sup>1</sup>Análises Clínicas e Toxicológicas, FCF - USP; <sup>2</sup> Bioquímica, USP

**Objetivo:**

Objectives: Cervical cancer is one of the most common cancers among women worldwide. Almost 80% of the cases occur in countries in development. The cervical cancer etiology is associated to the human papillomavirus (HPV). Progression of this tumor is currently thought to represent a neoplastic transition from low-grade squamous intraepithelial lesions (LSIL) to invasive carcinoma. Matrix metalloproteinases (MMPs) are essential for tumor invasion and metastasis. *RECK* is a metastasis suppressor gene that inhibits MMPs activities. The aim of this work is to evaluate the role of *RECK* and MMPs in cellular invasion and metastasis processes.

**Métodos e Resultados:**

Material and Methods: Three human invasive carcinoma cell lines (SiHa and CaSki, of which are HPV16-positive; and the HPV-negative C33A line) were cultured onto type I collagen, MATRIGEL and plastic. *RECK* expression was detected by Northern blot and gelatinolytic activity of MMP-2 and MMP-9 by zymographic analysis.

Results: Preliminary data indicates a higher expression of the *RECK* gene and greater MMPs activity for SiHa and CaSki (HPV 16-positive cell lines), compared to C33A. Despite the lack of extracellular matrix substrate modulation of *RECK* expression, collagen type I increased both MMP-2 and -9 activities in all three cell lines.

**Conclusões:**

Conclusions: Interestingly, higher levels of *RECK* expression were detected in association with greater MMP-2 and MMP-9 activities, contrasting to what has previously been described for the role of the *RECK* gene (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:13221, 1998). Type I collagen gel, but not MATRIGEL, seems to increase MMPs activity, despite the lack of effect on *RECK* gene expression. Finally, our results suggest that the presence of HPV is related to increased *RECK* expression, but further investigation is still required.

42.030

**EXPRESSÃO DIFERENCIAL DA METALOPROTEINASE-1 *IN VITRO* E *IN VIVO* DA LINHAGEM TUMORAL DE PRÓSTATA DU-145.** <sup>1</sup> Coutinho, E. L. ; <sup>1</sup> Piccoli, F. M. ; <sup>1</sup> Schor, N. ; <sup>2</sup> Bellini, M. H. ; <sup>1</sup> Medicina - Nefrologia, UNIFESP; <sup>2</sup> Instituto de Química, IPEN/CNEN-SP

**Objetivo:**

A degradação da matriz extracelular é condição *sine qua non* para a invasão e metástase tumoral. A maior parte dessa degradação é mediada por metaloproteinases (MMPs), uma família de enzimas que, coletivamente, degrada a matriz extracelular (ECMs) e tecidos conectivos em torno das células tumorais. Entre os membros da família das MMPs, a colagenase MMP-1 é altamente expressa e alguns tumores e linhagens celulares.

Neste projeto, avaliamos comparativamente a expressão da MMP-1 em células de câncer de próstata da linhagem DU-145 quando em cultura (*in vitro*) e em modelo experimental de tumor primário de próstata (*in vivo*).

**Métodos e Resultados:**

A manutenção da linhagem celular DU-145 em cultura, foi feita em meio de EAGLE modificado por Dulbecco (DMEM), suplementado com soro fetal bovino 10%, penicilina/estreptomicina (100 UI/mL), glutamina (4mM), tamponado com bicarbonato de sódio (44mM). Para o xenoinplante, foram utilizados camundongos SCID machos de 6 - 8 semanas inoculando-se  $2 \times 10^6$  células suspensas em 200µl de solução PBS na região subcutânea do flanco direito, após 38 dias foi realizada a excisão do tumor. A extração de RNA tanto do tecido tumoral quanto das células em

cultura foi feita pelo método do Trizol®, 2µg de RNA foram submetidos a RT-PCR. Para analisar o nível de expressão da MMP-1 utilizamos PCR em Tempo Real com o Kit SYBER Green. A quantificação foi baseada na diferença entre as médias do “Limiar de ciclo” (CTs) das amostras experimentais e das do controle endógeno (GAPDH). Na reação foi utilizado 0,8 µl de cDNA para amplificar o RNAm da MMP-1 e GAPDH, para um volume final de 10µl.

O crescimento tumoral se deu após 21 dias de inoculação, atingindo um volume máximo de 600 mm<sup>3</sup> após 38 dias, quando os animais foram sacrificados. Utilizando-se as células DU-145 em cultura como referência observou-se, que *in vivo* os níveis de expressão da MMP-1 foram 80% inferiores.

**Conclusões:**

Os resultados demonstram que existe expressão diferencial da MMP-1 pelas células DU-145 *in vitro* e *in vivo*.

42.031

O MECANISMO DE RESISTÊNCIA DAS CÉLULAS LEUCÊMICAS U-937 AO TAXOL NÃO ENVOLVE A ATIVIDADE DA GLICOPROTEÍNA P (MDR1) <sup>1</sup> Ferreira, S. C. <sup>\*\*</sup>; <sup>2</sup> Leite, D. F. P. <sup>\*\*</sup>; <sup>3</sup> Locatelli, C. <sup>\*\*</sup>; <sup>4</sup> Santos-Silva, M. C. ; <sup>1</sup> Ciências Médicas, UFSC; <sup>2</sup> IBCCF, UFRJ; <sup>3</sup> Ciências Farmacêuticas, UFSC; <sup>4</sup> Análises Clínicas, UFSC

**Objetivo:**

Leucemias agudas são neoplasias malignas, originadas de mutações em precursores linfóides ou mielóides. Assim, diferem em etiologia, patogênese, prognóstico e resposta ao tratamento. O taxol é considerado como o antitumoral mais promissor desenvolvido nos últimos anos, mostrando-se eficaz no tratamento de vários tipos de câncer. Seu efeito citotóxico vem sendo observado em linhagens leucêmicas, entretanto, vários estudos demonstram que células tumorais podem tornar-se relativamente resistente ao taxol através do efluxo da droga, o qual envolve o aumento da expressão ou atividade da glicoproteína-P (PgP/MDR1). Anteriormente demonstramos que o taxol é citotóxico para células de linhagem de leucemia linfoblástica aguda (CEM) e no presente estudo investigamos o efeito citotóxico deste composto sobre células de linhagem de leucemia mielóide aguda (U-937), bem como o envolvimento da PgP na resistência ao taxol.

**Métodos e Resultados:**

Células leucêmicas U-937 foram incubadas com taxol (1-30 µM) por 24 h. A viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT. Os resultados mostraram que o taxol foi citotóxico para as células U-937 somente na concentração de 30 µM, 60% ±6 de células viáveis. Considerando a resistência das células U-937 ao efeito citotóxico do taxol, avaliamos a atividade PgP/MDR1 pelo teste de efluxo do substrato fluorescente (Rodamina 123; 200 ng/ml), por citometria de fluxo. Observou-se que não houve mudanças no acúmulo de Rodamina 123 entre células do grupo controle e naquelas tratadas com ciclosporina A (inibidor da Pgp; 200 ng/ml).

**Conclusões:**

Os resultados demonstram que as células de linhagem leucêmica U-937 são consideravelmente resistentes ao taxol, e que o mecanismo de resistência não está associada a atividade de PgP/MDR1.

42.032

EFEITO TERAPÊUTICO ANTI-TUMORAL DA METALOPROTEASE TIPO DISINTEGRINA JARARAGINA NO MELANOMA B16F10. Oliveira-Souza, P.; Lapetina, D. L. <sup>\*\*</sup>; Maria, D. A.; Bioquímica e Biofísica, Butantan

**Objetivo:** A Jararagina (JARA) é uma toxina obtida do veneno de *Bothrops jararaca*, pertence à família SVMPs - PIII, apresentando três domínios protéicos: metaloproteinase, disintegrina e o cisteína. As metaloproteinases de venenos ofídicos têm revelado potencial anti-metastático sobre linhagens tumorais. O objetivo deste trabalho é avaliar a possível aplicação terapêutica desta toxina, como droga anti-neoplásica ou como coadjuvante na modulação do crescimento e proliferação do melanoma B16F10.

**Métodos e Resultados:** Grupos de 10 camundongos C57Bl/6J, inoculados pela via subcutânea com células de melanoma murino B16F10. Os animais portadores de tumor dorsal receberam 24, 48, 96, 192ng de JARA pela via intraperitoneal e o grupo controle tratado com salina. Foram realizadas as contagens total e diferencial de leucócitos periféricos, e a análise quantitativa do

infiltrado da cavidade peritoneal, como também a avaliação da área e volume tumoral. As fases do ciclo celular e a atividade proliferativa foram determinados por citometria de fluxo. A Jara induziu aumento significativo no número total de leucócitos, na circulação e no compartimento peritoneal. Os animais portadores de tumor e tratados apresentaram aumento na taxa de sobrevivência dos animais nas doses 96 e 192 ng de JARA, com redução da área e aumento na taxa de sobrevivência (Kaplan-Meier). A JARA altera significativamente a proporção de distribuição das populações celulares nas fases do ciclo celular (apoptose  $7.6 \pm 0.42$  – G0/G1  $18,4 \pm 0.77$  - S  $47.2 \pm 0.99$  e G2/M  $28.8 \pm 6.1$ ).

**Conclusões:** Baixas concentrações de Jara induzem respostas inflamatórias, sem causar injúria no sistema vascular ou na microvascularização, no tecido subcutâneo ou peritumoral. A área do tumor dorsal nos animais tratados nas concentrações de 24, 48, 96 e 192 ng apresentaram uma redução significativa no crescimento tumoral, com aumento na taxa de sobrevivência, e a indução de apoptose e parada no ciclo celular (G2/M).

42.033

CARACTERIZAÇÃO DOS GENES DE RESISTÊNCIA A MÚLTIPLAS DROGAS (MDR1, MRP E LRP), EM CÉLULAS DE SARCOMA UTERINO, SENSÍVEIS E RESISTENTES À DOXORRUBICINA, *IN VITRO*.<sup>1</sup> Levy, D. ;<sup>2</sup> Bravo, A. A. D. ;<sup>3</sup> Rezende, B. C. G. ;<sup>4</sup> Rubens, C. V. ;<sup>5</sup> Buccheri, V. ;<sup>1</sup> Bydlowski, S. P. ;<sup>1</sup> Hematologia - HCFMUSP; <sup>2</sup> Hematologia, Hemocentro de São Paulo; <sup>3</sup> Clínica Médica, FMVZ-USP; <sup>4,5</sup> Hematologia Experimental, Fund. Maria Cecília Souto Vidigal;

**Objetivo:**

Verificar a expressão dos genes MDR1, MRP e LRP e caracterizar a expressão funcional do MDR1, em linhagem celular de sarcoma uterino sensíveis e resistentes a doxorubicina.

**Métodos e Resultados:**

Células de sarcoma uterino sensíveis (MES-SA) e resistentes (MES-SA/Dx5) foram cultivadas em meio McCoy 5A com SFB 10%. O RNA total das amostras foi extraído com Trizol e as expressões do gene MDR-1, MRP e LRP foram avaliadas por RT-PCR, tendo como controle interno o produto do gene da  $\beta$ -2-microglobulina. O produto da amplificação foi avaliado através de eletroforese em gel de agarose 2%. As proteínas totais das células foram conservadas em tampão de lise e foi realizado dot blot, utilizando-se anticorpo específico para cada gene. A expressão funcional do MDR1 foi verificada através do efluxo de rodamina 123. A expressão do gene MDR-1 foi observada em células de sarcoma uterino resistente à doxorubicina (MES/AS); a linhagem sensível não apresentou expressão deste gene, tanto através de RT-PCR como do dot blot. Os genes MRP e LRP foram expressos tanto na linhagem sensível como na resistente. Foi possível observar efluxo de rodamina 123 nas células resistentes, não sendo constatado nas células sensíveis.

**Conclusões:**

As linhagens celulares de sarcoma uterino sensíveis e resistentes à doxorubicina expressam os genes LRP e MRP. A expressão do gene MDR-1 somente foi observada nas linhagens de sarcoma uterino resistente à doxorubicina. Foi possível obter a expressão funcional do gene MDR1 através do efluxo de rodamina 123. A expressão de MRP e LRP na linhagens assinaladas deve ser considerada em experimentos que a utilizam.

42.034

GALECTINA-3 EXTRACELULAR DESESTABILIZA OS CONTATOS FOCAIS ATRAVÉS DA INTERAÇÃO COM B1 INTEGRINA<sup>1</sup> Melo, F. H. M. ;<sup>2</sup> Santos, M. F.;<sup>1</sup> Chammas, R.;<sup>1</sup> FM-USP; <sup>2</sup> ICB-USP

**Objetivo:**

Durante a progressão tumoral de sarcomas, há aumento de galectina-3, uma lectina animal que tem afinidade por  $\alpha$ -galactosídeos. Galectina-3 é secretada para o espaço extracelular onde pode modular interações célula-matriz durante a migração e adesão celular de maneira carboidrato dependente. Baseado nestes dados o objetivo deste trabalho foi determinar o papel de galectina-3 nas interações entre os fibroblastos e a laminina-1.

**Métodos e Resultados:**

Foram estabelecidas linhagens celulares derivadas de sarcomas induzidos por metilcolantreno em animais selvagens e em nulzigotos para o gene da galectina-3. As células que expressavam

galectina-3 apresentaram maior capacidade migratória e menor capacidade de adesão estática em superfícies de laminina-1. Galectina-3 interage com duas principais glicoproteínas presentes na superfície celular. Uma dessas glicoproteínas foi identificada positivamente como  $\alpha$ 1 integrina através de ensaios de imunoprecipitação. Em ensaios de migração, observou-se que a adição de galectina-3 exógena diminuiu a fosforilação de FAK nos contatos focais e diminuiu a quantidade de fibras de estresse nas células migratórias, levando a reorganização do citoesqueleto. Este efeito foi inibido por lactose.

**Conclusões:**

Nós sugerimos que galectina-3 extracelular se liga a  $\alpha$ 1 integrina e desestabiliza as placas de adesão focal, dessa maneira favorecendo a migração celular. Esses resultados indicam que a galectina-3 está modulando o processo de migração. Assim, a galectina-3 pode ser caracterizada como uma proteína matricelular.

42.035

ALTERAÇÕES NO CONTEÚDO DE TBARS NO SORO DE PACIENTES COM CÂNCER DE ÚTERO SUBMETIDAS A TRATAMENTO RADIO OU QUIMIOTERÁPICO. <sup>1</sup> Battisti, V. ; <sup>2</sup> Maldonado, P.A. \*\*; <sup>2</sup> Zanin, R.F. \*\*; <sup>2</sup> Araújo, M.C. \*\*; <sup>2</sup> Morsch, A. L. \*\*; <sup>2</sup> Schetinger, M. R. ; <sup>2</sup> Morsch, V. M. ; <sup>1</sup> Bioquímica - CCS, UFSM; <sup>2</sup> Química, UFSM

**Objetivo:** O stress oxidativo ocorre devido a um distúrbio no balanço entre a produção de radicais livres e a eficiência da defesa antioxidante, sendo alvos preferenciais destes radicais, os lipídios, as proteínas e os ácidos nucléicos (Clin. Chim. Acta 339:27-32,2004). Dentre os lipídios, os ácidos graxos polinsaturados, são muito susceptíveis ao ataque de radicais livres, podendo levar a peroxidação lipídica. Segundo Olszwer, os radicais livres são produzidos intensamente no câncer, incluindo o câncer de útero, uma afecção ginecológica maligna comum, ao mesmo tempo em que nestes pacientes os níveis de antioxidantes estão substancialmente baixos. Sabendo-se que pacientes oncológicos submetidos a tratamento radioterápico estão mais susceptíveis às ações danosas de agentes oxidantes, como os radicais livres, e que estes têm como alvo preferencial os lipídios de membrana, se faz importante a avaliação da lipoperoxidação através da dosagem das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico.

**Métodos e Resultados:**

as pacientes foram divididas em 2 grupos, Grupo 1( n=9) formado de mulheres saudáveis e Grupo 2(n=10) de mulheres com diagnóstico confirmado de câncer uterino, submetidas a Químio ou Radioterapia. O livre consentimento, aprovado pelo Centro de Ciências da Saúde, foi obtido de todas as pacientes. Os níveis de TBARS em amostras de soro foram determinados por modificações do método de Jentzsch (Free Radic. Biol. Med., 20(2):251-6;1996) e os resultados estão representados como média $\pm$ desvio padrão e foram expressos em nmol MDA/ml conforme a tabela abaixo:

**Conclusões:** com base nos dados acima representados, verificou-se o aumento do conteúdo de TBARS no soro de pacientes submetidas à Radio ou Quimioterapia em relação aos controles saudáveis.

42.036

INFLUÊNCIA DO ESTADIAMENTO DO CÂNCER DE MAMA NA HIDRÓLISE DE ATP, ADP E AMP EM PLAQUETAS. Zanin, R.F. ; Morsch, A. \*\*; Araújo, M. C. \*\*; Schetinger, M. R. C. ; Morsch, V. M. ; Química, UFSM

**Objetivo:** Dados da literatura indicam que nucleotídeos de adenina têm um importante papel no crescimento e na trombogênese de tumores. Por isso, é de grande importância verificar a atividade das enzimas que hidrolisam nucleotídeos de adenina em plaquetas de pacientes com câncer de mama, para ajudar no entendimento da trombogênese nas doenças malignas como o câncer.

**Métodos e Resultados:** Todos os pacientes foram informados de suas participações no estudo. O protocolo foi aprovado pelo comitê de ética do centro de ciência da saúde da Universidade Federal de Santa Maria. A atividade da NTPDase em plaquetas foi determinado pelo método de Pilla (Platl. 7:225,1996) a 5' nucleotidase foi determinada pelo método Heyman (J. of Neurochem. 43:263, 1984). O fosfato inorgânico liberado foi medido pelo método de Chan (Anal. Biochem. 157:375, 1986). Os pacientes foram divididos em grupo controle e conforme o estadiamento da doença obedecendo a classificação de TNM para tumor de mama. A atividade da enzima foi expressa

nmol/Pi/mg prot./min. Os resultados demonstraram uma elevação na hidrólise do ATP no estágio I e II do câncer de mama ( $F(4,113)=4.35$ ;  $p<0.005$ ) mas, retornaram ao valores normais nos estágios III e IV. A hidrólise do ADP foi reduzida no estágios II e IV ( $F(4,105)=3.88$ ,  $p<0.01$ ). A hidrólise do AMP foi aumentada no estágio II ( $F(4,105)=3.45$ ,  $p<0.01$ ), mas retornou ao normal no câncer nos estágios III e IV. Os resultados foram analisados por ANOVA de uma via.

**Conclusões:** Esses dados nos sugerem que com o aumento da hidrólise de ATP há um acúmulo de ADP, já que sua hidrólise está diminuída, podendo assim contribuir na ativação plaquetária e conseqüente formação de trombos.

42.037

QUERCETINA INIBE A ATIVIDADE E A EXPRESSÃO DA ECTO-5'-NUCLEOTIDASE EM LINHAGEM DE GLIOMA U138MG. Braganhol, E. ; Tamajusuku, A. S. K. <sup>\*\*\*</sup>; Wink, M. R. ; Sarkis, J. J. F. ; Battastini, A. M. O. ; Bioquímica - ICBS, UFRGS

**Objetivo:** Nucleotídeos e nucleosídeos extracelulares têm sido apontados como agentes participantes de cascatas de regulação do crescimento e do ciclo celular. O controle dos níveis dessas moléculas é realizado pelas ectonucleotidasas (ENTPDases) que hidrolisam o ATP até AMP e este, por sua vez, serve como substrato da ecto-5'-nucleotidase (ecto-5'-NT/CD73), gerando adenosina. Quercetina, tem sido apontada como um agente antiproliferativo e indutor de apoptose/diferenciação de células tumorais. Assim, o objetivo desse trabalho é avaliar o efeito do tratamento com quercetina sobre a atividade e expressão da ecto-5'-NT em cultura de glioma U138MG.

**Métodos e Resultados:** As culturas de glioma U138MG foram tratadas com quercetina (0.1 a 100 $\mu$ M) por 24, 48 e 72h. Após o tratamento, o efeito da quercetina sobre a hidrólise do AMP foi avaliado pelo fosfato inorgânico liberado. O tratamento por 72h com quercetina nas concentrações de 30 e 100 $\mu$ M inibiu a hidrólise do AMP em 32 e 35%, respectivamente. Para melhor investigar esse resultado, foi realizada análise da expressão da ecto-5'-NT/CD73 por meio de RT-PCR. As culturas foram tratadas com quercetina (30 e 100 $\mu$ M) por 72h. O RT-PCR foi realizado segundo protocolo do fabricante, utilizando-se primers específicos para ecto-5'-NT e GAPDH. Os resultados obtidos demonstraram uma diminuição de 65% e 85% dos níveis de mRNA da ecto-5'-NT nas concentrações de quercetina 30 e 100 $\mu$ M, respectivamente.

**Conclusões:**

Considerando que a ecto-5'-NT/CD73 encontra-se envolvida em eventos de migração e adesão celular, o efeito inibitório sobre a atividade e expressão desta proteína poderia explicar os efeitos antiproliferativos da quercetina previamente demonstrados. Além disso, a quercetina estaria diminuindo a produção do nucleosídeo adenosina que é um importante indutor de proliferação celular. Embora maiores estudos sejam necessários, os resultados apresentados apóiam o potencial uso da quercetina como uma ferramenta farmacológica no tratamento de gliomas.

42.038

INFLUÊNCIA DA DOENÇA ENXERTO-VERUS-HOSPEDEIRO QUÍMICA (QGVHD) NA EVOLUÇÃO DO TUMOR DE EHRLICH. <sup>1</sup> Russo, L. C. ; <sup>2</sup> Barros, J. C. ; <sup>3</sup> Castelli, J. ; <sup>4</sup> Zyngier, S. B. ; <sup>1</sup> Farmacologia, USP; <sup>2</sup> Hematologia, Santa Casa de Misericórdia; <sup>3</sup> Anatomia Patológica, INCOR; <sup>4</sup> Farmacologia - ICB I, USP

**Objetivo:**

O desenvolvimento da doença enxerto-versus-hospedeiro (GVHD) durante tratamento de certos tumores é considerado como fator de melhor prognóstico na evolução dessas neoplasias. Para aproveitar esse fator prognóstico sem os inconvenientes de um transplante de medula, pode-se induzir uma síndrome semelhante (qGVHD) pela combinação de agentes quimioterápicos. O objetivo foi verificar a ação da qGVHD na evolução do tumor de Ehrlich.

**Métodos e Resultados:**

- Indução da GVHD química: camundongos Balb-c machos (25 gramas) foram tratados com 200 mg/kg de ciclofosfamida (CFM) ip, dose única, seguidos de 15 mg/kg de Ciclosporina A (CsA) vo por 28 dias (n=15). Três grupos controles receberam solução fisiológica (SF) (n=5), apenas CFM ip em dose única (n=5) e CsA vo por 28 dias (n=5).

- Biópsias para comprovar qGVHD.

- Implante do tumor: no 14º dia após o término da indução da qGVHD injetou-se, na coxa dos animais,  $10^5$  células de tumor de Ehrlich im.

- Medida dos volumes tumorais: os diâmetros maior (a) e menor (b) foram medidos semanalmente por 4 semanas, com paquímetro. Os volumes foram obtidos pela fórmula  $a \times b^2/2$ .

- Análise estatística: análise de variância com medidas repetidas e comparações múltiplas. Nível de significância:  $p \leq 0,05$ .

**Resultados:** Não houve diferença de volume tumoral entre os grupos SF e só CFM. O grupo que recebeu apenas CsA apresentou um volume significativamente maior que SF nas três primeiras semanas. Isso pode ser explicado pela imunossupressão causada pela droga.

O grupo tratado para obtenção da qGVHD apresentou crescimento tumoral maior na primeira semana em relação à SF (imunossupressão pela CsA). Nas semanas seguintes o crescimento foi relativamente menor, e na quarta semana o volume tumoral foi significativamente menor em relação à SF, o que pode ser consequência do efeito anti-tumoral da qGVHD.

**Conclusões:**

Houve uma redução significativa na evolução do tumor de Ehrlich no grupo de camundongos que tiveram o desenvolvimento de qGVHD.

42.039

EFEITOS DO PARECOXIBE SOBRE O CATABOLISMO DA ALANINA DE FÍGADOS PERFUNDIDOS ISOLADOS DE RATOS PORTADORES DE TUMOR WALKER-256 <sup>1</sup> Silva, M.H.R.A. \*; <sup>1</sup> Yamamoto, N. S.; <sup>1</sup> Teodoro, G. R. \*; <sup>1</sup> Arraes, L. S. ; <sup>1</sup> Comar, J. F. \*\*; <sup>1</sup> Bracht, A. ; <sup>2</sup> Acco, A. ; <sup>1</sup> Bioquímica - CCB, UEM; <sup>2</sup> Bioquímica, UNIPAR

**Objetivo:** O tumor Walker-256 induz caquexia em ratos caracterizada por perda progressiva de peso associada a várias alterações metabólicas. Dados prévios revelaram que a produção de uréia e glicose a partir da alanina é reduzida nos fígados perfundidos isolados de ratos caquéticos. Estudos recentes sugerem o uso de inibidores seletivos da ciclooxigenase-2 para atenuar a caquexia associada a diversos tipos de tumores. O objetivo deste trabalho foi o de avaliar o catabolismo da alanina de fígados isolados de animais com tumor e especialmente a resposta ao tratamento da droga antiinflamatória parecoxibe, inibidora específica da COX 2.

**Métodos e Resultados:** Ratos machos Wistar foram separados em dois grupos: grupo com tumor não tratado (n=5) e grupo com tumor tratado com parecoxibe (n=5). A suspensão de células de tumor foi injetada subcutaneamente no flanco direito dos dois grupos de ratos. Desde o 1º dia da implantação do tumor, apenas o grupo com tumor tratado recebeu injeção de 1,0 mg de parecoxibe por via intraperitoneal a cada 12 horas durante 14 dias. Os experimentos de perfusão foram feitos 14 dias após as injeções com fígados isolados de ratos com tumor, jejuados por 24 horas. A produção de uréia a partir da alanina 2,5 mM de ratos com tumor não tratados foi de  $0,2083 \pm 0,082$   $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{g}$ , enquanto a dos ratos tratados com parecoxibe foi de  $0,2024 \pm 0,056$   $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{g}$ , não havendo diferença entre os dois grupos ( $p=0,953$ ). Estes valores são em torno de 52% menor que a produção de uréia em ratos normais sem tumor. As produções de glicose, amônia, lactato e piruvato a partir da alanina dos dois grupos de ratos também foram semelhantes.

**Conclusões:**

A diminuição do catabolismo da alanina causada pelo estado caquético induzido pelo tumor Walker-256 não é revertida pelo tratamento com o parecoxibe.

42.040

ANÁLISE DA PREVALÊNCIA DO PAPILOMA VÍRUS HUMANO EM CARCINOMAS EPIDERMÓIDES DE CAVIDADE ORAL DE PACIENTES DO HOSPITAL SANTA RITA DE PORTO ALEGRE, UTILIZANDO A TÉCNICA DE PCR. LIMA, L. O. ; Azevedo, J. \*\*; Herter, N.T. ; Alexandre, C.O.P. ; Frazzon, A.P.G. ; Biologia Molecular, FFFCMPA

**Objetivo:** Determinar a frequência e o tipo de papiloma vírus humano (HPV) em espécimes cirúrgicos de carcinomas epidermóides de cavidade oral (CECO)

**Métodos e Resultados:** Até o momento, foram analisados 19 pacientes portadores CECO oriundos do Serviço de Cabeça e Pescoço do Hospital Santa Rita do Complexo Hospitalar Santa Casa de Porto Alegre. Destes 8 eram do sexo feminino e 12 do sexo masculino, com idade média de 57,05 (27 - 89 anos). A extração de DNA foi realizada utilizando o QIAamp Tissue Kit (QIAGEN, USA, 1999) de tecidos fixados em formol e embebidos em parafina. Para a detecção e

determinação da frequência do HPV foi empregada a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) para amplificar uma parte específica da região E6 do vírus. A região E6 codifica proteínas que são responsáveis pela indução e regulação da replicação viral do HPV-16 e 18 e está relacionada com a oncogênese viral. Os *primers* específicos para esta região foram descritos por Nuovo *et al.*, 1991 (Am. J. Pathol.138: 53, 1991) e as condições conforme Damin *et al.*, 2004 (Breast Cancer Res. Treat. 84: 131, 2004). A integridade do DNA das amostras foi verificada pela amplificação do gene da  $\alpha$ -globina humana utilizando os *primers* descritos por Saiki *et al.*, 1985 (Science 230: 1350, 1985). Das 19 amostras analisadas, 9 (47,37%) foram positivas para o HPV-18 e 19 (100%) para HPV-16. Destas 9 (47,37%) apresentaram co-infecção. Não foi encontrada correlação com as variáveis clínicas-patológicas.

**Conclusões:** Os dados preliminares demonstram que a infecção pelo HPV dos tipos 16 e 18 tem alta prevalência na cavidade oral dos pacientes investigados e não estão correlacionados com as variáveis clínico-patológicas.

42.041

ATIVIDADES DAS ENZIMAS NTPDASE-1 E 5'-NUCLEOTIDASE EM PLAQUETAS DE PACIENTES COM CANCER DE PROSTATA. <sup>1</sup> Morsch, A. ; <sup>1</sup> Zanin, R.F. \*\*; <sup>1</sup> Araújo, M. C. \*\*; <sup>1</sup> Da Silva, A. C. \*; <sup>2</sup> Battisti, V. \*; <sup>1</sup> Bauchspiess, R. ; <sup>1</sup> Schetinger, M. R. C. ; <sup>1</sup> Morsch, V. M. ; <sup>1</sup> Química, UFSM; <sup>2</sup> Bioquímica - CCS, UFSM

**Objetivo:** Sabe-se que os nucleotídeos da adenina (ATP, ADP e AMP) possuem importantes funções na regulação do fluxo sanguíneo e formação de trombos. Assim, enzimas que degradam estes nucleotídeos, como a NTPDase-1 e 5'-Nucleotidase, participam dos processos de hemostase sanguínea. O objetivo deste trabalho é avaliar a atividade destas duas enzimas em plaquetas de pacientes com câncer de próstata, patologia freqüentemente associada a distúrbios da coagulação.

**Métodos e Resultados:**

As amostras de sangue foram obtidas após permissão consentida dos pacientes do Laboratório de Hematologia-Oncologia do HUSM e aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa da mesma instituição (Protocolo 091-04). As plaquetas foram separadas e as atividades enzimáticas foram determinadas segundo técnica descrita por Pilla (Platelets 7:225, 1996). Os resultados estão apresentados na tabela abaixo, onde as atividades são expressas em nmol Pi/ min/ mg de proteína.

As plaquetas de pacientes com câncer de próstata apresentaram alteração no perfil de hidrólise dos nucleotídeos ATP e ADP pela NTPDase-1, enquanto que não foram observadas diferenças significativas na hidrólise do AMP pela 5'-Nucleotidase em relação aos controles.

**Conclusões:** Os resultados obtidos indicam que há uma maior hidrólise de ATP, uma diminuição na hidrólise do ADP, sem alteração na hidrólise do AMP em plaquetas de pacientes com câncer de próstata. Assim, pode-se sugerir que há um acúmulo local de ADP, um forte agente protrombótico. Este resultado é coerente com a clínica da doença, já que é bastante freqüente a incidência de eventos trombóticos em pacientes com esta patologia.

42.042

INFLUÊNCIA DO TEMPO DE USO DO TAMOXIFENO SOBRE A ATIVIDADE DAS ENZIMAS NTPDase E 5' NUCLEOTIDASE EM PLAQUETAS DE PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA. Zanin, R.F. ; Morsch, A.L.B. \*\*; Araújo, M. C. \*\*; Schetinger, M. R. C. ; Morsch, V. M. ; Química, UFSM

**Objetivo:** Os nucleotídeos de adenina tais como ATP, ADP e AMP estão diretamente relacionados a ativação plaquetária, principalmente o ADP um forte pró agregante. Logo, é de grande importância verificar a influência do tempo de uso do tamoxifeno na atividade das enzimas NTPDase e 5' nucleotidase em plaquetas de pacientes com câncer de mama e suas implicações no sistema de coagulação.

**Métodos e Resultados:** Todos os pacientes foram informados de suas participações no estudo. O protocolo foi aprovado pelo comitê de ética do centro de ciências da saúde da Universidade Federal de Santa Maria. A atividade da NTPDase em plaquetas foi determinado pelo método de Pilla (Platl. 7:225,1996) a 5' nucleotidase foi determinada pelo método Heyman (J. of Neurochem. 43:263, 1984). O fosfato inorgânico liberado foi medido pelo método de Chan (Anal. Biochem. 157:375, 1986). Os pacientes foram divididos em 4 grupos: grupo controle, pacientes com câncer

de mama sem o uso de tamoxifeno, pacientes usando tamoxifeno por 1-48 meses, pacientes usando tamoxifeno por 49-84 meses. A atividade da enzima foi expressa nmol/Pi/mg prot./min. Os resultados demonstraram um aumento na hidrólise do ATP ( $F(3,114)=8.53$ ;  $p<0.001$ ) e uma redução na hidrólise de ADP ( $F(3,106)=5.09$ ,  $p<0.01$ ) em função do uso de tamoxifeno e o AMP não alterou a sua hidrólise. Os resultados foram analisados por ANOVA de uma via.

**Conclusões:** A hidrólise do AMP não foi significativo por mais que apresente tendência a aumentar em função do uso do medicamento. Já os resultados de ATP e ADP sugerem que o uso do tamoxifeno tem influência sobre a hidrólise de nucleotídeos em plaquetas de pacientes com câncer de mama podendo assim, levar a um aumento da ativação plaquetária.

42.043

MEDIDA DAS SUBSTANCIAS REATIVAS AO ACIDO TIOBARBITÚRICO (TBARS) EM SORO E HEMÁCIAS DE PACIENTES COM CANCER DE PROSTATA. <sup>1</sup> Morsch, A. ; <sup>1</sup> Zanin, R.F. \*\*; <sup>1</sup> Araújo, M. C. \*\*; <sup>1</sup> Silva, A. C. \*\*; <sup>2</sup> Battisti, V. ; <sup>1</sup> Bauchspiess, R. ; <sup>1</sup> Schetinger, M. R. C. ; <sup>1</sup> Morsch, V. M. ; <sup>1</sup> Química, UFSM; <sup>2</sup> Bioquímica - CCS, UFSM

**Objetivo:** Existem diversos trabalhos na literatura demonstrando o aumento do estresse oxidativo em pacientes com câncer recém diagnosticado. Entretanto, pouco se sabe sobre a influência do tratamento na lipoperoxidação. O objetivo deste trabalho é avaliar a produção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em amostras de Soro e Hemácias de pacientes com câncer de próstata sob tratamento com o medicamento antiandrogênico Androcur® (Citrato de Ciproterona).

**Métodos e Resultados:** As amostras de sangue foram obtidas após permissão consentida dos pacientes do Laboratório de Hematologia-Oncologia do HUSM e aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa da mesma instituição (Protocolo 091-04). O soro e as hemácias foram separados e a medida do TBARS foi realizada segundo Jentzsch (Free Rad. Biol. Med. 2:251, 1996). Os resultados estão apresentados na tabela abaixo, expressos em nmol MDA/ mL (soro) e nmol MDA/ Hg (hemácias).

**Conclusões:** Os resultados obtidos indicam que há uma menor produção de TBARS em soro e hemácias de pacientes com câncer de próstata sob tratamento com Androcur®. Assim, pode-se sugerir que a terapia antiandrogênica promove uma diminuição nos níveis de lipoperoxidação.

42.044

42.044

FARMACOCINÉTICA E CAPTAÇÃO TECIDUAL DE UMA MICROEMULSÃO RICA EM COLESTEROL ASSOCIADA A UM DERIVADO DO QUIMIOTERÁPICO PACLITAXEL. <sup>1</sup> Rodrigues, D. G. ; <sup>1</sup> Fernandes, D. C. ; <sup>2</sup> Lo Prete, A. C. ; <sup>2</sup> Azevedo, C. H. M. \*\*; <sup>1</sup> Valduga, C. J. ; <sup>3</sup> Maria, D. A. ; <sup>2</sup> Maranhão, R. C. ; <sup>1</sup> Lípides, InCor - HCFMUSP; <sup>2</sup> Análises Clínicas, FCF - USP; <sup>3</sup> Biofísica e Farmacologia, Butantan

**Objetivo:**

Previamente foi descrito a associação do oleato de paclitaxel a uma microemulsão (LDE), a qual é captada pelos receptores da LDL. O objetivo deste estudo é avaliar a farmacocinética e a captação tecidual da associação LDE-oleato de paclitaxel comparando-a com a formulação comercial.

**Métodos e Resultados:**

1,2 kBq de [<sup>3</sup>H]-oleato de paclitaxel associado a [<sup>14</sup>C]-LDE ou 1,2 kBq de [<sup>3</sup>H]-paclitaxel comercial foram injetados em camundongos C57BL/6J fêmeas/20-25g. Amostras de sangue foram coletadas em intervalos pré-determinados e a radioatividade foi medida por cintilação líquida. A captação tecidual foi determinada em amostras de fígado e tumor de camundongos inoculados com tumor melanoma B16F10 após 5, 15, 30, 60 e 240 minutos da injeção endovenosa de LDE-oleato de paclitaxel e paclitaxel comercial. A taxa fracional de remoção (TFR) da LDE e do oleato de paclitaxel não são diferentes ( $0,078 \pm 0,051$  e  $0,042 \pm 0,022 \text{ h}^{-1}$ , respectivamente,  $p = 0,088$ ). A TFR do paclitaxel comercial é maior do que a do fármaco associado a LDE ( $0,134 \pm 0,047$  e  $0,042 \pm 0,022 \text{ h}^{-1}$ , respectivamente,  $p = 0,032$ ). A associação do fármaco aumenta o  $T_{1/2}$  e a AUC e diminui o CL, quando comparada com o fármaco em sua formulação comercial ( $t_{1/2} = 218$  e  $184$  min, AUC =  $1334$  e  $707 \mu\text{gh/mL}$ , CL =  $0,125$  e  $0,236 \text{ mL/min}$ ). Inicialmente o fármaco comercial concentra-se 5,3 vezes mais no tumor (5 min) e 1,5 vezes (15 min) do que o fármaco associado a



LDE. No entanto, o fármaco associado a LDE concentra-se 1,3, 4,7 e 24,5 vezes mais no tumor do que o fármaco comercial nos intervalos de 30, 60 e 240 min, respectivamente.

**Conclusões:**

Quando comparada à formulação comercial, a associação LDE-oleato de paclitaxel promove mudanças nos parâmetros farmacocinéticos e na captação tecidual do fármaco. Tais mudanças podem contribuir para o aumento de sua atividade farmacológica.

42.045

ANALYSIS OF MRNA EXPRESSION PATTERN OF RNU2 AND VAMP3 GENES IN PROSTATE CANCER <sup>1</sup> Matos, LC ; <sup>1</sup> Pontes, ER \*\*; <sup>2</sup> Da Silva, EA ; <sup>2</sup> Da Silva, LSX \*; <sup>3</sup> Diaz, BL ; <sup>4</sup> Reis, EMR ; <sup>4</sup> Verjovski-Almeida, S ; <sup>1</sup> Barcinski, MA ; <sup>1</sup> Gimba, ERP ; <sup>1</sup> Medicina Experimental, INCa-RJ; <sup>2</sup> Ciências da Saúde, UERJ; <sup>3</sup> Biologia Celular, INCa; <sup>4</sup> Instituto de Química, USP

**Objetivo:** Current molecular markers for prostate cancer (PC) present many limitations. Our study aims to characterize differentially expressed genes in PC and analyse their potential as new serum markers. Our strategy is to produce recombinant proteins using these isolated protein coding genes and then evaluate humoral immune response against them.

**Métodos e Resultados:** We previously isolated 56 differentially expressed transcripts (Reis et al., 2004). Among them, we searched for potential protein coding genes using standard sequence analysis. Two genes, namely RNU2-like and VAMP3, whose expression has been validated by RT-PCR, were then evaluated for mRNA expression pattern in different tumor cell lines and tumor and non tumor adjacent tissues. Our data showed that these transcripts are expressed in all these analysed samples. Although presenting an ubiquitous mRNA expression, immunoblot assays showed that 37% of PC and not normal healthy subjects plasma samples present autoantibodies against RNU2-like recombinant protein, showing an specific immune response for this tumor associated antigen. RT-PCR assays showed the presence of both sense and antisense transcripts for RNU2-like gene in PC tumors.

**Conclusões:** We could see that although these genes present an ubiquitous expression, a specific humoral immune response has been observed for RNU2-like recombinant protein. These data suggested that RNU2-like protein could be a new potential serum marker for PC. Sense and antisense transcripts for RNU2-like are expressed in PC and further studies are needed to investigate the role of antisense transcripts for this gene.

42.046

EFEITO DA LAMININA E DE SEUS PEPTÍDEOS BIOATIVOS SIKVAV E AG-73 NO FENÓTIPO DE LINHAGEM CELULAR DERIVADA DE ADENOMA PLEOMÓRFICO <sup>1</sup> Neto, N. S. ; <sup>2</sup> Freitas, V. M. \*\*; <sup>2</sup> Jaeger, R. ; <sup>1</sup> Biologia Celular e do Desenvolvimento, FAPESP; <sup>2</sup> Biologia Celular e do Desenvolvimento, Instituto de Ciências Biomédicas

**Objetivo:** O adenoma pleomórfico é uma neoplasia benigna de glândulas salivares, com quadro histológico complexo caracterizado por células epiteliais, células mioepiteliais, e células mioepiteliais modificadas; junto a tecido de aparência mixóide ou condróide. Essa neoplasia expressa grande quantidade de proteínas da matriz extracelular, entre elas a laminina-1. Estudamos o papel da laminina-1 e de seus peptídeos bioativos SIKVAV (porção carboxi-terminal da cadeia alfa) e AG73 (RKRLQVQLSIRT, domínio globular da cadeia alfa) como reguladores da morfologia de linhagem celular (AP4) derivada de adenoma pleomórfico. Esses peptídeos foram escolhidos porque foram efetivos em outros sistemas, e também apresentaram efeito biológico em trabalhos do Laboratório envolvendo linhagens de outros tumores de glândulas salivares.

**Métodos e Resultados:** Células AP4 foram crescidas dentro de agarose (controle), dentro de laminina-1, e dentro de laminina-1 enriquecida ou por SIKVAV ou por AG73. O peptídeo SIKVAV foi obtido comercialmente (Calbiochem-Novabiochem Co. La Jolla, CA, USA). O peptídeo AG73 foi sintetizado por encomenda pela empresa Molecula Research Laboratories, Princeton Peptides, Herndon, VA, USA. Todos os peptídeos possuíam 98% de pureza, confirmada por RP-HPLC. O peso molecular dos peptídeos foi confirmado por espectrometria de massa. As células AP4 foram crescidas dentro desses substratos por 48 horas, sendo as eventuais modificações fenotípicas analisadas por microscopia de luz (HE). Células AP4 crescidas em agarose (controle) apresentaram-se arredondadas ou fusiformes, não coesivas e sem arranjo particular. Essa situação se modificou totalmente quando nos grupos tratados. Células AP4 crescidas em laminina-

1 exibiram arranjo de células fusiformes, sendo evidente o aumento da deposição de matriz extracelular. Células AP4 tratadas por laminina-1 enriquecida por SIKVAV também mostraram esse aumento, com formação de massas hialinas. O peptídeo AG73, por outro lado, induziu fenótipo totalmente diferente nas células AP4 (Fig 3 A, B). O exame morfológico mostrou a presença de cavidades revestidas ou por células pavimentosas ou por células estrelárias. Esse resultado sugere remodelação da matriz extracelular.

**Conclusões:** Nossos resultados sugerem que laminina-1 e seus peptídeos bioativos SIKVAV e AG73 são morfomoduladores de linhagem celular derivada de adenoma pleomórfico. Laminina-1 e SIKVAV aumentaram a deposição de matriz extracelular. Por outro lado, o peptídeo AG73 induziu remodelação dessa matriz.

42.047

EFEITO DO EXTRATO DA CIANOBACTÉRIA SPIRULINA PLATENSIS CONTENDO O PIGMENTO FICOCIANINA, EM LINHAGENS CELULARES QUE EXPRESSAM, OU NÃO, O FENÓTIPO DE RESISTÊNCIA A MÚLTIPLAS DROGAS <sup>1</sup> Lopes, T. M. <sup>\*\*</sup>; <sup>1</sup> Votto, A. P. S. ; <sup>2</sup> Costa, J. A. V. ; <sup>2</sup> Kalil, S. J. ; <sup>1</sup> Trindade, G. S. ; <sup>1</sup> Ciências Fisiológicas, FURG; <sup>2</sup> Química, FURG

**Objetivo:** A resistência a múltiplas drogas (MDR) é um fenômeno no qual células tumorais, selecionadas resistentes a um agente quimioterápico, adquirem resistência a outras drogas, aparentemente não relacionadas. O mecanismo MDR melhor estudado é a superexpressão da glicoproteína-P (Pgp), e avaliar a capacidade de determinados agentes vencerem esta resistência é um desafio para vários pesquisadores. O pigmento ficocianina é um dos constituintes mais abundantes da *Spirulina platensis* e vem sendo estudado por possuir várias propriedades como antioxidante, antiinflamatório, hepatoprotetor, inibidor de COX-2 e agente fotossensibilizante. Com isso o objetivo deste trabalho foi comparar a sensibilidade de duas linhagens celulares tumorais humanas K562 (não MDR) e K562-Lucena 1 (MDR) a diferentes concentrações do extrato contendo ficocianina.

**Métodos e Resultados:** Métodos: As células foram mantidas em meio RPMI-1640 com 10% soro fetal bovino à 37°C. A técnica de exclusão por azul de tripan foi usada para medir a viabilidade celular imediatamente, 24h e 48h após a adição do extrato. Os experimentos foram repetidos seis vezes com réplicas para cada concentração do extrato (0.05, 0.10, 0.20, 0.40 e 0.60 mg/ml) e também para as células controle (n=18 poços). Resultados: Nossos resultados mostram que ocorreu uma diminuição no número de células viáveis para a linhagem K562 na concentração de 0.20 mg/ml (31±1,80) quando comparada com o seu controle (47,05±3,70), em 48h. Para a linhagem Lucena esta diminuição ocorreu já na concentração de 0.05 mg/ml (17,55±1,62) quando comparada com o seu controle (27,94±3,20), em 48h.

**Conclusões:** Sugerimos que a ficocianina seja capaz de inibir a proliferação celular nas duas linhagens estudadas, e que a sensibilidade apresentada pela linhagem MDR indica que a ficocianina não é substrato para a Pgp, e que esta substância possa ser capaz de reverter o fenótipo MDR.

42.048

ESTUDO DA ATIVIDADE DA FITOHEMAGLUTININA E DE BASES DE MANNICH EM APOPTOSE DE CÉLULAS ENDOTELIAIS E NO PROCESSO DE ANGIOGÊNESE. Gouveia, M. R. F. V. ; Govato, T. C. P. <sup>\*\*</sup>; Govato, E. B. <sup>\*</sup>; Valvassori, H. <sup>\*\*</sup>; Zyngier, S. B. ; ICB, USP

**Objetivo:**

A angiogênese é o processo que compreende a formação de novos vasos a partir de outros pré-existentes; é comum em processos fisiológicos, como na embriogênese, mas também no câncer. Drogas que possam suprimir este processo são uma nova alternativa no tratamento desta patologia. O objetivo deste trabalho é avaliar a ação da fitohemaglutinina (PHA), uma lectina, e de bases de Mannich, que são alfa e beta cetonas insaturadas, sobre a apoptose de células endoteliais (REC) e sobre o processo de angiogênese.

**Métodos e Resultados:**

O estudo foi realizado "in vitro", avaliando-se a indução do processo de apoptose pelas drogas em células endoteliais de aorta de coelho (linhagem Clps). O processo apoptótico foi avaliado pelo método de eletroforese em microgel (método do cometa) e por análise morfológica em microscopia de fluorescência. Para o estudo "in vivo", camundongos machos BALB-c pré-tratados foram

submetidos a uma lesão corneal. A córnea é então avaliada quanto ao grau de vascularização. A análise estatística foi feita por análise de variância não paramétrica (Kruskal-Wallis com comparações múltiplas). Nível de significância adotado  $p < 0,05$ .

As células tratadas com PHA e as bases de Mannich apresentaram maiores fragmentações do DNA em relação ao controle, quando analisadas pelo método de eletroforese em microgel; isto pode representar a fragmentação característica do processo de apoptose, o que foi evidenciado pela análise em microscopia de fluorescência. Na análise de vascularização corneal de camundongos, os animais pré-tratados apresentaram menor área de neovascularização e menor valor médio de comprimento dos vasos neoformados.

**Conclusões:**

A fitohemaglutinina e as bases de Mannich induziram as células endoteliais à apoptose; a porcentagem de vascularização e o comprimento dos vasos corneais foi significativamente menor nos animais tratados.

42.049

ESTUDO SOBRE A FOSFORILAÇÃO DO RESÍDUO DE SERINA 392 DA PROTEÍNA P53 APÓS A DIFERENCIAÇÃO INDUZIDA PELA GONADOTROFINA CORIÔNICA HUMANA EM GLÂNDULA MAMÁRIA DE RATAS. Pereira, J.S.; Affonso, R.; Silva, I. D. C. G.; Ginecologia, UNIFESP

**Objetivo:**

O tratamento com gonadotrofina coriônica humana (hCG) apresenta um efeito protetor na glândula mamária de ratas porque induz a sua diferenciação, inibe a proliferação e provoca a ativação de genes que controlam a morte celular programada. No processo de diferenciação, um gene que se torna muito ativo é o gene da  $\beta$ -caseína. Este gene está envolvido na formação do leite materno além de estimular a caseína quinase II, enzima a qual fosforila o resíduo de serina 392 da proteína p53 resultando em ativação dessa proteína. O objetivo deste estudo foi a identificação de um eventual mecanismo contra a carcinogênese mamária, avaliando-se a presença de fosforilação em p53 nas glândulas mamárias que passaram por processo de diferenciação induzida pelo hCG.

**Métodos e Resultados:**

Seis ratas Sprague-Dawley virgens receberam, por 21 dias, uma dose intraperitoneal de hCG (Profasi) e tiveram suas glândulas mamárias extraídas. O tecido foi utilizado para a extração de proteínas e RNA. O RNA foi usado para avaliar a expressão gênica da caseína quinase II, através de PCR Real Time. A análise dos cDNAs demonstrou que nas ratas tratadas a expressão de caseína quinase II está aumentada. Para se averiguar a presença de fosforilação no resíduo 392 da p53 foram realizados western-blots utilizando-se o Phospho-p53 (Ser 392) Antibody (Cell Signaling), encontramos maior quantidade de proteína fosforilada nas ratas que passaram pelo processo de diferenciação.

**Conclusões:**

Observamos que o gene da caseína quinase II está mais expresso nas ratas que passaram pelo processo de diferenciação, essa eventualidade gera maior quantidade de proteína p53 fosforilada neste grupo de animais. Esses dados demonstram que a proteína p53 está mais ativa nas ratas que sofreram o tratamento com hCG.

42.050

FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF BRCA1 BY TRANSCRIPTION ACTIVATION ANALYSIS Marsillac, S.M. \*\*; Rondinelli, E.; Silva, R.; Monteiro, A.N.A.; Urmenyi, T. P.; IBCCF, UFRJ

**Objetivo:** BRCA1 was the first familial breast and ovary cancer gene discovered, and mutations in this gene account for most hereditary breast cancer cases. The inactivation of both alleles appears to be necessary for neoplastic progression in the breast and ovary, suggesting that BRCA1 acts as a tumor suppressor gene. Although the primary function of BRCA1 remains to be determined, there is good evidence that this protein is involved in transcription, recombination and DNA repair. Several naturally occurring mutations have been described for the BRCA1 gene, and some predispose to breast and ovarian cancer. Among some mutations identified in the BRCT domain, a functionally important portion of BRCA1, a correlation has been found between cancer predisposition and lack of transcription activation activity of this domain in vitro. Our aim is to further verify this correlation.

**Métodos e Resultados:**

We used site-directed mutagenesis by overlap extension PCR to generate in vitro missense mutations of the C-terminus of BRCA1 (aa 1560-1863), which corresponds to the BRCT domain. These mutations correspond to naturally occurring variations of BRCA1 gene sequence identified in humans, and the cancer predisposition (or lack of it) of these variations is known. The BRCT domain mutants will be used in transcription activation assays in both yeast and mammalian cells, which represent a valuable tool to assess the biochemical role of BRCA1, and the correlation of cancer predisposition and lack of transcription activation activity will be tested. We have generated 9 BRCT domain mutants and transcription activation assays is currently being performed with 5 of the mutants.

**Conclusões:**

The constructs containing 5 of the 9 mutants have been successfully obtained and are now being tested for their transcription activation activity. The correlation between cancer predisposition and lack of transcription activation is currently being determined.

42.051

LAMININ-1 ENHANCES SECRETION OF TYPE I COLLAGEN AND TENASCIN IN CELLS DERIVED FROM HUMAN ADENOID CYSTIC CARCINOMA Jaeger, R. ; Neto, N. S. \*; Azambuja Jr., N.; Freitas, V. M. \*\*; *Biologia Celular e do Desenvolvimento*, USP

**Objetivo:** Adenoid cystic carcinoma is a frequent malignant salivary gland neoplasm with high level of recurrence and distant metastasis. We have demonstrated that laminin-1 modulates the phenotype of an adenoid cystic carcinoma (CAC2) cell line. We are currently analyzing the role played by laminin-1 enhancing secretory activity of CAC2 cells.

**Métodos e Resultados:** CAC2 cells were grown inside laminin-1, while cells grown within agarose served as controls. Electron microscopy (EM) revealed that CAC2 cells grown within laminin-1 formed pseudocysts filled with secretory-like material. These cells also exhibited prominent and dilated endoplasmic reticulum, and numerous vesicles. Controls cells, grown in agarose, presented spindle-shaped morphology, with Golgi apparatus, myofilaments and scarce basement membrane lamina. These EM findings suggested that laminin-1 induces secretory activity in CAC2 cells. We further investigated this point by light microscopy, immunofluorescence and confocal microscopy. Histochemistry displayed PAS positive material in CAC2 cells treated by laminin. Immunoperoxidase detected type I collagen in these cells. CAC2 cells grown inside agarose (controls) showed no secretory-like material. Confocal microscopy provided additional information on the role played by laminin-1 enhancing secretory activity of CAC2 cells. Whole mount immunofluorescence was carried out in three-dimensional preparations of CAC2 cells grown either within laminin-1 (treated) or inside agarose (controls). Optical sections taken 1µm apart showed that laminin-1 enhanced secretion of collagen I and tenascin in CAC2 cells, when compared to controls.

**Conclusões:** Laminin-1 enhances secretion of type I collagen and tenascin in cells derived from human adenoid cystic carcinoma.

42.052

POMOLIC ACID-INDUCES CASPASE-INDEPENDENT CELL DEATH IN LN229, A GLIOMA CELL EXPRESSING HIGH LEVELS OF SURVIVIN. <sup>1</sup> Fernandes, J. ; <sup>2</sup> Castilho, R. O. \*\*; <sup>1</sup> Gattass, C. R. ; <sup>3</sup> Debatin, K-M ; <sup>3</sup> Fulda, S ; <sup>1</sup> IBCCF-UFRJ; <sup>2</sup> Pesquisas de Produtos Naturais, UFRJ; <sup>3</sup> Institute für Klinische Biochemie

**Objetivo:**

In previous studies we showed that pomolic acid (PA), a triterpene isolated from plants, was able to kill both sensitive and MDR-resistant leukemia cell lines. We also showed that PA induced a caspase-dependent cell death and that the blockage of loss of MMP, impaired PA-induced apoptosis, indicating that PA targets mitochondria. Recently we observed that overexpression of pre-mitochondrial anti-apoptotic factors (Bcl-2 and Bcl-xL) modulated but did not block PA-induced cell death. However we had no clue of the effect of overexpression of post-mitochondrial anti-apoptotic factors (IAPs) on PA activity. The aim of this work was to investigate the anti-tumoral activity and the mechanism of action of pomolic acid in LN229 a glioblastoma cell line with high constitutive expression of the IAP Survivin. This protein is known to interfere with the apoptotic machinery and to induce resistance in several types of tumor.

**Métodos e Resultados:**

The growth inhibition was assessed by MMT. Variations of mitochondrial membrane potential (MMP), cell cycle analysis and cytochrome c release were assessed by flow cytometry. Activation of caspases -3, 8 and -9 was analyzed by western blot. Optical microscopy was used for morphological analysis. The results have shown that, although pomolic acid extensively inhibits the growth of LN229 cells (80%), low levels of DNA fragmentation were observed, suggesting that the death is not mediated by apoptosis. In fact, morphological analysis showed that cells death was due to necrosis. PA also induced loss of MMP (60%) and release of cytochrome c (49%) in the glioblastoma line but there was no significant activation of caspases.

**Conclusões:**

Differently from its activity in leukemia cells, pomolic acid induced a caspase-independent cell death in LN229. These results showed that pomolic acid is able to induce cell death even in cell lines whose apoptotic machinery is partially blocked, as in the case of high expression of IAPs (survivin).

42.053

QUANTIFICATION OF RABBIT BONE METABOLISM BEFORE AND AFTER SUB-THERAPEUTIC DOSES OF 89-Sr (INITIAL RESULTS). <sup>1</sup> Braga, F. J.; <sup>2</sup> Kinoshita, A. \*; <sup>2</sup> Turco, F. P. \*; <sup>2</sup> Moraes, F. A. \*; <sup>2</sup> Iazigi, N. \*; <sup>2</sup> Souza, J. F. \*; <sup>3</sup> Trad, C. S. ; <sup>1</sup> Medicina Nuclear, Hospital São Lucas, RP; <sup>2</sup> ICB, USP; <sup>3</sup> ICB, FMRP-USP

**Objetivo:** Some beta emitters, such as 89-Sr, 153-Sm and 186-Re are in current use worldwide for the palliation of bone pain caused by metastases, mainly in cases of prostate and breast tumours (1,2). Radionuclide therapy is indicated in cases of disseminated bone metastases when conventional radiotherapy has already been used to a maximum dose and when pain relief does not occur with the use of current drugs. In order to quantifying the reduction of bone metabolism after such procedures, we have studied 10 young rabbits.

**Métodos e Resultados:** Ten rabbits, (2.5 months old, 1.5 kg), were imaged 2 hr after the intravenous injection of 150 MBq of 99mTc-MDP. Rabbits were counted for 30 seconds in a Siemens Orbiter scintillation camera. A region of interest (ROI) was drawn in the left knee joint. The knee joint was chosen because of its high bone metabolism in young animals. Each rabbit was injected intravenously with 1.5 MBq per kilo of 89-Sr immediately after this initial evaluation (therapeutic doses for humans are 2.0 MBq per kg). One month after, rabbits were evaluated again with 99mTc-MDP as described before and a second ROI was drawn in the same knee joint. The means of counts observed before and after 89-Sr injection were 11,222 and 4,399 respectively. These means are significantly different ( $p < 0.05$ ) and represent a reduction of over 60% in the knee joint bone metabolism after the 89-Sr dose.

**Conclusões:** Sr-89 is incorporated into hydroxiapatite with a whole body retention of 30-80% and there is no evidence suggesting that 99mTc diphosfonate radiopharmaceuticals have any different affinity for osteoblastic metastases than Sr-89 (1). A global reduction of bone metabolism occurs after a dose of a therapeutical agent and quantifying such a reduction has never been tried. We detected a reduction of circa 60% of bone metabolism in the knee joint of rabbits. Our results indicate that the joint of a young animal can be used for quantification of bone metabolism reduction after doses of a therapeutical agent such as 89-Sr.

42.054

RECRUTAMENTO DE CÉLULAS INFLAMATÓRIAS POR GALECTINA-3 FACILITAM O CRESCIMENTO DE MELANOMA MURINO IN VIVO. <sup>1</sup> Andrade , L. N. S. ; <sup>2</sup> Pinheiro, M.C. \*\*; <sup>3</sup> Nonogaki, S. ; <sup>1</sup> Chammas , R. ; <sup>1</sup> Oncologia Experimental - FM, USP; <sup>2</sup> Radiologia, USP; <sup>3</sup> Anatomia Patológica, Inst.Adolfo Lutz

**Objetivo:** galectina-3, uma proteína com especificidade para b-galactosídeos, encontra-se alterada em uma série de tumores. Além disso, essa lectina desempenha importante papel no processo inflamatório e angiogênico. O objetivo deste trabalho foi caracterizar morfológicamente o microambiente de tumores galectina-3 positivo e negativo e avaliar a cinética de crescimento tumoral in vivo.

**Métodos e Resultados:** células de melanoma murino TM1M transfectadas ou não com o gene de galectina-3 (clones TM1MG3 e TM1MN5, respectivamente) foram injetadas no coxim plantar de 10 camundongos fêmeas C57/BL6 (8 semanas) para caracterização morfológica do microambiente tumoral, por imunistoquímica, após 1, 3, 6 e 9 dias da injeção. O infiltrado inflamatório,

caracterizado por células de morfologia dendrítica galectina-3 positivas, se mostrou mais intenso nos animais injetados com células TM1MG3. Após 6 dias, nesses mesmos animais, observou-se a presença de células tumorais TM1MG3 negativas para galectina-3. Os mesmos clones foram injetados subcutaneamente em 20 animais (divididos em 2 grupos) e a cinética de crescimento tumoral foi similar em ambos grupos. Após 16 dias da injeção de células, os tumores foram removidos para imunistoquímica e extração de RNA. A análise da imunistoquímica confirmou a perda da expressão protéica de galectina-3 nos tumores originados de células TM1MG3. Em adição, a área da massa tumoral composta por células proliferativas (PCNA positivas) foi maior e as áreas necróticas menos extensas comparado aos animais controle (TM1MN5). A análise da expressão gênica mostrou um aumento na quantidade de RNAm de moléculas pró-angiogênicas nos animais injetados com o clone TM1MG3.

**Conclusões:** o presente trabalho mostra a perda de expressão de galectina-3 ao longo da progressão de melanoma murino in vivo. Tumores que transitoriamente expressam galectina-3 apresentam menor extensão de áreas necróticas e aumento na expressão de moléculas associadas à angiogênese que, juntamente com a presença células inflamatórias, parece facilitar a progressão desse tipo de tumor.

42.055

SIKVAV A LAMININ-1-DERIVED PEPTIDE, REGULATES PROTEASE ACTIVITY OF A HUMAN SALIVARY GLAND ADENOID CYSTIC CARCINOMA CELL LINE THROUGH INTEGRINS AND ERK Freitas, V. M. \*\*; Jaeger, R.; *Biologia Celular e do Desenvolvimento*, USP

**Objetivo:** Adenoid cystic carcinoma is a frequent malignant salivary gland neoplasm. It shows insidious and slow growth with high level of recurrence and distant metastasis long time after treatment. A prominent feature of adenoid cystic carcinoma is its affinity for basement membrane rich tissues, such as nerves and blood vessels. We have already demonstrated that laminin and its derived peptide SIKVAV regulates morphology and protease activity of a cell line (CAC2) derived from human adenoid cystic carcinoma.

**Métodos e Resultados:** We are studying the regulatory mechanisms underlying protease activity induced by SIKVAV in CAC2 cells. Immunohistochemistry detected MMPs 2 and 9 in formalin-fixed paraffin-embedded samples of human adenoid cystic carcinoma. Immunofluorescence showed these proteases in CAC2 cells. CAC2 cells were grown on SIKVAV, to analyze the role of this peptide regulating protease activity. Zymography of the conditioned medium showed that SIKVAV enhanced MMP-2 secretion in a dose-dependent manner. We also analyzed a putative receptor for SIKVAV in CAC2 cells. Blockage of integrins alpha3beta1 and alpha6beta1 decreased protease secretion. We further investigated a possible interaction between SIKVAV and integrins regulating protease activity in CAC2 cells. Blockage of different integrins subunits decreased the adhesion of CAC2 cells to SIKVAV. The same result was observed when cells were treated with a calcium chelator (EDTA). Interference RNA (RNAi) was also carried out to silence alpha3 integrin expression. CAC2 cells with silenced alpha3 integrin were grown on SIKVAV, and showed decrease of MMP activity. We attempted to establish a cell signalling pathway for the effect of integrins and SIKVAV in CAC2 cells. A MAPK kinase (MEK) inhibitor (UO126) decreased the effect of SIKVAV in the secretion of MMP-2 in CAC2 cells, suggesting that this peptide would work through integrins and ERK pathway.

**Conclusões:** We suggest that SIKVAV regulates protease activity of a human salivary gland adenoid cystic carcinoma cell line through integrins and ERK. To our knowledge this is the first report on the interaction between SIKVAV, integrins and ERK regulating protease activity in neoplastic cells.

42.056

THE LAMININ DERIVED PEPTIDE YIGSR MODULATES ADHESION MOLECULES IN AN ADENOID CYSTIC CARCINOMA CELL LINE Freitas, V. M. ; Oliveira, E. \*\*; Furuse, C.; Araújo, V. C.; Jaeger, R.; *Biologia Celular e do Desenvolvimento*, USP

**Objetivo:** Adenoid cystic carcinoma is a frequent malignant salivary gland neoplasm with high level of recurrence and distant metastasis. We have demonstrated that laminin-1 modulates the phenotype of an adenoid cystic carcinoma (CAC2) cell line. We are currently studying the

expression of a non-integrin laminin receptor, the 32/67kDa laminin-binding protein (LBP), in adenoid cystic carcinoma

**Métodos e Resultados:** Immunohistochemistry showed the presence of LBP in adenoid cystic carcinoma in vivo. Immunofluorescence of CAC2 cells also revealed this receptor. The LBP binds to a sequence of the laminin beta 1 chain, the YIGSR peptide. This peptide promotes cell attachment and migration. Thus, we decided to study the role played by the peptide YIGSR and its ligand, the LBP receptor, in CAC2 cells. These cells were grown inside either laminin-1 (controls) or laminin-1 enriched with YIGSR (treated). Light microscopy showed that laminin-1 induced CAC2 cells to create solid formations of cells closely packed. On the other hand, CAC2 cells grown in contact with YIGSR showed a completely different pattern. Cells were non-cohesive and spindle shaped. To address whether the effect of YIGSR was dependent on LBP, CAC2 cells were pretreated with antibody against this receptor. Blockage of LBP receptor inhibited YIGSR effect on CAC2 morphology. We then decided to study whether YIGSR would inhibit the presence of adhesion molecules in CAC2 cells. We prepared cytoskeletal fractions of CAC2 cells grown either inside laminin-1 or laminin-1 enriched with YIGSR. Western blot of these fractions demonstrated that YIGSR decreased the amount of E-cadherin and beta-catenin in CAC2 cells, when compared to cells grown inside laminin-1. Pretreatment of CAC2 cells with anti-LBP restored e-cadherin and beta catenin expression

**Conclusões:** YIGSR and its ligand, 32/67kDa LBP regulates the expression of e-cadherin and beta-catenin in an adenoid cystic carcinoma cell line

42.057

UNUSUAL FINDING IN THYROID CARCINOMA. BRAGA, FJHN. HOSPITAL SAO LUCAS, RIBEIRÃO PRETO, BRAZIL. Braga, F. J. H. N. ; Medicina Nuclear, Hospital São Lucas, Ribeirão Preto

**Objetivo:** Several histological types of thyroid tumours are known to produce haematogenic metastases to bone (1), but even the most aggressive ones generally cause lesions seen in bone scintigraphy as small, round, homogeneous and restricted areas of increased uptake of the radiopharmaceutical. Abnormal areas generally take iodine up as well. We received a 57 y o male patient with proven papillary thyroid cancer (operated 2 years before) for both Na 131-I and bone scintigraphy, who had a story of fracture of the umerus, followed by increasing volume of the arm. Clinical examination showed a large, heterogeneous and petrous mass affecting his whole right arm. Histological examination showed it to be a metastases from thyroid cancer. A Na 131-I study (100 MBq, anterior and posterior whole-body images, 300 thousand impulsions per image, 24 and 48 h after the dose) was performed. Iodine was avidly taken up by the mass. Bone scintigraphy (99mTc-MDP, 750 MBq, anterior and posterior whole-body images, 500 thousand impulsions per image, 2 h after the dose) showed an unusual scintigraphic aspect: the mass corresponded to a large elliptical area of heterogeneous and moderate/important uptake (figure). Uptake is so important that sternum (on the right side of image) and ribs (in the middle) are fairly seen.

**Métodos e Resultados:** Bone scintigraphy showed a large, heterogeneous and elliptical area of moderate/important uptake of 99mTc-MDP. Sternum and ribs were fairly seen.

**Conclusões:** Papillary thyroid cancer produces, in general, local lymph node metastases but may affect lungs, bone and brain (2). The present case is probably the consequence of a coincidence: we imagine that the fractured arm area had the role of a filter, retaining tumoral cells, eventually fallen into the blood stream. In addition, the inflammatory process caused by the fracture increased the number of cells arriving to the region. These features produced a very unusual image in both iodine and bone scintigraphy.